

# Modulation der Gai1/s-Proteinaktivität durch lineare und makrozyklische Peptide

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Britta Nubbemeyer**

aus

Berlin

Bonn, März 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2017 bis März 2021 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Diana Imhof angefertigt.

Erstgutachterin: Prof. Dr. Diana Imhof

Zweitgutachter: Prof. Dr. Matthias Geyer

Tag der Promotion: 09.06.2021

Erscheinungsjahr: 2021

*Für meine Familie*

## Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von peptidischen Modulatoren für die Gai/s-Proteinaktivität. Die G $\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine ist eine bedeutende pharmakologische Zielstruktur, da diese G-Proteine an diversen (patho-)physiologischen Prozessen beteiligt sind. Die G $\alpha$ -Untereinheit fungiert dabei als molekularer Schalter und besitzt Kontaktregionen an der Proteinoberfläche, die zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) mit Signaltransduktionspartnern vermitteln. Bisher existieren selektive Modulatoren nur für eine der vier G $\alpha$ -Subfamilien (G $\alpha$ s, G $\alpha$ i, G $\alpha$ q und G $\alpha$ 12/13), und zwar G $\alpha$ q.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Screeningexperimente mit zwei kombinatorischen Peptidbibliotheken lineare und bityklische Peptide als potentielle Kandidaten für die Modulation der Gai/s-Proteinaktivität identifiziert. Nach Ableitung von Konsensussequenzen wurden 13 lineare und 18 bityklische Hits als ausgewählte Vertreter synthetisiert und analytisch charakterisiert. Aus der Serie der linearen Peptide wurde insbesondere GPM-1 als hoch-affiner Gai1-Binder identifiziert, welcher sequentielle Ähnlichkeiten zu bereits literaturbekannten Gai/s-Bindern und dem GEM (Guaninnukleotidaustauschmodulator)-Motiv von Proteinen mit einer GEM-Aktivität aufweist. Dieses Peptid wurde im Folgenden mit der Intention optimiert, die Zellpermeabilität und die proteolytische Stabilität zu erhöhen. In funktionellen Studien stellten sich die beiden Derivate GPM-1c und GPM-1d als aktiver im Vergleich zur Leitstruktur heraus und zeigten einen GEM-ähnlichen Effekt in einem zellfreien und einem zellbasierten Ansatz. Die experimentellen Ergebnisse wurden durch computerbasierte Analysen bekräftigt, welche zudem Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen lieferten. Darüber hinaus wurden die Gai/s-Kontaktflächen auf ihre Zugänglichkeit analysiert, um strukturelle Determinanten für die zukünftige Entwicklung von Gai/s-Proteinmodulatoren zu definieren. Daraus wurde, in Kombination mit den in dieser Arbeit erhaltenden Ergebnissen, die Switch II/ $\alpha$ 3-Region als Zielregion für die weitere Entwicklung von neuen, aber auch bereits bestehenden Modulatoren vorgeschlagen. Zudem wurden die 18 bityklischen Hits für die funktionellen Studien mit dem zellfreien und zellbasierten Ansatz bereitgestellt.

Die vorliegende Dissertation liefert substanzielle Beiträge für die Entwicklung von peptidischen Modulatoren der Gai/s-Proteinaktivität und Einblicke in deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen kann die GPM-1-Leitstruktur sowie die optimierten Derivate GPM-1c und GPM-1d als chemische Werkzeuge in pharmakologischen Studien dienen und für die biomedizinische Anwendung und die pharmakologische Forschung weiterentwickelt werden. Diese Dissertation trägt somit dazu bei, neue Einblicke in die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion und damit zusammenhängende Krankheitsbilder zu erhalten. Die Arbeit könnte demnach einen weiteren Forschungsfortschritt ermöglichen, mit dem Ziel, die als „undruggable“ beschriebene G $\alpha$ -Untereinheit in der Zukunft als „druggable“ zu etablieren.



## Abstract

The present dissertation focuses on the identification and characterization of peptidic modulators for the Gai/s protein activity. The G $\alpha$  subunit of heterotrimeric G proteins is an interesting pharmacological target structure, since these G proteins are involved in diverse (patho-)physiological processes. In this context, the G $\alpha$  subunit acts as a molecular switch and exhibits contact sites on the protein surface that mediate numerous protein-protein interactions (PPIs) with signal transduction partners. To date, selective modulators only exist for one of the four G $\alpha$  subfamilies (G $\alpha$ s, G $\alpha$ i, G $\alpha$ q, and G $\alpha$ 12/13), namely G $\alpha$ q.

In the present thesis, screening experiments with two combinatorial peptide libraries were conducted to identify linear and bicyclic peptides as potential candidates for the modulation of the Gai/s protein activity. After derivation of consensus sequences, 13 linear and 18 bicyclic hits were synthesized as representatives and characterized analytically. From the linear peptides, GPM-1 was obtained as a high-affinity Gai1 binder, which exhibits sequential similarities to previously reported Gai/s binders and the GEM (guanine-nucleotide exchange modulator) motif of proteins possessing a GEM activity. This peptide was subsequently optimized with the intention of increasing the cell permeability and the proteolytic stability. In functional studies, the two GPM-1 derivatives, GPM-1c and GPM-1d, turned out to be more active than the lead structure and showed a GEM-like activity in a cell-free approach and in a whole cell assay. The experimental results were supported by computer-based analyses, which also provided insights into the structure-activity relationships. Furthermore, the Gai/s contact sites were analyzed for their accessibility to define structural determinants for the development of Gai/s protein modulators in the future. In combination with the results obtained in this thesis, the Switch II/ $\alpha$ 3 region was proposed as a target region for the further development of existing or new binders/modulators. In addition, the 18 bicyclic hits were provided for the functional studies using the cell-free approach and the whole cell assays.

The present dissertation contributes substantively to the development of peptidic modulators for the Gai/s protein activity and provides insights into their structure-activity relationships. Based on the obtained results, the GPM-1 lead structure as well as the optimized GPM-1c and GPM-1d can serve as chemical tools in pharmacological studies and can be further developed for biomedical application and pharmacological research. This dissertation contributes to provide new insights into G protein-mediated signal transduction and related pathologies. Consequently, this work could enable further research progress with the goal of rendering the "undruggable" G $\alpha$  subunit "druggable" in the future.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>2</b>
2.1	Pharmakologisches Potential von Peptiden	2
2.1.1	Spezialfall: Makrozyklische Peptide	6
2.2	Heterotrimere G-Proteine	8
2.2.1	G-Proteinabhängige Signaltransduktionswege	9
2.2.2	Struktur der heterotrimeren G-Proteine	12
2.3	Adressierung der Gai/s-Untereinheit	17
2.3.1	Interaktionsflächen der Gai/s-Untereinheit	17
2.3.1.1	G $\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche	18
2.3.1.2	G $\alpha$ -G $\beta\gamma$ -Interaktionsfläche	19
2.3.1.3	G $\alpha$ -Effektor-Interaktionsfläche	20
2.3.1.4	G $\alpha$ -Hilfsproteine-Interaktionsfläche	21
2.3.2	Erkrankungen im Zusammenhang mit der Gai/s-Untereinheit	23
2.3.3	Modulatoren der Gai/s-Proteinaktivität	26
2.3.3.1	G $\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche	27
2.3.3.2	G $\alpha$ -G $\beta\gamma$ -Interaktionsfläche	28
2.3.3.3	G $\alpha$ -Effektor-Interaktionsfläche	29
2.3.3.4	G $\alpha$ -Hilfsproteine-Interaktionsfläche	29
2.4	Kombinatorisches Peptidbibliotheksscreening	36
2.4.1	SA-basierter Screeningansatz	36
2.4.2	PED-MALDI-MS	38
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>41</b>
4.1	Chemikalien und Reagenzien	41
4.2	Puffer und Lösungen	44
4.3	Geräte und Software	46
4.4	Methoden	46
4.4.1	Reversed-phase Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)	46
4.4.2	Massenspektrometrie	47
4.4.3	Aminosäureanalytik	49
4.4.4	UV-VIS-Spektroskopie	49
4.4.5	Sequenzierung mittels Edman-Abbau	49
4.5	Expression und Reinigung der G $\alpha$ -Proteine	49
4.6	Screening der kombinatorischen Peptidbibliotheken und Analyse	51
4.6.1	Biotinylierung der G $\alpha$ -Proteine und Nukleotidaustausch	51

4.6.2	Screening der kombinatorischen Peptidbibliotheken.....	52
4.6.3	Partieller Edman-Abbau und massenspektrometrische Analyse.....	53
4.7	Festphasenpeptidsynthese (SPPS) .....	56
4.8	Abspaltung der Peptide .....	58
4.9	Derivatisierung der Peptide .....	59
4.10	Bindungsstudien.....	60
4.11	MTT-Test.....	61
4.12	Funktionelle Studien.....	61
4.13	Computerbasierte Studien .....	63
4.13.1	Molekulare Modellierung und Erstellung eines Gai1-Homologiemodells .....	63
4.13.2	Molekulardynamik-Simulationen und Molekulares Docking .....	64
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>65</b>
5.1	Screening einer OBOC-Peptidbibliothek gegen Gai1 .....	66
5.1.1	Identifikation der Gai1-assoziierten Sequenzen .....	66
5.1.2	Synthese und Charakterisierung der Peptide .....	68
5.1.3	Gai1/s-Bindekapazität ausgewählter Peptide .....	69
5.1.4	Optimierung der Hitsequenz GPM-1 .....	74
5.1.5	Bioaktivitätsstudien .....	81
5.1.6	Computerbasierte Studien zur Visualisierung der Peptid-Gai1/s-Interaktionen ....	85
5.1.7	Zusammenfassung .....	92
5.2	Screening einer OBTC-Peptidbibliothek gegen Gai1 und Gas .....	94
5.2.1	Identifikation der Gai1/s-assoziierten Sequenzen .....	94
5.2.2	Synthese und Charakterisierung der Peptide .....	99
5.2.3	Bioaktivitätsstudien .....	101
5.2.4	Zusammenfassung .....	103
5.3	Analyse der G $\alpha$ -Kontaktflächen für die Adressierung durch Modulatoren .....	104
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>106</b>
	Literaturverzeichnis .....	110
	Anhang.....	136
	Abkürzungsverzeichnis .....	139
	Abbildungsverzeichnis .....	146
	Tabellenverzeichnis .....	148
	Schemataverzeichnis .....	149
	Danksagung .....	150
	Veröffentlichungen .....	152

## 1 Einleitung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden mit über 800 Mitgliedern die größte Klasse an humanen Transmembranrezeptoren.<sup>[1]</sup> Durch einen extrazellulären Stimulus der GPCRs durch Hormone, Neurotransmitter, Pheromone oder sensorische Reize wird die Signalweiterleitung diverser physiologischer Prozesse gesteuert.<sup>[1,2]</sup> Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion unter anderem über membrangebundene, heterotrimere G-Proteine, die wiederum das Signal an nachgeschaltete Effektoren weitergeben.<sup>[1,3]</sup> Die Bedeutung dieser Signalkaskaden ist nicht zu bestreiten, da über 30% der zugelassenen Arzneimittel die extrazellulär gut zugänglichen GPCRs adressieren.<sup>[4-6]</sup> GPCRs werden in verschiedenen Krankheitsbildern als Zielstruktur verwendet, wie z.B. bei der Alzheimer-Krankheit sowie bei Asthma, Multipler Sklerose, Diabetes mellitus Typ 2, Hypokalzämie, Depression und Krebs.<sup>[4,7-13]</sup> In manchen Krankheitsbildern ist allerdings die Adressierung der G-Proteine relevant, insbesondere, wenn verschiedene GPCR-vermittelte Signalweiterleitungsprozesse an der Pathogenese beteiligt sind oder die Ursache auf der Ebene der G-Proteine liegt.<sup>[14-17]</sup> Im Gegensatz zu den GPCRs werden heterotrimere G-Proteine als „undruggable“ referiert, da deren Adressierung durch die intrazelluläre Lokalisation erschwert ist.<sup>[17-20]</sup> G-Proteine kommunizieren im Allgemeinen über Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) mit GPCRs, Effektoren und Hilfsproteinen.<sup>[21-25]</sup> Daher ist die Unterbrechung dieser PPIs ein zielführender Ansatz für die Modulation, d.h. Aktivierung oder Inhibition, der G-Proteinaktivität.<sup>[17]</sup> Vor allem die  $G\alpha$ -Untereinheit ist in diesem Kontext eine bedeutende pharmakologische Zielstruktur, da sie wichtige Kontaktflächen für die Interaktion mit vor- oder nachgeschalteten Signaltransduktionspartnern besitzt und als molekularer Schalter („an“ (aktiv) oder „aus“ (inaktiv)) fungiert.<sup>[17,21-25]</sup> Eine fehlregulierte Proteininteraktion kann somit auch bei der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder eine Rolle spielen.<sup>[26]</sup>

Für die Unterbrechung von PPIs sind verschiedene Möglichkeiten bekannt. Dabei können PPIs in drei Klassen eingeteilt werden.<sup>[27,28]</sup> Die erste Klasse beinhaltet die Bindung von kurzen Peptidmotiven an kleine Proteindomänen (z.B. die SH2 (*Src-homology* 2)-Domäne, die Phosphotyrosin und benachbarte C-terminale Reste für die Bindung benötigt<sup>[29]</sup>).<sup>[27]</sup> Diese Klasse von PPIs sind gut durch niedermolekulare Verbindungen, kurze Peptide oder Peptidomimetika adressierbar.<sup>[27]</sup> Die zweite Klasse an PPIs wird primär durch strukturierte Epitope, wie z.B.  $\alpha$ -Helices, vermittelt (z.B. die Wechselwirkung zwischen p53 und MDM2<sup>[30]</sup>) und kann effizient durch „stapled“ Peptide angesteuert werden.<sup>[27]</sup> Die dritte Klasse von PPIs betrachtet große und flache Interaktionsflächen ( $1500-3000 \text{ \AA}^2$ <sup>[31]</sup>), die u.a. durch verschiedene Motive von in der Primärstruktur distanzierten Resten gebildet werden.<sup>[27]</sup> Diese PPIs sind sehr anspruchsvoll hinsichtlich ihrer Adressierung, da sie häufig keine größeren Bindungstaschen oder strukturell definierte Bindungsmotive besitzen.<sup>[27]</sup> Viele PPIs finden intrazellulär statt, weshalb das Erreichen dieser Interaktionsflächen für Modulatoren durch die Anforderung der Zellpenetration zusätzlich erschwert ist.<sup>[27]</sup> Als Folge dessen werden diese Zielstrukturen häufig als „undruggable“ bezeichnet.<sup>[19,20,32]</sup> Niedermolekulare Verbindungen können im Kontext der dritten PPI-Klasse mitunter nur limitiert anwendbar sein. Grund dafür ist, dass diese auf einer zweidimensionalen Proteinoberfläche weniger Interaktionen eingehen können und meist effizienter durch die Ausbildung vieler Kontakte in großen, tiefen Bindungstaschen ( $300-1000 \text{ \AA}^2$ <sup>[26]</sup>) binden.<sup>[27,28]</sup> In dieser Hinsicht kann die Verwendung von Peptiden oder Peptidomimetika aufgrund der potentiell größeren Kontaktfläche zielführend sein.<sup>[27,32]</sup>

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Pharmakologisches Potential von Peptiden

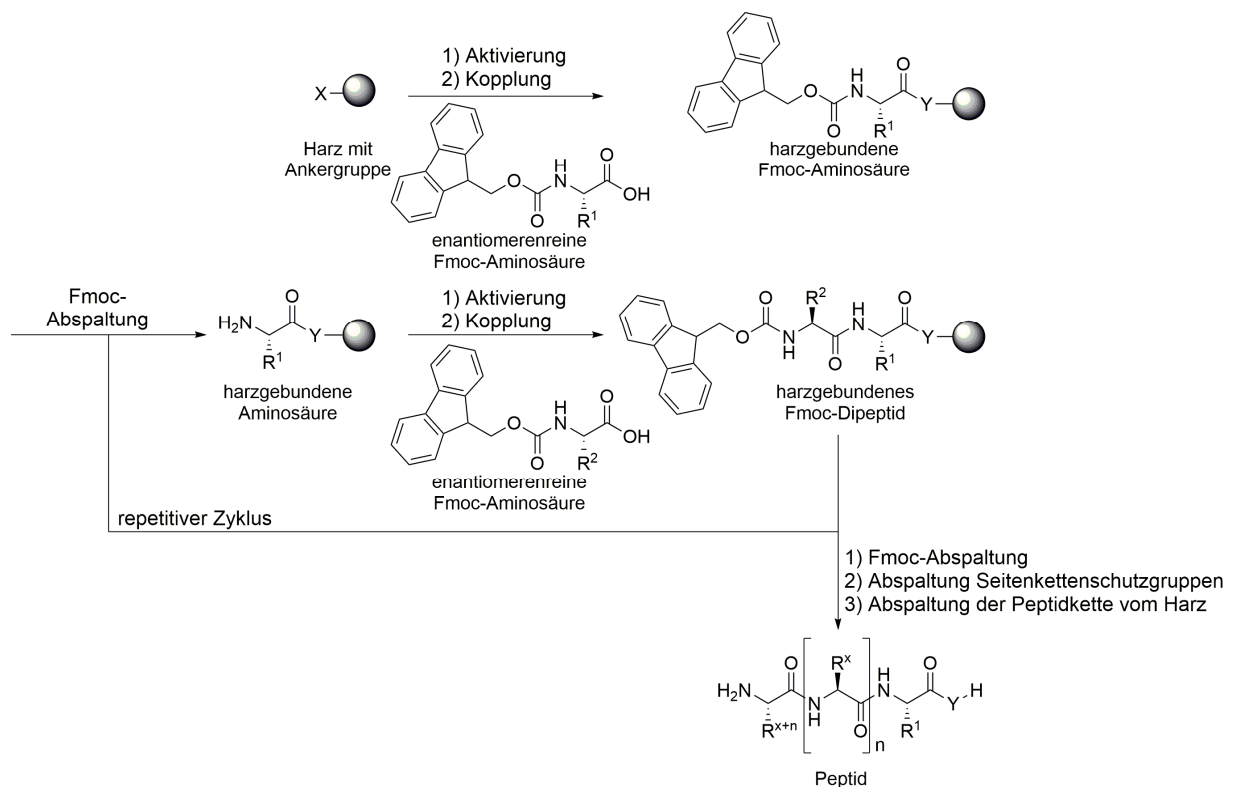
Peptide sind Biomakromoleküle aus Aminosäureeinheiten und spielen in der Natur unter anderem als Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und/oder Liganden für Ionenkanäle und GPCRs eine wichtige Rolle.<sup>[33,34]</sup> Dabei ist die Struktur der Peptide, welche vorwiegend durch die Primärstruktur, die Sekundärstruktur und je nach Peptidgröße die Tertiärstruktur bestimmt wird, entscheidend für die Funktion.<sup>[33,35]</sup> Aufgrund der vielfältigen physiologischen Aufgaben besitzen Peptide ein großes therapeutisches Potential, um u.a. natürliche Signalweiterleitungswege zu beeinflussen. In diesem Kontext, werden Peptide beispielsweise in „Ersatztherapien“ eingesetzt, wie z.B. das Insulin (51mer Peptid) im Falle von Diabetes mellitus, um z.B. die nicht ausreichend produzierten Mengen an Insulin im Patienten zu ergänzen.<sup>[26,34,36,37]</sup> Seit der Anwendung von Insulin in den 1920er Jahren wurden weitere Peptide, Peptidomimetika und Peptid-Konjugate als Arzneimittel zugelassen (~70) oder haben verschiedene Phasen der klinischen Studien (~400) erreicht.<sup>[26,33–35,37–40]</sup> Diese peptidbasierten Verbindungen werden unter anderem in der Hormontherapie, als Impfstoffe und auch in Krankheitsbildern wie Krebs, Diabetes, Osteoporose, Multipler Sklerose, in neurodegenerativen Krankheiten, metabolischen Krankheiten und kardiovaskulären Erkrankungen zu therapeutischen Zwecken eingesetzt.<sup>[32,37–39,41]</sup> Peptide können dabei PPIs unterbrechen und Rezeptoren, wie beispielsweise GPCRs und Ionenkanäle, aber auch intrazelluläre Zielstrukturen, wie z.B. Rezeptortyrosinkinasen, adressieren.<sup>[26,34]</sup>

Peptide (500-5000 g/mol, unterhalb von 50-100 Aminosäuren Länge) befinden sich im Übergangsbereich zwischen niedermolekularen Verbindungen (bis 500 g/mol) und biologischen Makromolekülen (z.B. Proteine, ab 5000 g/mol).<sup>[32,38,42]</sup> Niedermolekulare Verbindungen werden bisher am häufigsten als Arzneimittel eingesetzt.<sup>[37]</sup> Diese weisen eine gute und meist kostengünstige synthetische Verfügbarkeit, eine konformationelle Restriktion sowie eine gute Zellpermeabilität, metabolische Stabilität und orale Bioverfügbarkeit (nach Lipinski-Regeln, Kapitel 2.1.1) auf.<sup>[32,38,41,43]</sup> Nachteile von niedermolekularen Verbindungen können eine geringe Selektivität zur Zielstruktur und damit einhergehende Nebenwirkungen oder eine hohe metabolische Stabilität sein, wodurch ungewünschte Kreuzwechselwirkung verschiedener Arzneimittel verursacht werden können.<sup>[32,38]</sup> Auf der anderen Seite werden biologische Makromoleküle (z.B. monoklonale Antikörper) mit einer höheren Affinität, Selektivität und Potenz assoziiert, wodurch weniger Nebeneffekte beobachtet werden.<sup>[26,32,38]</sup> Durch den Aufbau aus natürlichen Bausteinen, wie beispielsweise Aminosäuren, sind die Biomoleküle außerdem meist weniger toxisch.<sup>[32]</sup> Als Nachteile sind die geringe orale Bioverfügbarkeit, die geringe Zellpenetration und die metabolische Instabilität zu nennen.<sup>[26,32,41]</sup> Ebenso können die Produktionskosten und die Immunogenizität von biologischen Arzneimitteln ein Nachteil sein.<sup>[32]</sup> Ein spezielles Interesse bei der Entwicklung peptidbasierter Arzneimittel ist es, die Vorteile niedermolekularer Wirkstoffe und biologischer Moleküle zu kombinieren. Dabei soll möglichst eine hohe Selektivität, Spezifität und Potenz sowie Stabilität und Bioverfügbarkeit bei gleichzeitig geringer Toxizität und Immunogenizität erreicht werden.<sup>[32,39,41,42]</sup>

Im Vergleich zu Biomakromolekülen sind Peptide synthetisch leichter und kostengünstiger zugänglich.<sup>[32]</sup> Durch die Fortschritte in der Peptidsynthese und deren Reinigung und Charakterisierung haben sich Peptide der guten Synthetisierbarkeit von niedermolekularen Verbindungen angenähert.<sup>[32]</sup> Die Synthese der Peptide kann über zwei Ansätze erfolgen: 1) die

chemische Synthese und 2) die biologische Herstellung über Expression.<sup>[32,39]</sup> Ein Meilenstein in der Peptidsynthese wurde mit der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) durch Robert Bruce Merrifield (Chemie Nobelpreis 1984<sup>[44]</sup>) gesetzt, die in der Folge außerdem die Automatisierung des Prozesses erlaubte.<sup>[45-47]</sup>

Bei der SPPS erfolgt die Kopplung  $\alpha$ -geschützter Aminosäuren an eine am C-Terminus trägergebundene Peptidkette (Schema 1). Als  $\alpha$ -Schutzgruppen werden vor allem die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl- (Fmoc, basenlabil) und die *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc, säurelabil) Schutzgruppen verwendet und die Seitenketten gegebenenfalls mit einer orthogonalen Schutzgruppe geschützt.<sup>[39,47,48]</sup> Die Peptidkette wird durch eine alternierende Abfolge von N-terminaler Schutzgruppenabspaltung und Kopplung einer Aminosäure mittels Kopplungsreagenzien und einer Base verlängert.<sup>[39,47]</sup>



Schema 1: Schematischer Ablauf der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) unter Verwendung der Fmoc-basierten Schutzgruppenstrategie. Eine enantiomerenreine Fmoc-Aminosäure wird an ein Trägermaterial unter der Bildung einer harzgebundenen Fmoc-Aminosäure gekoppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe liegt die harzgebundene Aminosäure frei für die nächste Kopplung vor, sodass die Peptidkette in repetitiven Zyklen verlängert werden kann. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>x</sup>, R<sup>x+n</sup> sind beliebige Aminosäureseitenketten, n die Anzahl der wiederholten Zyklen. Nach Abspaltung der Peptidkette vom Harz resultiert das Peptid nach n-Zyklen.

Neben der verbesserten synthetischen Zugänglichkeit von Peptiden hat sich auch deren Identifizierung durch die Verfügbarkeit von kombinatorischen Peptidbibliotheken, den Fortschritten in den Hochdurchsatzverfahren sowie im computergestützten rationalen Design oder den virtuellen Screeningtechniken verbessert.<sup>[26,32,38]</sup> Besonders hervorzuheben sind bei den experimentellen Methoden die *in vivo* Protein-Fragment-Komplementierungsassays<sup>[49,50]</sup> und *in*

*vitro* Techniken wie Phage Display<sup>[51,52]</sup>, mRNA Display<sup>[53,54]</sup>, Ribosom-Display<sup>[55,56]</sup>, CIS-Display<sup>[57]</sup> und das Screening von kombinatorischen Peptidbibliotheken<sup>[58–60]</sup>.<sup>[27,32,38]</sup>

Trotz der genannten Vorteile werden vor allem nicht-modifizierte Peptide mit einer geringen Zellpenetration, einer limitierten Stabilität und einer geringen oralen Bioverfügbarkeit, einer kurzen Lebensdauer in Plasma und Geweben, sowie einer geringen metabolischen Stabilität assoziiert.<sup>[26,38,41,42]</sup> Die limitierte Stabilität und orale Bioverfügbarkeit wird in diesem Kontext vor allem durch die Instabilität gegenüber Proteasen und Peptidasen begründet.<sup>[41,42]</sup> Um diesen unerwünschten Eigenschaften entgegenzuwirken, werden daher häufig Modifikationsstrategien angewendet, um die pharmakologischen Eigenschaften der Peptide zu verbessern.<sup>[41,42]</sup> Durch die Synthese von verkürzten Peptidfragmenten oder durch Mutation einzelner Aminosäurepositionen (z.B. Alanin-scanning) können zunächst die Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) analysiert und die Aminosäuren, die bedeutend für die entsprechende Funktion sind, identifiziert werden.<sup>[26,38]</sup>

Um die Zellpenetration der Peptide zu erhöhen, ist eine Konjugation der Peptide mit sogenannten zellpenetrierenden Peptidsequenzen (CPPs, 5-30 Aminosäuren, Tabelle 1), Lipiden oder anderen Transportern möglich.<sup>[38,41,61–64]</sup> CPPs sind kationischer oder amphiphatischer Natur und in der Lage, die Zellmembran durch direkte Penetration, Energie-verbrauchende Endozytose, oder Translokation durch die Bildung einer temporären Strukturänderung zu überwinden.<sup>[26,61–66]</sup> Ein Nachteil dieser CPPs kann die geringe Zellspezifität und die Aufnahme in intrazelluläre Endosome sein.<sup>[63]</sup> Da CPPs auch Peptide sind, gelten, neben der verbesserten Zellpermeabilität, die bereits genannten Limitationen von Peptiden auch an dieser Stelle.<sup>[63]</sup> Um die Zellpenetration der Peptide abseits der Konjugationsmethode zu erhöhen, kann es vorteilhaft sein, die Rigidität durch Einführung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zu erhöhen, wie es beispielsweise durch eine Zyklisierung erreicht werden kann.<sup>[33,41]</sup>

Tabelle 1: Prominente zellpenetrierende Peptide (CPPs) und deren Ursprung.<sup>[61,63]</sup>

Name	Sequenz	Ursprung
Tat <sup>[67]</sup>	GRKKRRQRRRPPQ	Transkription-regulierendes Protein HIV Tat
Penetratin <sup>[68]</sup>	RQIKIWFQNRRMKWKK	<i>Drosophila</i> Antennapedia Homeodomäne
Transportan <sup>[69]</sup>	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Galanin [1-12]-Lys-Mastoparan [1-14]
Octaarginin <sup>[70]</sup>	RRRRRRRR	Synthetischer Ursprung
FΦR <sub>4</sub> -Motiv <sup>[71]</sup>	F(2Na1)RRRR	Synthetischer Ursprung

Die proteolytische Stabilität von Peptiden kann durch Modifikationen innerhalb des Peptidrückgrates, in den Seitenketten oder dem N- und/oder C-Terminus erreicht werden.<sup>[26,38,40,41]</sup> Eine gezielte Analyse der molekularen Spaltstellen kann hilfreich sein, um die relevanten Aminosäuren in der Peptidsequenz zu substituieren.<sup>[33,38]</sup> Innerhalb des Peptidrückgrates gibt es diverse Möglichkeiten wie die N $\alpha$ -Modifikation (vor allem Methylierung), die Einführung von D-Aminosäuren oder  $\beta/\gamma$ -Aminosäuren sowie die Modifikation der Peptidbindung (z.B. Ersatz durch Esterbindung), die Verwendung von Peptoids (Poly-N-alkylglycine) oder Azapeptiden (Abbildung 1).<sup>[26,35,38,40–42]</sup> Bei der Optimierung durch Seitenkettenmodifikationen sind vor allem die Einführung von unnatürlichen oder nicht-proteinogenen Aminosäureresten zu nennen.<sup>[26,35,38,40–42]</sup> Diese

Seitenketten können ein Analogon der zu ersetzenden Seitenkette darstellen, wie z.B. Ornithin im Falle von Lysin oder heterozyklische Aromaten für aromatische Aminosäuren, und somit ähnliche physikalische Eigenschaften des resultierenden Peptids bewirken.<sup>[26,38]</sup> Des Weiteren ist auch der Ersatz einer Aminosäureeinheit durch andere Bausteine beschrieben.<sup>[35,40,41]</sup> Ein großer Nachteil bei der Einführung von nicht-proteinogenen Aminosäuren ist die potentielle Toxizität oder im Falle der N-Methylierung, eine mögliche Racemisierung unter den basischen oder sauren Bedingungen der SPPS, weshalb in diesem Fall eine komplexere Synthesestrategie benötigt wird.<sup>[35,41,42]</sup> Im Falle des Abbaus durch Exopeptidasen, Aminopeptidasen oder Carboxypeptidasen kann die Modifikation des N- und C-Terminus (z.B. durch N-Acetylierung und C-Amidierung) der Peptidkette zielführend sein.<sup>[26,35,41,42]</sup> Ebenso kann mittels der Bildung von sekundären Strukturelementen, durch beispielsweise Peptidfaltung, die Stabilität verbessert werden, da möglicherweise die Spaltstellen nicht mehr frei zugänglich sind.<sup>[33,35]</sup> Eine Kopplung an Albumin, die Konjugation an Polymere, z.B. PEGylierung (Polyethylenglycol, PEG) oder Glykosylierung, kann zudem die Stabilität erhöhen.<sup>[33,35,42]</sup> Die Zyklisierung ist ebenfalls eine bedeutende Möglichkeit für die Erhöhung der Stabilität und der Zellpenetration und wird in Kapitel 2.2.1 näher betrachtet.<sup>[41]</sup>

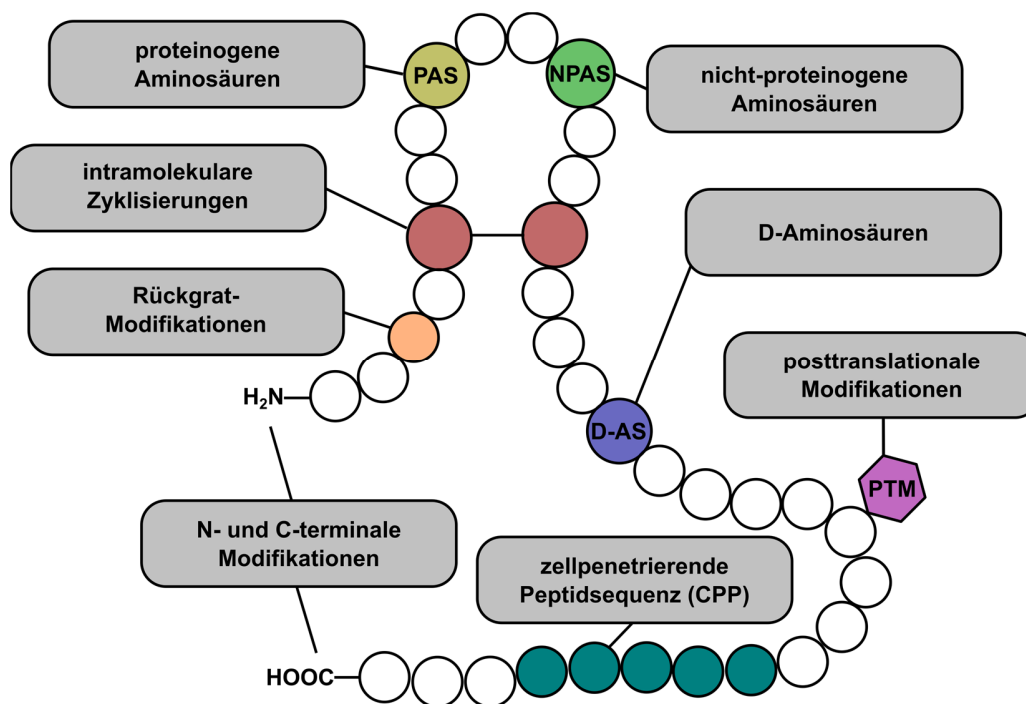


Abbildung 1: Übersicht über mögliche Modifikationen innerhalb der Peptidkette. Modifiziert nach Ding et al.<sup>[72]</sup>

Bei der Modifikation von Peptiden muss beachtet werden, dass diese Veränderungen Einflüsse auf die Struktur und somit die Affinität und Funktion der Peptide haben können. Bei Integration dieser strukturellen Merkmale (CPPs, Modifikationen, nicht-proteinogene Aminosäuren) in eine Peptidbibliothek, kann diesem Aspekt vorgebeugt werden.<sup>[38,73,74]</sup> Dies ermöglicht zudem die Abdeckung eines größeren chemischen Raums (konformationell und topographisch) für die Interaktion mit dem Zielprotein und eine höhere strukturelle Diversität der erhaltenen Treffer.<sup>[35]</sup>



### 2.1.1 Spezialfall: Makrozyklische Peptide

Viele Peptide erfüllen nicht die von Lipinski eingeführten Regeln, die sogenannten „Rule of 5“ (Ro5).<sup>[35]</sup> Diese Regeln dienen der Abschätzung von Löslichkeit und Permeabilität einer Verbindung, um ihr therapeutisches Potential zu eruieren.<sup>[43]</sup> Eine schlechte Absorption oder Penetration ist demnach zu erwarten, wenn mehr als 5 Wasserstoffbrücken-Donatoren (OH, NH) und/oder 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (O, N) vorhanden sind, das Molekulargewicht oberhalb von 500 g/mol liegt und der berechnete Logarithmus der 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (cLogP, Maß für die Lipophilie) größer als 5 ist.<sup>[43]</sup> Naturstoffe und Substrate für biologische Transporter sind von der Regel ausgenommen.<sup>[43,75]</sup> Die physikochemischen Eigenschaften von oral bioverfügbaren Arzneistoffen können konsistent mit der Ro5 sein.<sup>[76–78]</sup> Für Zielstrukturen, die als schwer adressierbar für Ro5 Verbindungen gelten, z.B. PPIs der 3. Klasse (Kapitel 1), existiert auch ein Raum über die Ro5 hinaus. Der Grund dafür ist, dass niedermolekulare Verbindungen an flachen Bindungsflächen häufig nur zweidimensionale Kontakte eingehen können und daher eine deutlich reduzierte Affinität gegenüber der Bindung in einer dreidimensionalen Bindungstasche besitzen.<sup>[26,27,31]</sup> Deshalb sollte die Ro5 für die Entwicklung pharmakologisch wirksamer Substanzen nicht überinterpretiert werden.<sup>[75–80]</sup>

In diesem Kontext besitzen Makrozyklen (Ring mit  $\geq 12$  Atomen, 500-2000 g/mol) ein enormes therapeutisches Potential mit geeigneten physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften, wie z.B. einer guten Löslichkeit, Lipophilie, metabolischen Stabilität und Bioverfügbarkeit.<sup>[27,79–82]</sup> Makrozyklische Peptide können scheiben- oder kugelförmig sein und über eine große Wechselwirkungsfläche durch viele, räumlich verteilte Interaktionen an flache Bindungsstellen binden und damit PPIs unterbrechen.<sup>[76,80–82]</sup> Als Folge dessen kann die Affinität, Selektivität und Potenz erhöht sein, da die Bindungsoberfläche eine vergleichbare Größe wie Antikörper oder native PPIs aufweisen kann.<sup>[27,41,81]</sup> Makrozyklen besitzen eine intrinsische konformationelle Stabilität und erhöhte Rigidität gegenüber ihren linearen Gegenstücken, wodurch die Stabilität dieser Peptide erhöht ist.<sup>[40,41,82]</sup> Dennoch sind Makrozyklen nicht rigide Verbindungen aufgrund der hinreichenden Flexibilität sich an die Zielstruktur anzupassen und die Bindungswechselwirkungen zu maximieren. Die Zyklisierung verursacht außerdem eine strukturelle Präorganisation, die den Entropieverlust bei der Bindung im Vergleich zum linearen Analogon reduziert, aber auch eine räumliche Organisation funktioneller Regionen ermöglicht.<sup>[81–83]</sup> Außerdem kann sich die Zyklisierung positiv auf die Zellpenetration auswirken.<sup>[41,81–85]</sup>

Es wurden bereits für einige Zielstrukturen natürliche Makrozyklen als Liganden für die medizinische Anwendung identifiziert, welche häufig nicht-kanonische Strukturmerkmale aufweisen.<sup>[80,86]</sup> Ein prominentes Beispiel ist das als Immunsuppressivum eingesetzte Cyclosporin A (**1**), ein oral bioverfügbares 11mer Peptid (Abbildung 2).<sup>[33,38,80,86,87]</sup> Cyclosporin A (**1**) beinhaltet drei Strukturmerkmale, die maßgeblich für dessen pharmakologisches Potential sind. Dies ist zum einen das zyklische Rückgrat, welches die Rigidität, die Bindungsaffinität und die proteolytische Stabilität erhöht. Zusammen mit den hydrophoben Seitengruppen bewirkt dieses die Orientierung der polaren Seitengruppen in das Molekülinnere. Dabei spielt auch das zweite Strukturmerkmal, vier intramolekulare Wasserstoffbrücken, eine Rolle, die zusammen mit den sieben  $\alpha$ -Methylierungen (3. Strukturmerkmal) das intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungspotential und die Solvation durch Wasser reduzieren.<sup>[41,86,87]</sup> Die eingeschränkte Flexibilität und die erhöhte Hydrophobizität wirkt sich zudem positiv auf die Zellpermeabilität des Peptides aus.<sup>[27,41,86,87]</sup>

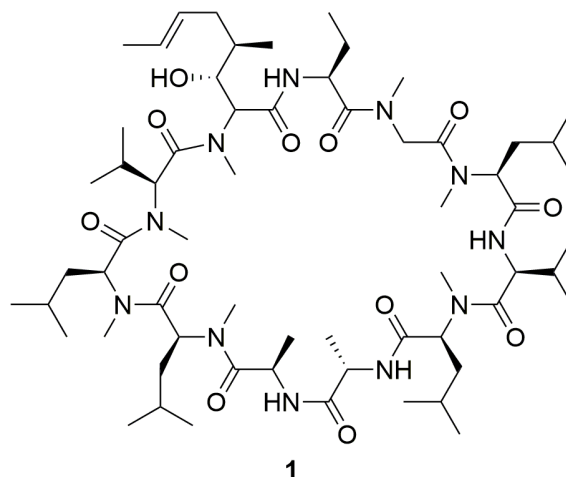


Abbildung 2: Chemische Struktur von Cyclosporin A (1).<sup>[86]</sup>

Eine Weiterentwicklung der monozyklischen Peptide ist die Verwendung von bicyklischen Peptiden. Bicyklische Peptide zeigen eine erhöhte strukturelle Rigidität und metabolische Stabilität im Vergleich zu linearen oder monozyklischen Peptiden.<sup>[59]</sup> Monozyklische Peptide mit einer Ringgröße kleiner 10 Aminosäuren gelten als relativ resistent gegenüber Proteasen und können oral bioverfügbar sein.<sup>[59,81]</sup> Mit steigender Ringgröße, werden diese Peptide jedoch anfälliger gegenüber Proteasen, vor allem wenn diese aus vornehmend proteinogenen Aminosäuren bestehen, und weisen eine höhere strukturelle Flexibilität auf.<sup>[59]</sup> Daher kann die proteolytische Stabilität durch die Überführung in ein bicyklisches Peptid erhöht werden, um die Größe der einzelnen Ringe zu reduzieren. Die erhöhte Rigidität kann sich positiv auf die Bindungsaffinität zur Zielstruktur und die Selektivität der Bindung auswirken.<sup>[59]</sup> Durch die zwei getrennten Ringsysteme ist zudem denkbar, die Funktionen beider Ringsysteme zu trennen, z.B. ein Ring für die Bindung an die Zielstruktur und der andere Ring dient der Zellpenetration.<sup>[59]</sup>

Abhängig von der funktionellen Gruppe kann die Zyklisierung am Peptidrückgrat als Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung oder durch Involvierung der Seitenketten über eine Kopf-/Schwanz-zu-Seitenkette- oder Seitenkette-zu-Seitenkette-Verknüpfung erreicht werden. Häufig eingesetzte Verknüpfungsarten sind Lactame, Lactone, Disulfidbrücken, Thioether oder Mehrfachbindungen (Ringschlussmetathese).<sup>[26,39–41,84,88]</sup> Als Seitenketten sind häufig Lysin (Aminofunktion) sowie Asparaginsäure und Glutaminsäure (beide Carboxylfunktion) beteiligt.<sup>[26]</sup> Auch die Techniken der Hochdurchsatzscreenings (HTS) haben sich im Laufe der Zeit weiterentwickelt und ermöglichen die Identifikation von makrozyklischen Peptiden<sup>[27,74,86,89]</sup>, wie z.B. das Phage Display<sup>[73]</sup>, mRNA Display<sup>[90]</sup>, RaPID System<sup>[91]</sup> oder OBTC-Peptidbibliotheksscreenings (Kapitel 2.4.1)<sup>[59,92,93]</sup>.<sup>[38]</sup> In diesen Ansätzen werden teilweise die bereits in Kapitel 2.1 beschriebenen Optimierungsverfahren angewendet, wie z.B. die Erhöhung der Zellpermeabilität durch Integration von CPP-Sequenzen.<sup>[85,94–97]</sup>

Zusammenfassend demonstriert dieses Kapitel das Potential von insbesondere (makro)zyklischen Peptiden für die Adressierung von nicht konventionellen Zielstrukturen wie z.B. PPIs, um vorher als „undruggable“ bezeichnete Strukturen pharmakologisch zugänglich zu machen.<sup>[98]</sup> Zu diesen als „undruggable“ referierten Zielstrukturen zählen heterotrimere G-Proteine, welche im Folgenden näher betrachtet werden.<sup>[20]</sup>

## 2.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine sind guaninnukleotidbindende Proteine. Diese bestehen aus drei Polypeptidsträngen,  $G\alpha$  (39-52 kDa<sup>[99]</sup>),  $G\beta$  (~36 kDa<sup>[99]</sup>) und  $G\gamma$  (7-8 kDa<sup>[99]</sup>), und grenzen sich somit von der Klasse der monomeren G-Proteine ab.<sup>[99]</sup> Die Bindung des Guaninnukleotids erfolgt an der  $G\alpha$ -Untereinheit, welche auch als molekularer Schalter bezeichnet wird.<sup>[23]</sup> Im inaktiven Zustand ist Guaninnukleotiddiphosphat (GDP) und im aktiven Zustand Guaninnukleotidtriphosphat (GTP) an  $G\alpha$  gebunden.<sup>[23]</sup> Es werden insgesamt 21 verschiedene  $G\alpha$ -Untereinheiten unterschieden, die durch 16 Gene codiert werden, sechs  $G\beta$ -Proteine, die durch fünf Gene codiert werden und zwölf  $G\gamma$ -Proteine, welche durch zwölf Gene codiert werden.<sup>[23,99,100]</sup> Heterotrimere G-Proteine werden vorrangig aufgrund sequentieller und struktureller Ähnlichkeiten der  $G\alpha$ -Proteine in vier verschiedene Subfamilien eingeteilt,  $G_{\alpha s}$  ( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha olf}$ ),  $G_{\alpha i/o}$  ( $G_{\alpha i1}$ ,  $G_{\alpha i2}$ ,  $G_{\alpha i3}$ ,  $G_{\alpha oA}$ ,  $G_{\alpha oB}$ ,  $G_{\alpha t1}$ ,  $G_{\alpha t2}$ ,  $G_{\alpha gust}$ , und  $G_{\alpha z}$ ),  $G_{\alpha q/11}$  ( $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha 11}$ ,  $G_{\alpha 14}$ ,  $G_{\alpha 15}$ , und  $G_{\alpha 16}$ ) und  $G_{\alpha 12/13}$  ( $G_{\alpha 12}$ ,  $G_{\alpha 13}$ ), welche sich aus den in Klammern geschriebenen Subtypen zusammensetzen (Abbildung 3).<sup>[99,101,102]</sup> Die  $G_{\alpha i/o}$ -Subfamilie (kurz  $G_{\alpha i}$ ) ist die am weitesten verbreitete Subfamilie im Menschen.<sup>[101]</sup> Obwohl die  $G_{\alpha 12/13}$ -Subfamilie in vielen Zelltypen exprimiert wird, ist diese weniger gut untersucht als die anderen drei Subfamilien.<sup>[99,101]</sup> Die Einteilung der  $G\beta$ -Proteine in zwei Subfamilien erfolgt auf der Grundlage der Sequenzhomologie, die Einteilung der  $G\gamma$ -Untereinheiten in vier Subfamilien auf der Basis der Sequenzhomologie innerhalb des C-Terminus.<sup>[100,103]</sup> Durch eine unterschiedliche Kombination der drei Untereinheiten kann eine hohe Diversität erreicht werden.<sup>[99,102]</sup>

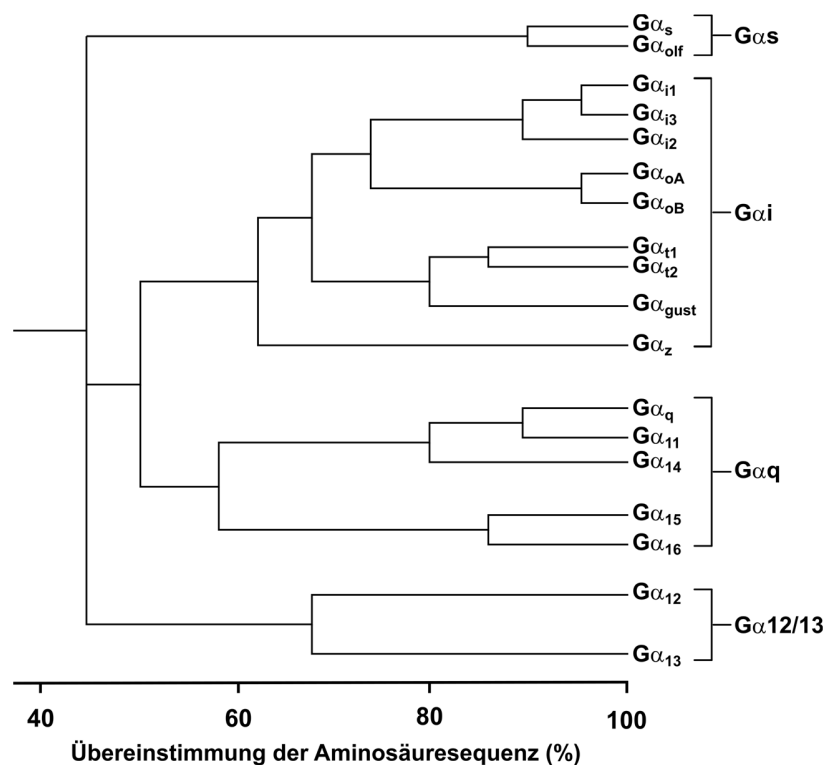


Abbildung 3: Beziehungen zwischen den  $G\alpha$ -Untereinheiten von Säugetieren (Mensch, Maus). Die  $G\alpha$ -Untereinheiten sind nach Aminosäuresequenzübereinstimmung gruppiert. Die Verzweigungen entsprechen ungefähr den für jedes Sequenzpaar berechneten Werten. Es wurden vier Klassen von  $G\alpha$ -Untereinheiten definiert. Die Spleißvarianten von  $G_{\alpha s}$  sind nicht dargestellt.<sup>[102]</sup> Die Abbildung wurde nach Simon et al.<sup>[102]</sup> und Syrovatkina et al.<sup>[3]</sup> erstellt.

Heterotrimere G-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung.<sup>[3,23]</sup> Diese intrazellulären, membranassoziierten Proteine werden durch extrazellulär stimulierte GPCRs aktiviert und leiten das Signal an nachgeschaltete Effektoren weiter.<sup>[23–25]</sup> Der genaue Ablauf dieser Signalkaskade wird im folgenden Kapitel 2.2.1 näher erläutert. Die Bedeutung und das große Interesse an der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion wird anhand der zwei Nobelpreise klar, die in den letzten 30 Jahren für Forschungen auf diesem Gebiet verliehen wurden.<sup>[104–108]</sup> Der erste Nobelpreis im Jahre 1994 wurde im Fachgebiet Physiologie und Medizin an Alfred G. Gilman und Martin Rodbell für die Entdeckung der G-Proteine und deren Bedeutung in der Signalweiterleitung vergeben.<sup>[105,106]</sup> Den zweiten Nobelpreis für Chemie erhielten 2012 Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka für ihre Forschungen an GPCRs.<sup>[107,108]</sup>

### 2.2.1 G-Proteinabhängige Signaltransduktionswege

Innerhalb der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion liegen G-Proteine im Grundzustand als GDP-gebundenes Heterotrimer vor (Abbildung 4).<sup>[23,25]</sup> Aufgrund von posttranslationalen Lipidmodifikationen (Kapitel 2.2.2) sind G-Proteine membranassoziiert und befinden sich in räumlicher Nähe zur intrazellulären G-Proteinbindungsstelle eines GPCRs.<sup>[23,25]</sup> Durch eine extrazelluläre Ligandenbindung an einen GPCR durch Hormone, Neurotransmitter, Pheromone oder sensorische Reize wird der Rezeptor aktiviert und verändert seine Konformation.<sup>[2,3,25]</sup> Diese Konformationsänderung bewirkt strukturelle Änderungen im G-Protein (Kapitel 2.2.2), welches zur Dissoziation des GDPs von der  $\alpha$ -Untereinheit führt.<sup>[2,22–25]</sup> Der gebildete Komplex aus Ligand, GPCR und G-Protein wird häufig als ternärer Komplex oder *empty pocket*-Konformation bezeichnet.<sup>[109,110]</sup> Durch die hohe intrazelluläre GTP-Konzentration (ca. zehnmal höher als die GDP-Konzentration<sup>[111]</sup>) erfolgt eine rasche GTP-Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit.<sup>[2,111,112]</sup> Die GTP-Bindung führt zur Dissoziation des Heterotrimers in die GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit und das  $\beta\gamma$ -Dimer. Beide Einheiten sind funktional und können nachgeschaltete Effektoren adressieren (aktiver Zustand).<sup>[23–25]</sup> Die G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit terminiert, die die Hydrolyse von GTP in GDP und Phosphat katalysiert. Anschließend reassoziert das heterotrimere G-Protein und liegt wieder im GDP-gebundenen Grundzustand vor.<sup>[23,25]</sup> Solange der Rezeptor weiterhin stimuliert wird, kann auch das G-Protein erneut aktiviert werden, weshalb noch ein weiterer Deaktivierungsmechanismus existiert. Dabei fungiert das  $\beta\gamma$ -Dimer als Bindungsstelle für G-Protein-Rezeptor-spezifische Kinasen (GRKs), die die Serin- und Threoninreste der intrazellulären Rezeptordomänen phosphorylieren können.<sup>[2,113,114]</sup> Dies ermöglicht die Bindung von Arrestin, welches den Rezeptor für die Interaktion mit dem G-Protein blockieren kann.<sup>[2,113–115]</sup> Der Rezeptor wird desensitiviert und ist für eine Zeit refraktär. Bei einer langanhaltenden Ligandenstimulation kann eine Rezeptorinternalisierung oder ein proteolytischer Verdau stattfinden.<sup>[114,115]</sup> Insgesamt sind die Deaktivierungsmechanismen entscheidend, um einer dauerhaften Stimulation des Signalweges durch Einwirkung von Liganden entgegenzuwirken und um selektiv auf Reize antworten zu können.<sup>[114]</sup>

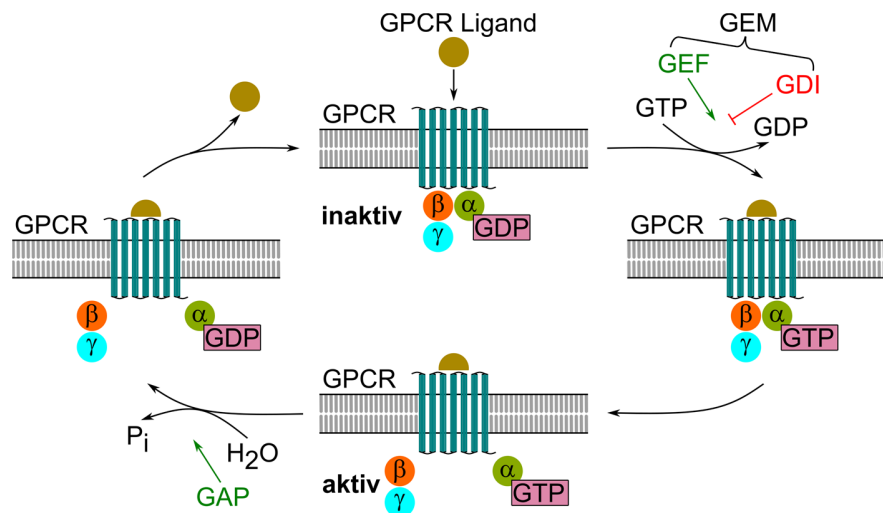
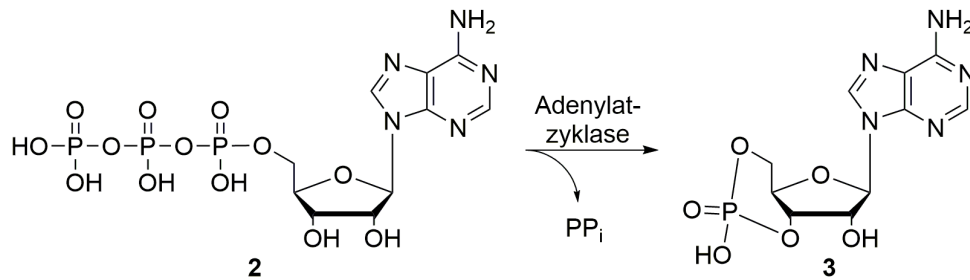


Abbildung 4: Signaltransduktion eines heterotrimeren G-Proteins. Im inaktiven Zustand ist das GDP-gebundene G-Protein als Heterotrimer angeordnet. Die Ligandenbindung an den GPCR fördert den Austausch von GDP zu GTP, der durch GEFs beschleunigt und durch GDIs gehemmt (beides: GEM-Aktivität) werden kann. Das GTP-gebundene Heterotrimer dissoziiert in  $\alpha$ -GTP und  $\beta\gamma$  (aktiver Zustand), welche beide nachgeschaltete Effektoren beeinflussen können. Nach der GTP-Hydrolyse, vermittelt durch die intrinsische GTPase-Funktion und beschleunigt durch GAPs, reassoziert  $\alpha$ -GDP mit  $\beta\gamma$ . Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

Neben der bereits beschriebenen Signalweiterleitung können Hilfsproteine die Signaltransduktion oder deren Deaktivierung beschleunigen. Zu diesen Hilfsproteinen zählen Aktivatoren des G-Protein-Signalwegs (AGS, *activators of G protein signaling*) und Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS, *regulators of G protein signaling*).<sup>[116–121]</sup> Diese interagieren mit der  $\alpha$ -Untereinheit und können als Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor (GDI)<sup>[122–124]</sup>, als Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF)<sup>[125]</sup>, als Guaninnukleotidaustauschmodulator (GEM)<sup>[126]</sup> oder als GTPase-beschleunigendes Protein (GAP)<sup>[117]</sup> agieren (Abbildung 4).<sup>[127,128]</sup> Die ersten drei genannten Regulationsmechanismen beeinflussen den GDP/GTP-Austausch, wobei GDIs das G-Protein im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand stabilisieren und somit die Aktivierung inhibieren und GEFs den Austausch beschleunigen.<sup>[116,127,128]</sup> GEMs können je nach G-Proteinsubstrat GDI- oder GEF-Aktivitäten ausüben.<sup>[127]</sup> GAPs hingegen beschleunigen die GTPase-Reaktion und spielen somit bei der Terminierung des Signalwegs eine maßgebliche Rolle.<sup>[119,128]</sup> AGS-Proteine werden in vier Klassen eingeteilt mit Klasse I) GEFs (alle  $\alpha$ ), II) GDIs (*Gai*-selektiv), III)  $\beta\gamma$ -bindend, IV)  $\alpha$ 16-spezifisch<sup>[116,121]</sup>, wohingegen RGS-Proteine meist als GAPs vorwiegend die *Gai*-Subfamilie beeinflussen und in verschiedene strukturelle und funktionelle Klassen eingeordnet werden<sup>[118–120]</sup>.

Heterotrimere G-Proteine können eine Reihe von nachgeschalteten Effektoren ansteuern (Abbildung 5).<sup>[24,101]</sup> Die  $G_{\alpha s}$ -Subfamilie stimuliert die membrangebundene Adenylatzyklase (AC, Isoformen ACI-IX), welche die Umsetzung von Adenosin triphosphat (ATP, **2**) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP, **3**) katalysiert (Schema 2). cAMP (**3**) ist ein sekundärer Botenstoff und kann verschiedene Signalwege beeinflussen, wie z.B. den Proteinkinase A (PKA)-Signalweg. Die Expression von *G $\alpha$ olf* ist dabei auf spezifische neurale Gewebe beschränkt und ist vor allem im olfaktorischen Epithel erhöht.<sup>[101,129,130]</sup> Im Gegensatz dazu, inhibieren *Gai*1-3 (weit verbreitet) und *Gaz* (in neuronaler Umgebung oder in Thrombozyten exprimiert) bestimmte Isoformen der AC (ACI, V, VI) und einhergehend die cAMP-Bildung.<sup>[101,130]</sup>



Schema 2: Zyklisierung von ATP (2) zu cAMP (3) katalysiert durch die Adenylatzyklase (AC).

Retinales Transducin (Gat1-2) wird durch Lichtaktivierung des Photorezeptors Rhodopsin (GPCR) aktiviert und stimuliert die Photorezeptor Phosphodiesterase (PDE). Gαgust wird in Geschmacks- und Bürstenzellen exprimiert und wird auch als PDE-stimulierend vermutet.<sup>[101]</sup> Für die Gai-Subfamilie wird außerdem eine regulierende Aktivität auf Ionenkanäle angenommen, wobei bekannt ist, dass diese Funktion vor allem durch die gekoppelten Gβγ-Dimere verursacht wird. In diesem Kontext ist vor allem Gαo zu nennen, welches bevorzugt in neuronalen oder neuroendokrinen Umgebungen exprimiert wird.<sup>[101]</sup> Da die Expressionslevel von Gi/o relativ hoch sind, werden neben Gai/o auch erhöhte Mengen an Gβγ freigesetzt, die G-Protein-aktivierte Kaliumkanäle (GIRKs) aktivieren und spannungsgesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (VDDC) hemmen können.<sup>[101]</sup> Des Weiteren kann das Gβγ-Dimer die Funktion verschiedener Subtypen der AC beeinflussen, die Phospholipase Cβ (PLCβ) aktivieren und die Arrestin-Rekrutierung einleiten.<sup>[101]</sup>

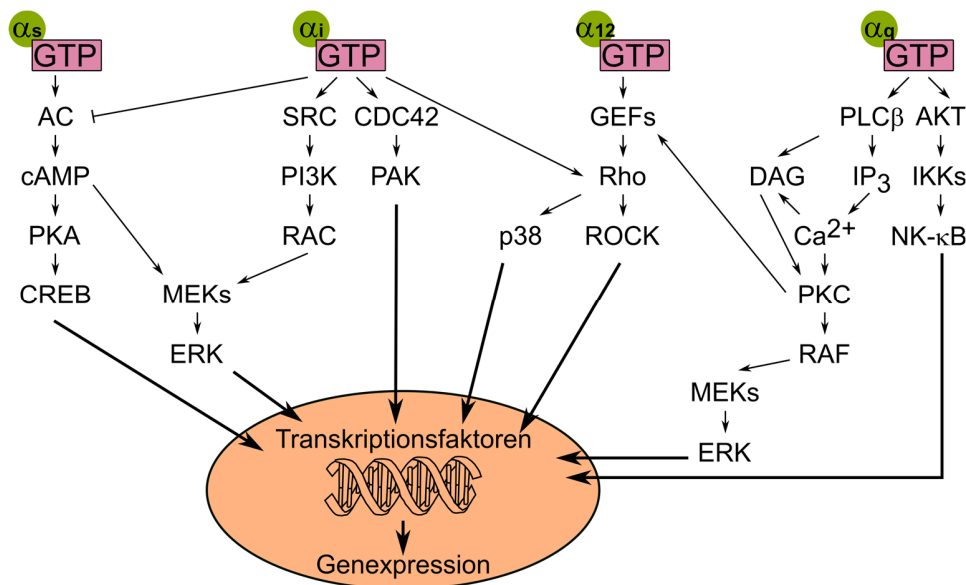


Abbildung 5: Ausgewählte Effektor-Signalwege abgeleitet von Lappano et al.<sup>[13]</sup> Gas stimuliert die Adenylatzyklase (AC) und erhöht den cAMP-Spiegel, wodurch die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und die ERK-abhängige (ERK: extrazelluläre signalregulierte Kinase) Signalkaskade gefördert wird. Gai hemmt AC und aktiviert SRC, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), RAC-MEK-ERK (RAC: RAS-verwandtes c3 Botulinumtoxin-Substrat 1, MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase), CDC42-PAK (Zellteilungszyklus 42, p21-aktivierte Kinase) sowie die Rho-vermittelte Signalweiterleitung. Gα12/13 aktiviert RhoGEFs und damit ROCK (*Rho-associated coil-coil containing protein kinase*) und p38. Gαq aktiviert die Phospholipase Cβ (PLCβ), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,3,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet, was zu einer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung, einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und damit zu RhoGEFs und MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signaltransduktion führt. Gαq aktiviert auch AKT (Proteinkinase B), das die NF-κB-Signalvermittlung moduliert. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

Die Gαq-Subfamilie aktiviert ebenfalls die Phospholipase Cβ (PLCβ), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert und somit den Inositol-Lipid-Signalweg (Ca<sup>2+</sup>/Proteinkinase C) stimuliert (Abbildung 5).<sup>[24,101,131]</sup> Obwohl die Gαq-Familienmitglieder alle die PLCβ aktivieren können, unterscheiden sie sich in ihren biochemischen Eigenschaften sowie ihrer Gewebeverteilung und damit einhergehend in ihrer funktionellen Diversität.<sup>[131]</sup> Die Gαq-Subfamilie kann zudem an GRKs binden und den initialen Schritt der GPCR-Desensitivierung steuern.<sup>[24,132]</sup> Die Gα12/13-Subfamilie reguliert die Familie der RhoGEFs.<sup>[24,101]</sup>

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Entwicklung peptidischer Modulatoren für die Gai/s-Subfamilien, weshalb im Folgenden nur noch auf diese Subfamilien und dabei insbesondere auf die Gα-Untereinheit näher eingegangen wird.

### 2.2.2 Struktur der heterotrimeren G-Proteine

Für die Entwicklung von Gα-Modulatoren ist die Kenntnis der strukturellen Determinanten des G-Protein-vermittelten Signalwegs unabdingbar. Die erste Struktur einer Gα-Untereinheit wurde 1993 von Noel et al.<sup>[133]</sup> gelöst, indem Gat mit dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogen GTPγS (Guanosine-5'-O-(γ-thio)-triphosphat) kristallisiert wurde. Dies lieferte Einblicke in die aktive Konformation der Gα-Untereinheit.<sup>[133]</sup> Ein Jahr später wurde auch die Struktur der inaktiven, GDP-gebundenen Gat-Konformation gelöst.<sup>[134]</sup> Bis heute wurden weitere Kristallstrukturanalysen und auch NMR-Strukturaufklärungen durchgeführt, welche zudem heterotrimere G-Proteine sowie Komplexe mit GPCRs, den Effektoren und Hilfsproteinen visualisierten (Abbildung 6, Tabelle 2).<sup>[22,23]</sup>

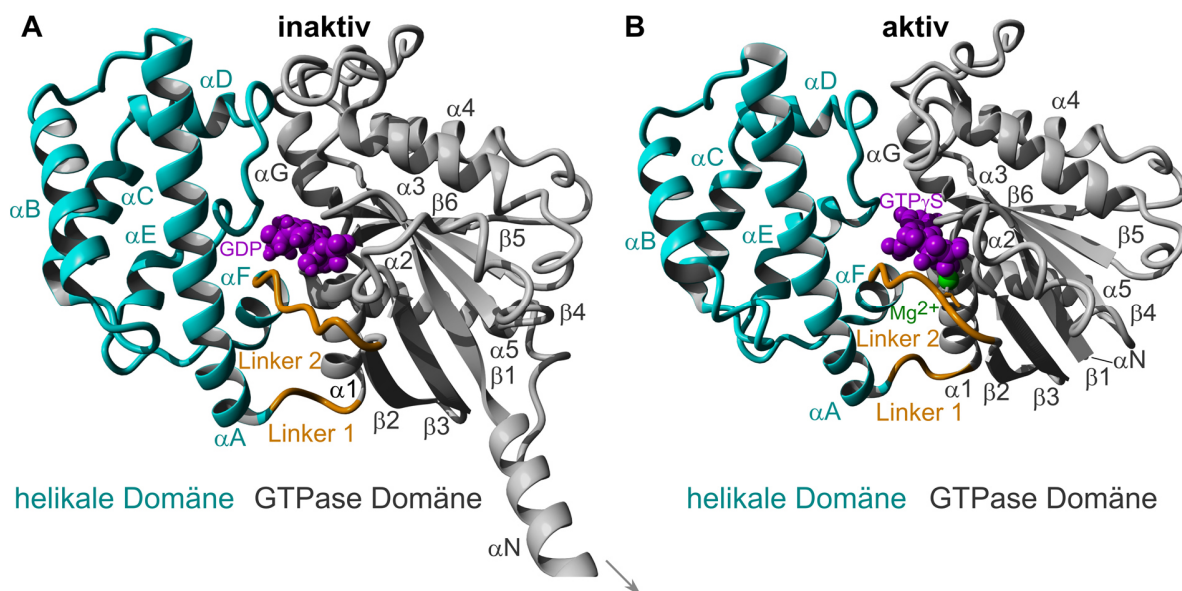


Abbildung 6: Struktur von Gα-Proteinen. Die GTPase-Domäne (grau), die helikale Domäne (cyan), beide Linker (orange) und die enthaltenen Sekundärstrukturelemente sind für das inaktive, GDP-gebundene (violett) Gai1-Homologiemodell (aus 3UMS<sup>[135]</sup> und 5JS8<sup>[136]</sup>, Kapitel 4.13.1)<sup>[137]</sup> in **A** und für das aktive, GTPγS-gebundene (violett) Gai1 (PDB: 1GIA<sup>[138]</sup>) in **B** dargestellt. In **A** ist αN zur Übersichtlichkeit verkürzt dargestellt. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

Tabelle 2: Auswahl von Gai/s-Proteinstrukturen aus der Protein Data Bank (PDB).<sup>[22,23]</sup>

PDB	Komplex	Aktivitätszustand	Freigabe	Auflösung [Å]
<b>Gα-Untereinheit</b>				
1TAG <sup>[134]</sup>	Gat·GDP	inaktiv	1995	1,80
1TAD <sup>[139]</sup>	Gat·GDP·AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Übergangszustand	1995	1,70
1TND <sup>[133]</sup>	Gat/i1·GTPyS	aktiv	1994	2,20
3UMS <sup>[135]</sup>	Gai1·GDP	inaktiv	2012	2,34
5JS8 <sup>[136]</sup>	Gai1·GDP	inaktiv	2016	-
1GFI <sup>[138]</sup>	Gai1·GDP·AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Übergangszustand	1995	2,20
1GIA <sup>[138]</sup>	Gai1·GTPyS	aktiv	1994	2,00
1AZT <sup>[140]</sup>	Gas·GTPyS	aktiv	1998	2,30
<b>Heterotrimer</b>				
1GOT <sup>[141]</sup>	Gatβ1γ1·GDP	inaktiv	1997	2,00
1GP2 <sup>[142]</sup>	Gai1β1γ2·GDP	inaktiv	1997	2,30
6EG8 <sup>[143]</sup>	Gasβ1γ2·GDP	inaktiv	2019	2,80
<b>Gα im Komplex mit GPCRs, Effektoren oder Hilfsproteinen</b>				
6D9H <sup>[144]</sup>	Gai2β1γ2·MAR4/A1	empty pocket	2018	3,60
1FQJ <sup>[145]</sup>	Gat/i·GDP·AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ·RGS9·PDEy	Übergangszustand	2001	2,02
1KJY <sup>[146]</sup>	Gai1·GDP·RGS14 GoLoco	inaktiv	2002	2,70
6VU8 <sup>[147]</sup>	Gai1·Ric8A	empty pocket	2020	4,14
6MHF <sup>[148]</sup>	Gai3·GDP·GIV GEF	inaktiv	2019	2,00
1AGR <sup>[149]</sup>	Gai1·GDP·AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ·RGS4	Übergangszustand	1997	2,80
3SN6 <sup>[150]</sup>	Gasβ1γ2·β2AR	empty pocket	2011	3,20
1AZS <sup>[151]</sup>	Gas·GTPyS·ACV/II	aktiv	1998	2,30
<b>Gα im Komplex mit Modulatoren</b>				
1Y3A <sup>[152]</sup>	Gai1·GDP·KB-752	inaktiv	2005	2,50
2G83 <sup>[153]</sup>	Gai1·GDP·AlF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ·KB-1753	Übergangszustand	2006	2,80

MAR4/A1: muscarinischer Acetylcholinreceptor M4-Adenosinreceptor A1-Chimera, β2AR: β2 adrenerger Rezeptor.

Bereits die ersten beiden Kristallstrukturexperimente zeigten, dass die Gα-Untereinheit eine konservierte Faltung besitzt und aus zwei Domänen besteht, der GTPase-Domäne und der helikalen Domäne (Abbildung 6).<sup>[133,134]</sup> Zwischen diesen Domänen befindet sich die Bindungstasche für das Guaninnukleotid (Abbildung 7).<sup>[133,134]</sup> Die GTPase-Domäne ist strukturell homolog zu Wachstumsfaktoren der G-Protein-Superfamilie, aber auch zu monomeren G-Proteinen, weshalb diese auch als Ras-Domäne bezeichnet wird.<sup>[17,133,134]</sup> Im Vergleich zu monomeren G-Proteinen sind vier Sequenzinsertionen in der GTPase-Domäne enthalten.<sup>[133,134]</sup> Strukturell ist diese Domäne aus einem sechssträngigen β-Faltblattmotiv (β1-6) aufgebaut, das von fünf α-Helices (α1-5) umgeben ist. Die helikale Domäne ist ein einzigartiges Strukturmerkmal der heterotrimeren G-Proteine und besteht aus einem α-Helixbündel mit fünf kleinen α-Helices (αB-F), die eine lange, zentrale α-Helix (αA) umrahmen.<sup>[133,134]</sup> Beide Domänen werden durch zwei Linker, Linker 1 und Linker 2, verbunden. Insgesamt ergibt sich die folgende Abfolge an Sekundärstrukturelementen ausgehend von einer N-terminalen α-Helix (αN, in den ersten Kristallstrukturen nicht enthalten, da flexibel oder ungeordnet): αN, β1, α1, Linker 1, αA, αB, αC, αD, αE, αF, Linker 2, β2, β3, α2, β4, α3, β5, αG, α4, β6, α5.<sup>[17,133,134,154]</sup> Im Folgenden wird das *Common Ga Numbering* (CGN) System nach Flock et al.<sup>[155]</sup> im D.S.P.-Format (D: Domäne, mit G: GTPase-Domäne, H: helikale Domäne; S: Sekundärstrukturelement (SSE), mit S: β-Faltblatt,



H: Helix; P: Position im SSE, Loops in Kleinbuchstaben der benachbarten SSE) verwendet, um die Aminosäurepositionen in der  $\alpha$ -Untereinheit zu beschreiben und einen besseren Vergleich zwischen den Subfamilien/-typen zu erreichen.<sup>[17,155]</sup> Die Nummerierung der Reste bezieht sich in diesem Kapitel auf die ersten beiden Gat-Kristallstrukturen.<sup>[133,134]</sup>

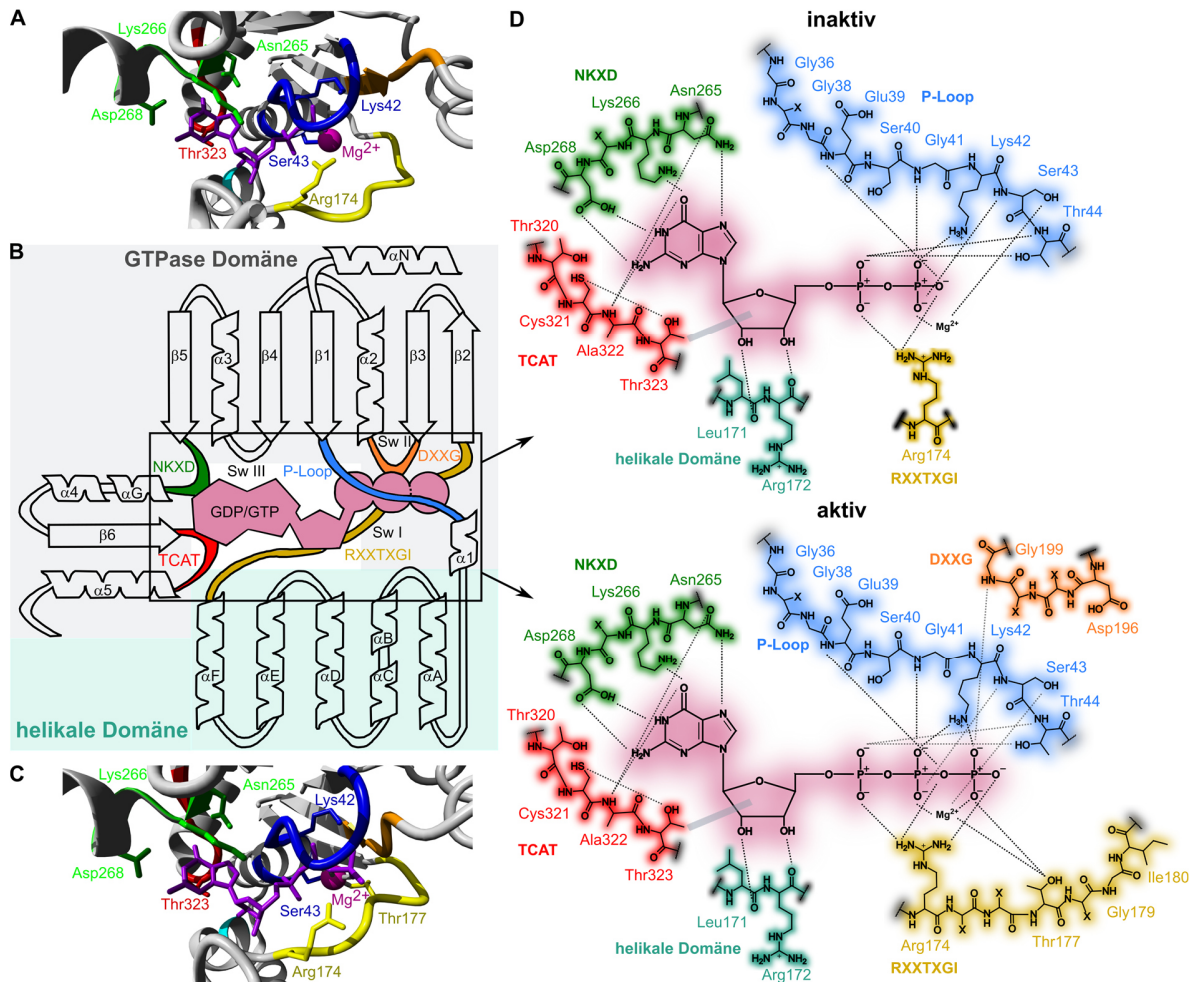


Abbildung 7:  $G\alpha$ -Kontakte zu gebundenen Nucleotiden. Dargestellt sind die Gat-Kristallstrukturen (GDP-gebunden: PDB: 1TAG<sup>[134]</sup> (A), GTP $\gamma$ S-gebunden: PDB: 1TND<sup>[133]</sup> (C), Nucleotide in violett), die Domänenanordnung<sup>[156]</sup> der  $G\alpha$ -Proteine (B) und die Kontakte der Nucleotide (D) zum P-Loop (blau), RXXTXGI (gelb), DXXG (orange), NKXD (grün), TCAT (rot) und zur helikalen Domäne (cyan). Gepunktete Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen und graue Balken van-der-Waals-Wechselwirkungen an. Die Reste sind entsprechend der Gat-Kristallstrukturen benannt. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

Die Beschaffenheit der Nucleotidbindungstasche ist bedeutend für die Struktur der  $G\alpha$ -Untereinheit, da das gebundene Guaninnucleotid den Aktivitätsstatus der  $G\alpha$ -Untereinheit bestimmt.<sup>[17]</sup> Die Nucleosidkontakte werden durch Wechselwirkungen zu beiden Domänen und die Phosphatkontakte primär durch die GTPase-Domäne und den Linker 1 vermittelt (Abbildung 7).<sup>[134,139]</sup> Insgesamt gibt es fünf konservierte Motive, die für die Bindung des Guaninnucleotids entscheidend sind. Das NKXD<sup>G.S5.7-G.HG.2</sup>-Motiv und das TCA(T/V)DT<sup>G.s6h5.1-G.H5.1</sup>-Motiv (auch TCAT-Motiv) sind wichtig für die Bindung der Guaninbase, der P-Loop (GXGESGKST<sup>G.s1h1.1-G.H1.3</sup>) etabliert die Phosphatbindung, und das RXXTXGI<sup>G.hfs2.2-G.S2.1</sup>- sowie das DXXG<sup>G.S3.7-G.s3h2.2</sup>-Motiv sind bedeutend für die Mg<sup>2+</sup>-Bindung.<sup>[17,23,109,154,157]</sup> Das Mg<sup>2+</sup>-Ion wird in der Bindungstasche

oktaedrisch koordiniert und ist im inaktiven Zustand durch vier Wassermoleküle, dem  $\beta$ -Phosphat und dem Ser43<sup>G.H1.2</sup> (P-Loop) stabilisiert.<sup>[133,134,158]</sup>

Durch die GPCR-vermittelten Konformationsänderungen im G-Protein während der Aktivierung werden die GDP-Bindungskontakte und die Kontakte zwischen den beiden Domänen geschwächt (v.a. TCAT-Motiv- und P-Loop-Kontakte), was insgesamt die GDP-Dissoziation bewirkt.<sup>[2,159–161]</sup> Innerhalb der *empty pocket*-Konformation besitzen die helikale Domäne und der  $\beta 6$ - $\alpha 5$ -Loop eine erhöhte Dynamik, wodurch eine schnelle GTP-Bindung als Folge der signifikant höheren intrazellulären GTP-Konzentration ermöglicht wird.<sup>[111,161,162]</sup> Die GTP-Bindung führt zu einer rigideren Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit, in der das  $Mg^{2+}$ -Ion und das GTP tief in der Bindungstasche verborgen sind.<sup>[133,134]</sup> Dies wird durch eine Serie an Umlagerungen rund um das  $\gamma$ -Phosphat in drei Regionen (vorwiegend in der GTPase-Domäne) verursacht, welche als Switch I (Linker 1 und Beginn  $\beta 2$ ), Switch II (C-Terminus  $\beta 3$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 2$ - $\beta 4$ -Loop) und Switch III ( $\beta 4$ - $\alpha 3$ -Loop) bezeichnet werden (Abbildung 8).<sup>[133,134,154]</sup> Switch I bewegt sich in Richtung der  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle, wobei Thr177<sup>G.hfs2.5</sup> und Arg174<sup>G.hfs2.2</sup> (beide RXXTXGI-Motiv) das  $\gamma$ -Phosphat stabilisieren. Zudem werden zwei Wasserliganden am  $Mg^{2+}$ -Ion durch die Koordination des  $\gamma$ -Phosphats und Thr177<sup>G.hfs2.5</sup> ersetzt.<sup>[133,134,139]</sup> Die strukturellen Änderungen innerhalb von Switch II (v.a.  $\alpha 2$ -Helix) werden durch die Gly199<sup>G.s3h2.2</sup>-Stabilisierung des  $\gamma$ -Phosphats initiiert. Zwischen Switch I und Switch II bildet sich infolgedessen ein Wasserstoffbrückennetzwerk aus.<sup>[133,134]</sup> Switch III reagiert auf die Konformationsänderungen innerhalb von Switch II und bildet mit der Switch II-Region polare Kontakte aus, wobei die aktive Switch III-Konformation zusätzlich durch Interaktionen mit der helikalen Domäne stabilisiert wird. Insgesamt führt die GTP-induzierte Konformationsänderung zur Destabilisierung des Heterotrimeres und zur Separation von  $\alpha$  und  $\beta\gamma$ .<sup>[17,133,134,139,158]</sup>

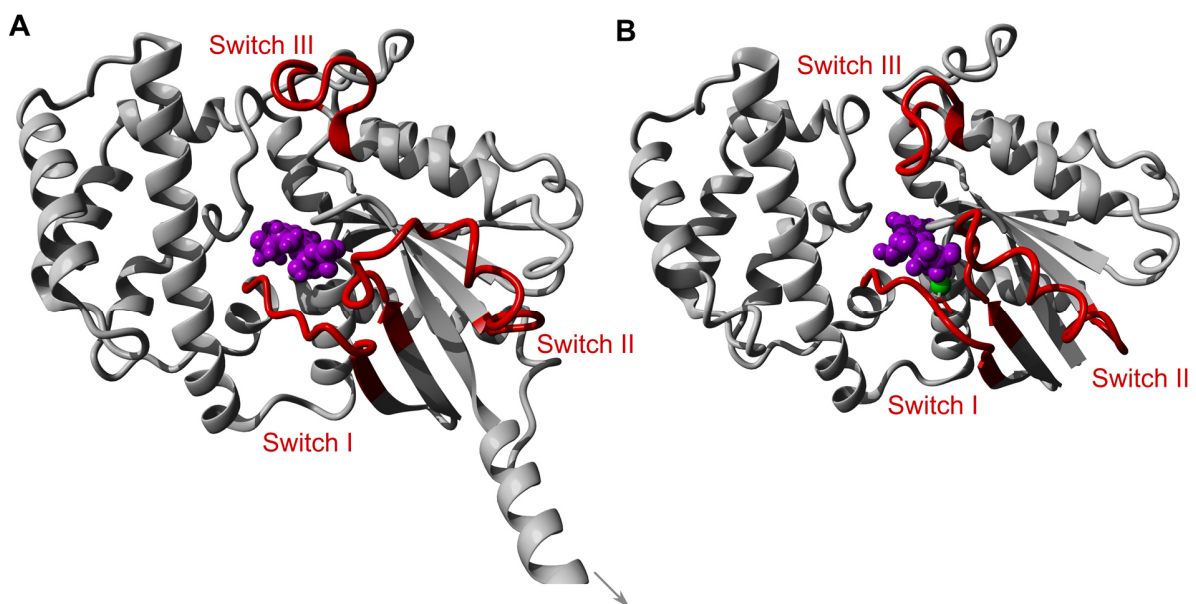


Abbildung 8: Switch-Regionen der  $\alpha$ -Proteine. Die Switch-Regionen (rot) sind für das inaktive, GDP-gebundene (violett) Gai1-Homologiemodell (aus 3UMS<sup>[135]</sup> und 5JS8<sup>[136]</sup>, Kapitel 4.13.1)<sup>[137]</sup> in **A** und für das aktive, GTP $\gamma$ S-gebundene (violett) Gai1 (PDB: 1GIA<sup>[138]</sup>) in **B** dargestellt. In **A** ist  $\alpha N$  zur Übersichtlichkeit verkürzt dargestellt. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

Innerhalb des GTPase-Mechanismus spielen Arg174<sup>G.hfs2.2</sup> ("Arginin Finger", Switch I, RXXTXGI-Motiv), für die Stabilisierung des pentavalenten Übergangszustand, und Gln200<sup>G.s3h2.3</sup> (Switch II), für die Stabilisierung des  $\gamma$ -Phosphats und die Interaktion mit dem nukleophil agierenden Wasser, eine wichtige Rolle.<sup>[17,139,158]</sup> Wie in Kapitel 2.3.2 noch näher erläutert wird, sind die beiden Reste unabdingbar für den G-Protein-vermittelten Signalweg, da Mutationen dieser Reste in zahlreichen Tumoren beobachtet werden konnten.<sup>[139,157,163,164]</sup> Nach der erfolgten GTP-Hydrolyse kommt es vor allem in Switch II zu strukturellen Änderungen, die die Phosphatdissoziation ermöglichen. Die Phosphatdissoziation verändert die Struktur von Switch I und Switch II, wobei vor allem die Konformationsänderungen in Switch II die Affinität zu den nachgeschalteten Effektoren senkt und die  $G\beta\gamma$ -Bindung fördert.<sup>[158,163]</sup> Durch die  $G\beta\gamma$ -Bindung wird Switch II wiederum strukturell verändert, sodass im Heterotrimer Switch I und Switch II GDP in der Nukleotidbindungstasche stabilisieren.<sup>[158,163]</sup>

Die Membranassoziation der  $G\alpha$ -Untereinheit wird über posttranslationale Modifikationen gesteuert, die außerdem einen entscheidenden Einfluss auf die PPIs nehmen können.<sup>[23,25]</sup> Alle  $G\alpha$ -Untereinheiten, außer  $G\alpha_t$ , sind mit Palmitat posttranslational modifiziert. Dieses ist reversibel an Cysteinreste nahe des N-Terminus über eine Thioesterbindung gebunden (Regulation über Acyltransferasen oder Thioesterasen).<sup>[23]</sup> Bei der  $G\alpha_i$ -Subfamilie kommt zudem noch eine irreversible Myristoylierung an einem N-terminalen Glycinrest hinzu. Die Myristoylierung kann einen entscheidenden Einfluss auf die Effektorinteraktion haben und ist Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung auf die AC.<sup>[23,165]</sup>

Das  $G\beta\gamma$ -Dimer kann nur unter denaturierenden Bedingungen in die beiden Polypeptidketten  $G\beta$  und  $G\gamma$  getrennt werden.<sup>[103,166,167]</sup> Auch hier lieferten Kristallstrukturen die ersten Einblicke in die Struktur des  $G\beta\gamma$ -Dimers (Abbildung 9).<sup>[141,142,168]</sup> Die  $G\beta$ -Untereinheit besteht aus zwei strukturell unterschiedlichen Regionen, einer N-terminalen  $\alpha$ -Helix und einer siebenblättrigen Propellerstruktur, die aus sieben WD40-Sequenzwiederholungen mit vier verdrehten  $\beta$ -Faltblättern pro Propellerblatt besteht. Die  $G\gamma$ -Untereinheit besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices. Die N-terminale  $\alpha$ -Helix interagiert über Coiled-Coil-Interaktionen mit der N-terminalen  $\alpha$ -Helix von  $G\beta$  und die C-terminale Helix wechselwirkt mit der  $G\beta$ -Propellerstruktur.<sup>[141,142,166,168]</sup> Die Membranassoziation des  $G\beta\gamma$ -Dimers wird über die Prenylierung des C-Terminus der  $G\gamma$ -Untereinheit gesteuert.<sup>[103,141,142,168]</sup>

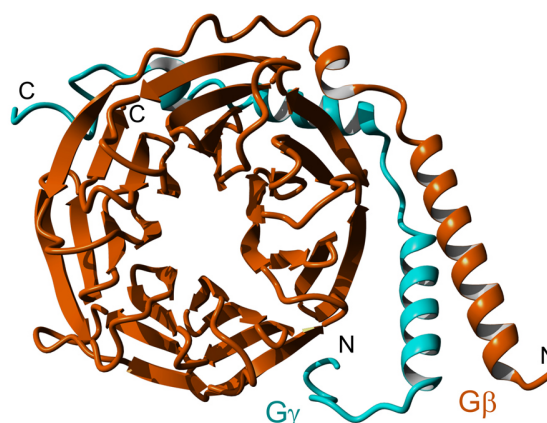


Abbildung 9: Kristallstruktur eines  $G\beta\gamma$ -Dimers (PDB: 1TGB<sup>[168]</sup>). Die  $G\beta$ -Untereinheit ist in Orange und die  $G\gamma$ -Untereinheit in Cyan dargestellt.

## 2.3 Adressierung der Gai/s-Untereinheit

Mit zunehmendem Kenntnisstand über G-Proteine und G-Protein-vermittelte Signalweiterleitungswege rücken diese immer mehr in den Fokus der pharmakologischen Forschung. Die Bedeutung der GPCR/G-Protein-vermittelten Signalweiterleitung zeigt sich daran, dass über 30% der zugelassenen Arzneimittel GPCRs adressieren.<sup>[4–6]</sup> Im Gegensatz dazu, ist für die G $\alpha$ -Untereinheit noch keine Verbindung zugelassen oder in vorklinischer Testung.<sup>[14]</sup> Ein Grund für den Erfolg GPCRs gegenüber G-Proteine zu adressieren, sind die leicht zugänglichen, extrazellulären GPCR-Bindungsstellen an der Zelloberfläche.<sup>[4,18,19]</sup> G-Proteine hingegen sind durch ihre intrazelluläre Lokalisation schwerer zugänglich und besitzen keine extrazellulären Bindungsseiten.<sup>[17,20]</sup> Dennoch kann es in einigen pathophysiologischen Situationen attraktiv sein, G $\alpha$ -Proteine zu adressieren (Kapitel 2.3.2). Dies betrifft Fälle, in denen eine Vielzahl von GPCRs in komplexen Krankheitsbildern, wie z.B. innerhalb chronisch inflammatorischer Erkrankungen, beteiligt sind. Diese Situationen machen eine gleichzeitige Adressierung aller beteiligter GPCRs unattraktiv.<sup>[14–17]</sup> Zudem können randomisierte Mutationen von GPCRs in Tumorerkrankungen die Entwicklung von Arzneimitteln gegen jede dieser Mutationen erschweren.<sup>[7–9,13,169,170]</sup> Neben der direkten Fehlfunktion der Rezeptoraktivität, kann die Krankheitsentstehung auch erst dem Rezeptor nachgeschaltet, nämlich auf dem G-Proteinlevel, initiiert werden (Kapitel 2.3.2).<sup>[14,15,169–172]</sup> Ein weiterer Aspekt, der bei der Adressierung von GPCRs beachtet werden muss, ist, dass GPCRs an verschiedene heterotrimere G-Proteine koppeln können, wie beispielsweise der Thyrotropinrezeptor an alle G $\alpha$ -Subfamilien<sup>[173]</sup>. Zudem können GPCRs auch mit  $\beta$ -Arrestin interagieren, wie beispielsweise der  $\mu$ -Opioidrezeptor<sup>[174]</sup>, weshalb die Adressierung des entsprechenden GPCRs sich nicht nur auf eine G-Protein-vermittelte Signaltransduktion, sondern auf eine Vielzahl nachgeschalteter Signalwege auswirken kann.<sup>[14]</sup>

Neben der medizinischen Adressierung von G-Proteinen sind diese auch als Zielstruktur aufgrund der zahlreichen regulierten zellulären Prozesse innerhalb der G-Protein-vermittelten Signalweiterleitung relevant. Dabei ist eines der Ziele, Methoden oder chemische Werkzeuge zu entwickeln, um weitere Einblicke in die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion und deren mechanistischen Abläufe, Effektoren, die Vernetzung verschiedener Signalwege und die Wechselwirkungen mit Hilfsproteinen zu erhalten. Die oben genannten Gründe verdeutlichen, dass G-Proteine bedeutende pharmakologische Zielstrukturen darstellen, die bisher nicht ausreichend von chemischen Werkzeugen (außer die G $\alpha$ q-Subfamilie) oder Arzneimitteln adressiert werden können.<sup>[17]</sup> Die gezielte Adressierung der Gai/s-Untereinheit wurde in der vorliegenden Arbeit thematisiert.

### 2.3.1 Interaktionsflächen der Gai/s-Untereinheit

Die Kenntnis über die G $\alpha$ -Kontaktflächen ist entscheidend für das Design von spezifischen G $\alpha$ -Proteinmodulatoren und somit für die Unterbrechung von kritischen PPIs.<sup>[17]</sup> Neben den bereits beschriebenen strukturellen Aspekten der Nukleotidbindungstasche und der posttranslationalen Modifikationen besitzt die G $\alpha$ -Untereinheit verschiedene Interaktionsflächen (Abbildung 10), die für die Wechselwirkung mit dem GPCR (Kapitel 2.3.1.1), dem G $\beta\gamma$ -Dimer (Kapitel 2.3.1.2), den Effektoren (Kapitel 2.3.1.3) und den Hilfsproteinen (Kapitel 2.3.1.4) bedeutend sind.<sup>[17,21]</sup> Deren strukturelle Beschreibung wurde bereits in einem Übersichtsartikel veröffentlicht und wird in den folgenden Unterkapiteln erläutert.<sup>[17]</sup>



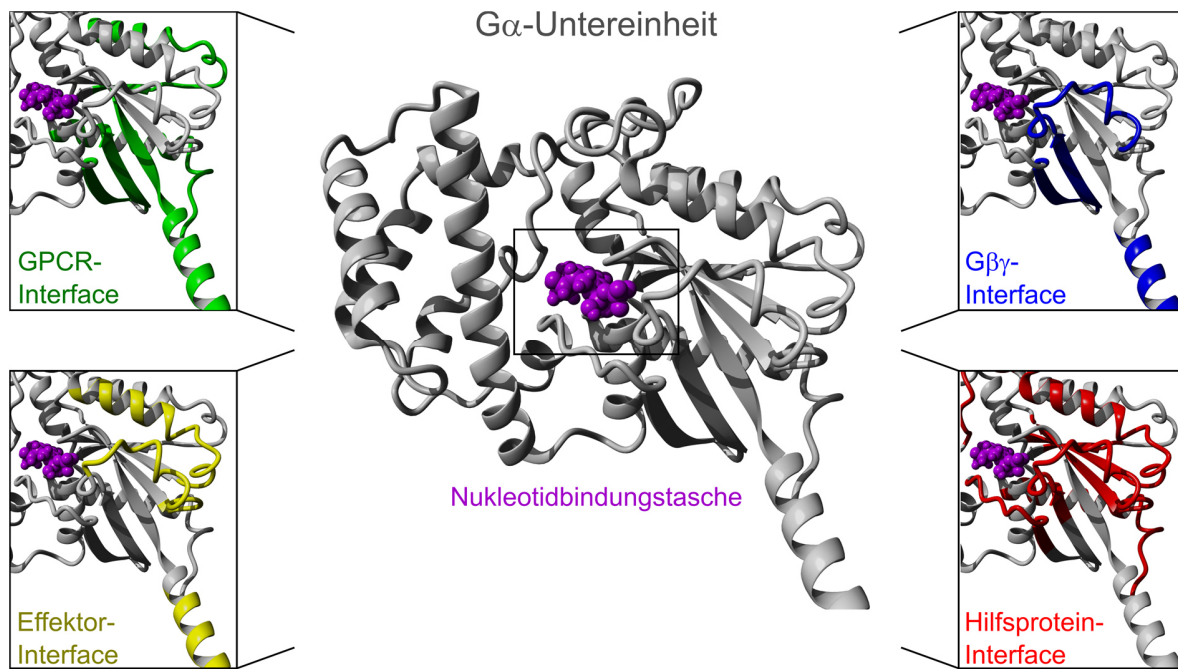


Abbildung 10: Strukturelle Merkmale von  $G\alpha$ -Proteinen. Gezeigt sind die Interaktionsflächen zu den GPCRs (grün),  $G\beta\gamma$  (blau), Effektoren (gelb) und Hilfsproteinen (rot, häufigste Bereiche dargestellt) im GDP-gebundenen (violett)  $G\alpha 1$ -Homologiemodell (aus 3UMS<sup>[135]</sup> und 5JS8<sup>[136]</sup>, Kapitel 4.13.1)<sup>[137]</sup>. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

### 2.3.1.1 $G\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche

Die  $G\alpha$ -GPCR-Kontaktfläche ist entscheidend für die Initialisierung der intrazellulären Signalweiterleitung. Da die Nukleotidbindungstasche ca. 30 Å von dieser Interaktionsfläche entfernt ist, wird die GDP-Dissoziation durch allosterische Konformationsänderungen eingeleitet.<sup>[17,25,161]</sup> GPCRs werden entweder auf funktioneller Basis<sup>[175,176]</sup> oder aufgrund phylogenetischer Analysen<sup>[177]</sup> klassifiziert.<sup>[22,178]</sup> Strukturell sind diese aus sieben Transmembranhelices (TM1-7) mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus aufgebaut, wobei die TMs durch drei intrazelluläre Loops (ICL1-3) und drei extrazelluläre Loops (ECL1-3) verbunden sind (Abbildung 11). Aufgrund der membrandurchspannenden Anordnung ist die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle strukturell mit der intrazellulären G-Proteinbindungsstelle verknüpft.<sup>[2,22,110,179]</sup> Die Ligandenbindung bewirkt Konformationsänderungen in den TMs des GPCRs, wodurch die zytoplasmatische Bindungsstelle für das G-Protein zugänglich wird.<sup>[2]</sup> Die Interaktionen von GPCR und G-Protein werden vorwiegend über die  $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt. Der  $G\alpha$ -C-Terminus, im Speziellen die 11 C-terminalen Aminosäuren („wavy hook“), und die  $\alpha 5$ -Helix (~18 Reste<sup>[133]</sup>), besetzen die entstandene Bindungstasche am GPCR. Eine große Kontaktfläche wird dabei zwischen TM3, TM5, ICL3, TM6 und TM7 und  $\alpha 4$ , dem  $\alpha 4$ - $\beta 6$ -Loop,  $\beta 6$ , und  $\alpha 5$  gebildet, eine weniger große Kontaktfläche wird zwischen ICL2 und  $\alpha N$ , dem  $\alpha N$ - $\beta 1$ -Loop,  $\beta 1$ , dem  $\beta 2$ - $\beta 3$ -Loop und  $\alpha 5$  etabliert. Zudem können der  $\alpha 3$ - $\beta 5$ -Loop,  $\alpha 2$  und der  $\alpha 2$ - $\beta 4$ -Loop an der GPCR-Interaktion beteiligt sein.<sup>[1,2,17,22,110,150,162,179–185]</sup> Die Selektivität der GPCR-G-Protein-Kopplung wird vor allem durch die Sequenz und damit die Struktur der  $\alpha 5$ -Helix vermittelt. Es wird jedoch auch eine Rolle des N-Terminus, des  $\alpha N$ - $\beta 1$ -Loop, der  $\alpha 4$ - $\beta 6$ -Region, und der  $\alpha 4$ -Helix aufgrund von

spezifitätsbestimmenden Resten in diesen Regionen beschrieben.<sup>[22,110,143,179–181,185–187]</sup> Von Seiten des GPCRs sind vor allem die TM6, ICL2 und ICL3 für die Kopplungsselektivität entscheidend.<sup>[22,179–181]</sup> Insgesamt spielen in dieser Kontaktfläche die N- und C-terminalen Regionen der  $G\alpha$ -Untereinheit eine bedeutende Rolle.<sup>[17]</sup>

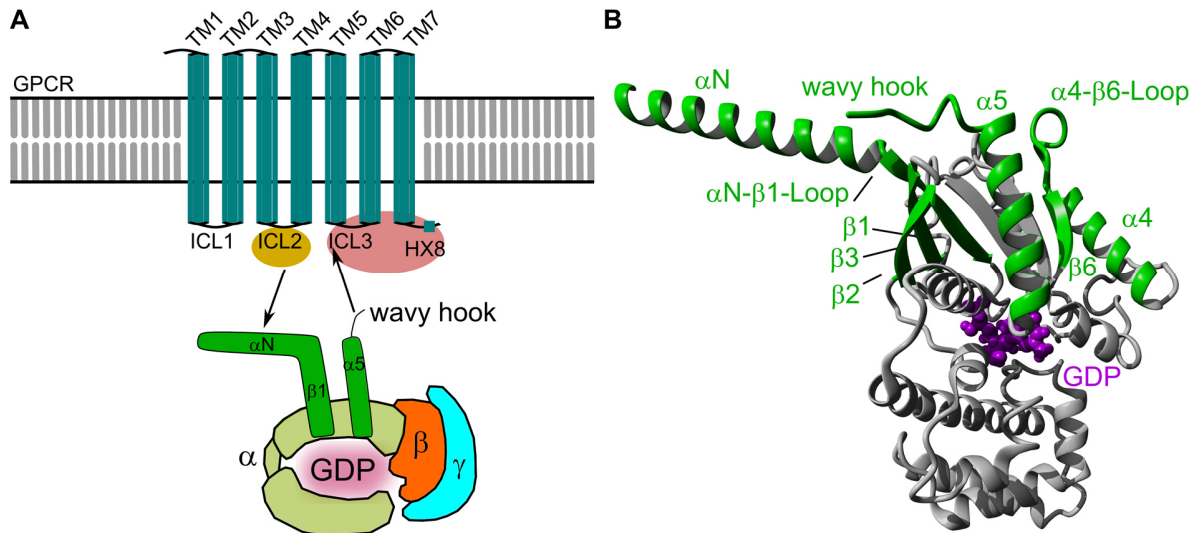


Abbildung 11:  $G\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche. **A:** Wechselwirkungen der  $G\alpha$ -Untereinheit mit dem GPCR. Die primäre Interaktion findet zwischen der  $\alpha 5$ -Helix und dem „wavy hook“ der  $G\alpha$ -Untereinheit und dem intrazellulären Kern des GPCRs statt. Die zweite Interaktionsfläche wird zwischen der  $\alpha N/\beta 1$ -Region der  $G\alpha$ -Untereinheit und dem ICL2 des GPCRs gebildet. **B:**  $Gai1$ -Homologiemodell (aus 3UMS<sup>[135]</sup> und 5JS8<sup>[136]</sup>, Kapitel 4.13.1)<sup>[137]</sup> in der Orientierung des G-Proteins in **A**. GPCR-Kontaktregionen sind grün eingefärbt. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

### 2.3.1.2 $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ -Interaktionsfläche

Die Kontakte zwischen der  $G\alpha$ -Untereinheit und dem  $G\beta\gamma$ -Dimer werden vor allem über zwei Regionen etabliert (Abbildung 12).<sup>[141,142]</sup> Die größere Interaktionsfläche wird zwischen der  $G\beta$ -Propelleroberfläche und einer hydrophoben Tasche aus Switch I und Switch II gebildet, welche zusätzlich durch hydrophile und ionische Interaktionen stabilisiert wird. Die GTP-induzierten Konformationsänderungen in der  $G\alpha$ -Untereinheit bewirken die Dissoziation des Heterotrimer aufgrund der reduzierten Kontakte in dieser Interaktionsfläche.<sup>[17,21,141,142,188]</sup> Die zweite Kontaktfläche befindet sich zwischen dem Blatt 1 des  $G\beta$ -Propellers und dem N-Terminus der  $G\alpha$ -Untereinheit, was die Ausbildung der  $\alpha N$ -Helix bewirkt.<sup>[17,21,141,142,166,188,189]</sup> Im Falle der Myristoylierung des N-Terminus weist diese Region bereits eine  $\alpha$ -helikale Struktur auf, weshalb die Affinität zum  $G\beta\gamma$ -Dimer erhöht ist.<sup>[166,190]</sup> Es gibt keine strukturellen Indizien für die Interaktion von  $G\alpha$  und  $G\gamma$ .<sup>[17,21,142,166,188,189]</sup>

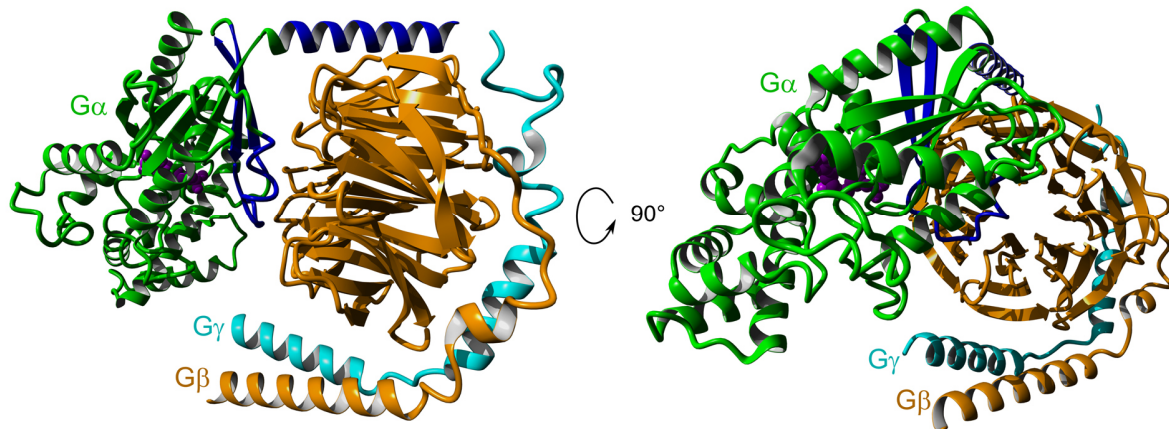


Abbildung 12: G $\alpha$ -G $\beta\gamma$ -Interaktionsfläche. Kristallstruktur der Gat/i $\beta\gamma$ -Chimera (PDB: 1GOT<sup>[141]</sup>) in verschiedenen Orientierungen mit G $\alpha$  (grün), G $\beta$  (orange) und G $\gamma$  (cyan). Wichtige G $\beta\gamma$ -Wechselwirkungsbereiche sind blau markiert (G $\alpha$ , z.B.  $\alpha$ N,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 3 $\alpha$ 2,  $\alpha$ 2). Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

### 2.3.1.3 G $\alpha$ -Effektor-Interaktionsfläche

Für die Analyse der G $\alpha$ -Effektor-Interaktionen wurden in der Vergangenheit verschiedene Kristallstrukturexperimente mit Vertretern aller Subfamilien durchgeführt.<sup>[23,24,132,145,151,191,192]</sup> Es zeigte sich, dass die Effektoren hydrophobe Seitenketten in eine Tasche zwischen der Switch II  $\alpha$ 2-Helix und der  $\alpha$ 3-Helix insertieren. Die Effektorspezifität wird vor allem durch den  $\alpha$ 3- $\beta$ 5-Loop vermittelt, aber auch durch die C-Termini von  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 sowie dem  $\alpha$ 2- $\beta$ 4-Loop.<sup>[17,23,24,132,145,151,191,192]</sup> Die G $\alpha$ -Kontaktflächen der Effektoren und des G $\beta\gamma$ -Dimers überlappen größtenteils, weshalb die Reassoziierung mit dem G $\beta\gamma$ -Dimer die Signalweiterleitung an die Effektoren terminiert.<sup>[17,23]</sup>

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich besonders mit der Adenylatzyklase (AC), die aus einem zytosolischen N-Terminus, zwei Transmembrandomänen und zwei zytosolischen Domänen in alternierender Reihenfolge (C1a-b und C2a-b) aufgebaut ist (Abbildung 13). Die a-Untereinheiten der zytosolischen Domänen sind entscheidend für den Katalysemechanismus und bilden das aktive Zentrum.<sup>[140,151,193]</sup> Es wird angenommen, dass Gas und Gai auf gegenüberliegenden Seiten an die AC binden und daher ihre Bindung nicht kompetitiv ist. Die Gas-AC-Kontaktfläche wird dabei zwischen C1 und größtenteils C2 und dem Switch II ( $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 2- $\beta$ 4-Loop),  $\alpha$ 3 und dem  $\alpha$ 3- $\beta$ 5-Loop gebildet (Abbildung 13B), wohingegen die Gai-AC-Kontaktfläche vor allem zwischen C1 und Switch I-III (vor allem Switch II) sowie  $\alpha$ B vermutet wird.<sup>[17,21,129,140,151,192,194,195]</sup> Zudem spielt der N-Terminus eine entscheidende Rolle für die Effektorbindung. Innerhalb der Gas-Subfamilie ist keine posttranslationale Modifikation für die Effektorbindung erforderlich, wohingegen die Myristoylierung der Gai-Mitglieder Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung auf die AC ist.<sup>[17,23,130,165,193,196]</sup>

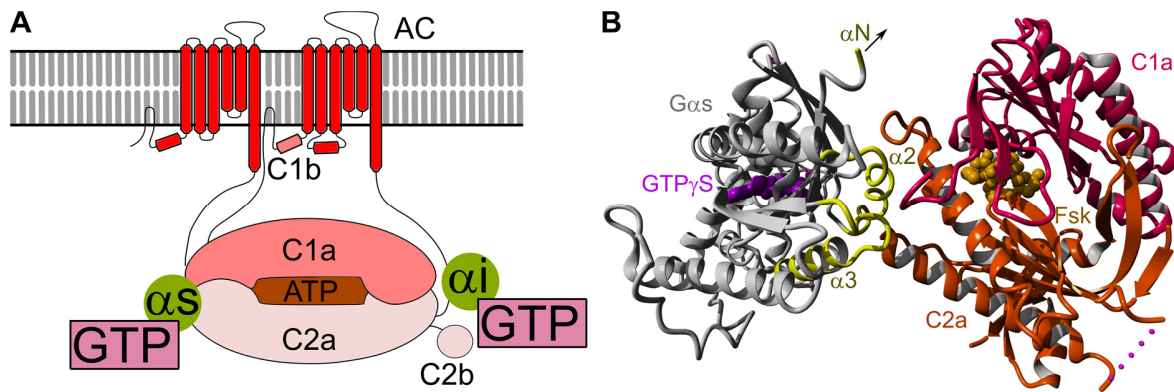


Abbildung 13: G $\alpha$ -AC-Interaktionsfläche. **A:** Wechselwirkungen von G $\alpha$ /i (grün) mit der Adenylatzyklase (AC, katalytische Domänen (C1a-b, C2a-b), rot), abgeleitet von Tang et al.<sup>[129]</sup> und Qi et al.<sup>[192]</sup>. **B:** Kristallstruktur (PDB: 1AZS<sup>[151]</sup>) von G $\alpha$ s (grau, GTP $\gamma$ S (violett)) im Komplex mit den katalytischen Domänen der AC (C1a: rot, C2a: orange, Methylpiperazinoforskolin (Fsk): beige). Die G $\alpha$ s-Effektor-Kontaktfläche ist gelb eingefärbt ( $\alpha$ 2,  $\alpha$ 2- $\beta$ 4,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 3- $\beta$ 5). Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

### 2.3.1.4 G $\alpha$ -Hilfsproteine-Interaktionsfläche

Hilfsproteine, im Speziellen AGS und RGS, können auf unterschiedliche Weise (GDI, GEF, GEM, GAP) die G $\alpha$ -Aktivität durch Interaktionen mit der G $\alpha$ -Untereinheit beeinflussen (Kapitel 2.2.1).<sup>[17,116,119,127,128]</sup> Im Folgenden werden die strukturellen Aspekte von GDIs, GEFs, GEMs und GAPs beschrieben.

**GDIs** besitzen zwischen einem und vier G-Protein-regulierenden Motive (GPR: TMGEEDFFDLLAKSQSKRMDDQRVDLAG<sup>[122,123,197]</sup>, oder GoLoco-Motiv genannt: XX $\Phi$ FX $\Omega$ X[+]XQ $\pi$ XR $\Omega$ XXQR<sup>[124,198]</sup> ( $\Phi$ : hydrophobe,  $\Omega$ : aromatische,  $\pi$ : kleine und X: jede proteinogene Aminosäure, Symbole nach Aasland et al.<sup>[199]</sup>)), die an die G $\alpha$ -Untereinheit binden und den GDP-gebundenen Zustand stabilisieren können (Abbildung 14B).<sup>[128,146]</sup> Dies hat die Inhibition des Nukleotidaustauschs und somit der G-Proteinaktivierung zur Folge.<sup>[146]</sup> Die G $\alpha$ -Kontaktfläche von GDIs kann mit der des G $\beta\gamma$ -Dimers überlagern. Dadurch kann die Assoziation von G $\alpha$  und G $\beta\gamma$  verhindert und die G $\beta\gamma$ -vermittelte Signalweiterleitung verlängert werden.<sup>[128,146]</sup> Die Bindung des GPR-Motivs erfolgt an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region, wobei die Triade aus Asp/Glu-Gln-Arg mit der Nukleotidbindungstasche, GDP und den RXXTXGI-Motiv interagiert, sowie strukturelle Änderungen in allen drei Switch-Regionen verursacht. Der C-terminale Teil des GPR-Motivs bindet entlang der Region zwischen helikaler und GTPase-Domäne, wodurch vermutlich die Interdomänenbewegungen eingeschränkt wird.<sup>[146,200]</sup> Letzteres ist zusammen mit den etablierten Nukleotidkontakten vermutlich der Grund für die Verhinderung der GDP-Dissoziation. Die Kontakte mit der helikalen Domäne werden als entscheidend für die G $\alpha$ i-Selektivität beschrieben.<sup>[118,128,146,198,201–203]</sup>

*Resistance to inhibitors of cholinesterase 8* (Ric8)-Proteine (Ric8A: G $\alpha$ i/q/12/13-spezifisch; Ric8B: G $\alpha$ s-spezifisch) agieren als Chaperone für die nukleotidfreie G $\alpha$ -Untereinheit und können durch partielles Entfalten als **GEFs** agieren (Abbildung 14A).<sup>[125,204]</sup> Diese Proteine binden bevorzugt an die GDP-gebundene G $\alpha$ -Untereinheit, induzieren die Dissoziation des GDPs und stabilisieren die nukleotidfreie Konformation.<sup>[116,205–207]</sup> Die G $\alpha$ -Kontaktfläche ist ähnlich der bei GPCRs die  $\alpha$ 5-Helix und  $\beta$ 4-6, sowie die Switch II/ $\alpha$ 3-Region. Die Interaktion mit der GPCR-ähnlichen



Kontaktfläche führt zur GDP-Dissoziation und ist entscheidend für die Ric8-Selektivität. Die Wechselwirkung mit Switch II ist verknüpft mit Strukturänderungen in Switch I, welche zusammen vermutlich die GTP-Bindung und Ric8-Dissoziation fördern.<sup>[17,147,205,207,208]</sup>

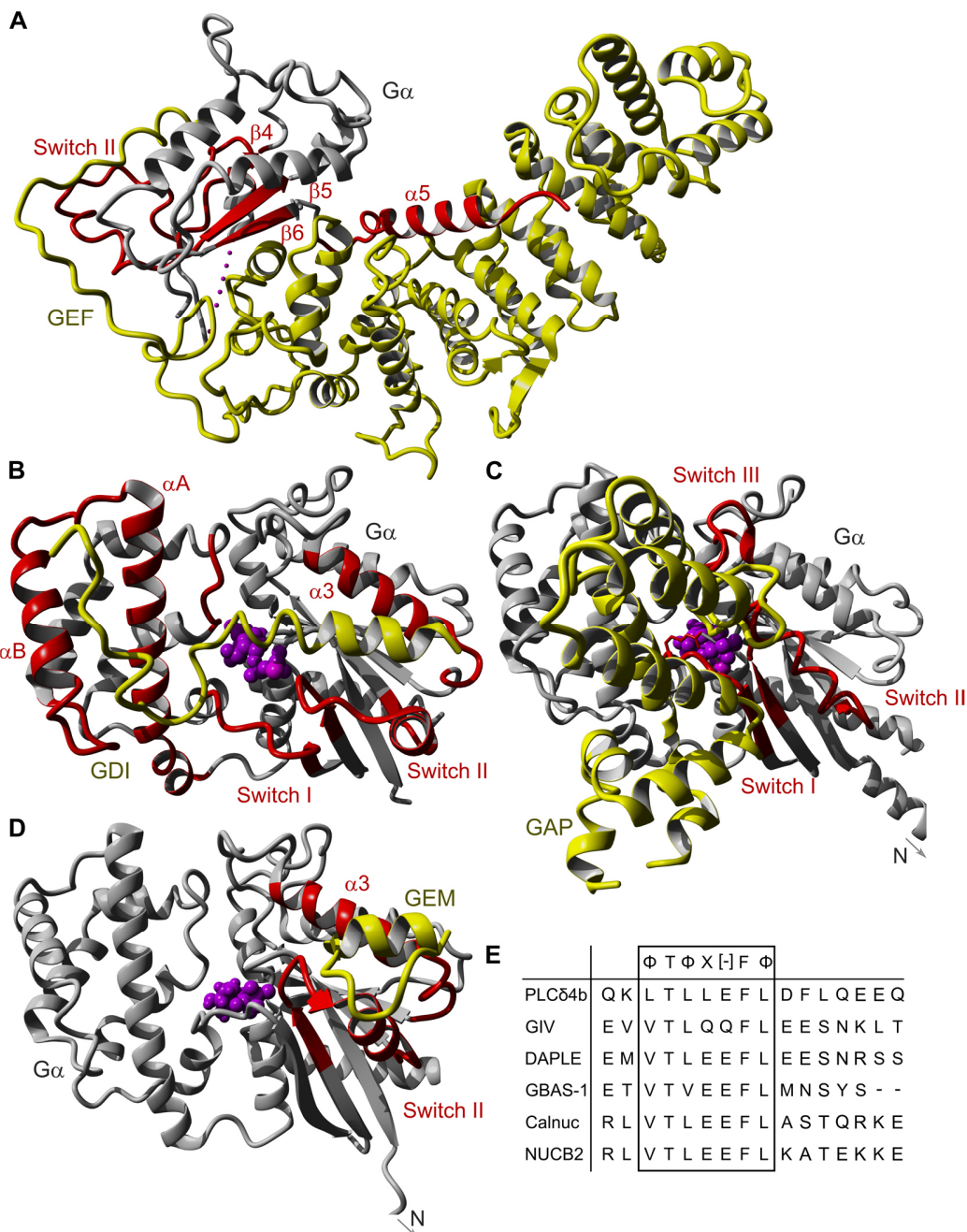


Abbildung 14:  $G\alpha$ -Hilfsprotein-Interaktionsfläche. Kristallstrukturen der Komplexe von  $G\alpha$  (grau) mit Hilfsproteinen (gelb), die als GEF (**A**, PDB: 6VU8<sup>[147]</sup>), GDI (**B**, PDB: 1KJY<sup>[146]</sup>), GAP (**C**, PDB: 1AGR<sup>[149]</sup>) oder GEM (**D**, PDB: 6MHF<sup>[148]</sup>) agieren.  $G\alpha$ -Kontaktflächen zu den Hilfsproteinen sind in Rot dargestellt. **E**: Sequenzalignment der GEM-Motive von GIV<sup>[126]</sup>, DAPLE<sup>[209]</sup>, Calnuc und NUCB2<sup>[210]</sup>, PLCδ4b<sup>[211]</sup>, sowie GBAS-1<sup>[212]</sup>. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

Im Jahre 2016 wurde das erste Mal eine **GEM**-Aktivität im Kontext des Proteins GIV (*Gα-interacting, vesicle-associated protein*) beschrieben, das als GDI für Gas und als GEF für Gai wirkt.<sup>[126,127]</sup> Anschließend wurden weitere Proteine identifiziert (Abbildung 14E), die alle ein GEM-Motiv (~30 Aminosäuren, Kernkonsensus  $\Phi T \Phi X [D/E] F \Phi$ <sup>[210,213]</sup> mit  $\Phi$ : hydrophobe, X: jede proteinogene Aminosäure, früher als GBA (*Gα*-bindendes und -aktivierendes)-Motiv bezeichnet) besitzen.<sup>[127,209–214]</sup> Das GEM-Motiv bindet bevorzugt an die GDP-gebundene oder nukleotidfreie Konformation der *Gα*-Untereinheit.<sup>[148,156]</sup> Strukturelle Einblicke in den Wirkungsmechanismus der GEMs gab es bisher nur für die GEF-Aktivität von GIV gegenüber Gai3 (Abbildung 14D).<sup>[148]</sup> Dabei bindet das GEM-Motiv an die Switch II/ $\alpha 3$ -Region und induziert Konformationsänderungen in Switch I und dem RXXTXGI-Motiv sowie  $\beta 1$  und dem P-Loop.<sup>[148,156]</sup> Die veränderten Nukleotidkontakte führen, vermutlich gemeinsam mit einer induzierten Domänen-separation, zur GDP-Dissoziation. Die Bindungsseite des GEM-Motivs überlappt partiell mit dem der GDIs.<sup>[148,156]</sup>

**GAPs** interagieren mit der GTP-gebundenen *Gα*-Untereinheit und beschleunigen die GTP-Hydrolyse durch die Stabilisation des Übergangszustandes (Abbildung 14C).<sup>[149]</sup> Strukturell ist die RGS-Domäne (ca. 120 Aminosäuren) für die Interaktion und die funktionelle Aktivität der RGS-Proteine verantwortlich.<sup>[118,128,149,215]</sup> GAPs interagieren und orientieren Reste, die entscheidend für die GTP-Hydrolyse sind. Darunter fallen Gln204<sup>G.s3h2.3</sup> (Gai1, Switch II), was in die Position für die Stabilisierung des  $\gamma$ -Phosphats und des nukleophilen Wassers gebracht wird, sowie Thr182<sup>G.hfs2.6</sup> (Gai1, Switch I), welches über verschiedene Interaktionen die korrekte Orientierung der Switch I und II-Regionen und des  $Mg^{2+}$ -Ions vermittelt.<sup>[119,145,149,216,217]</sup> Die Kontakte zu Switch III und der helikalen Domäne sind unterschiedlich stark in den Gai-Subtypen ausgeprägt und spielen potentiell bei der Selektivität und Potenz der Interaktion eine Rolle. Die Spezifität für die Gai-Subfamilie gegenüber der RGS-GAP-inkompetenten Gas-Subfamilie wird durch Unterschiede in den Switch-Regionen erklärt.<sup>[17,119,145,149,216–221]</sup> RGS-Proteine sind Antagonisten für die *Gα*-nachgeschalteten Effektoren, da die Kontaktflächen an der *Gα*-Untereinheit überlappen.<sup>[17,149,220]</sup>

### 2.3.2 Erkrankungen im Zusammenhang mit der Gai/s-Untereinheit

Heterotrimere G-Proteine regulieren fundamentale physiologische Prozesse. Sie können aber auch mit dem Auftreten und dem Fortschreiten zahlreicher Krankheiten assoziiert sein (Abbildung 15).<sup>[14–17]</sup> Der Grund für eine Fehlregulation auf dem G-Proteinlevel kann eine abnormale Aktivierung oder Überexpression sein, sowie die Mutation eines spezifischen Restes, der beispielsweise zur permanenten Aktivierung der G-Proteine führt.<sup>[14,169,170]</sup>

GPCRs und heterotrimere G-Proteine spielen eine bedeutende Rolle in der Initiation und Progression von Krebserkrankungen, da sie die Tumorangio-genese, die Immunevasion sowie die Metastasierung regulieren können.<sup>[7,169–172,222–224]</sup> In diesem Kontext können onkogene Mutationen (ca. 20% der humanen Tumore weisen Mutationen in GPCRs auf<sup>[169]</sup>) und/oder abnormale Expression von GPCRs und G-Proteinen in einer Reihe von Tumorerkrankungen auftreten.<sup>[7,8,17,169–172]</sup> Im Folgenden werden nur Gai und Gas betrachtet.

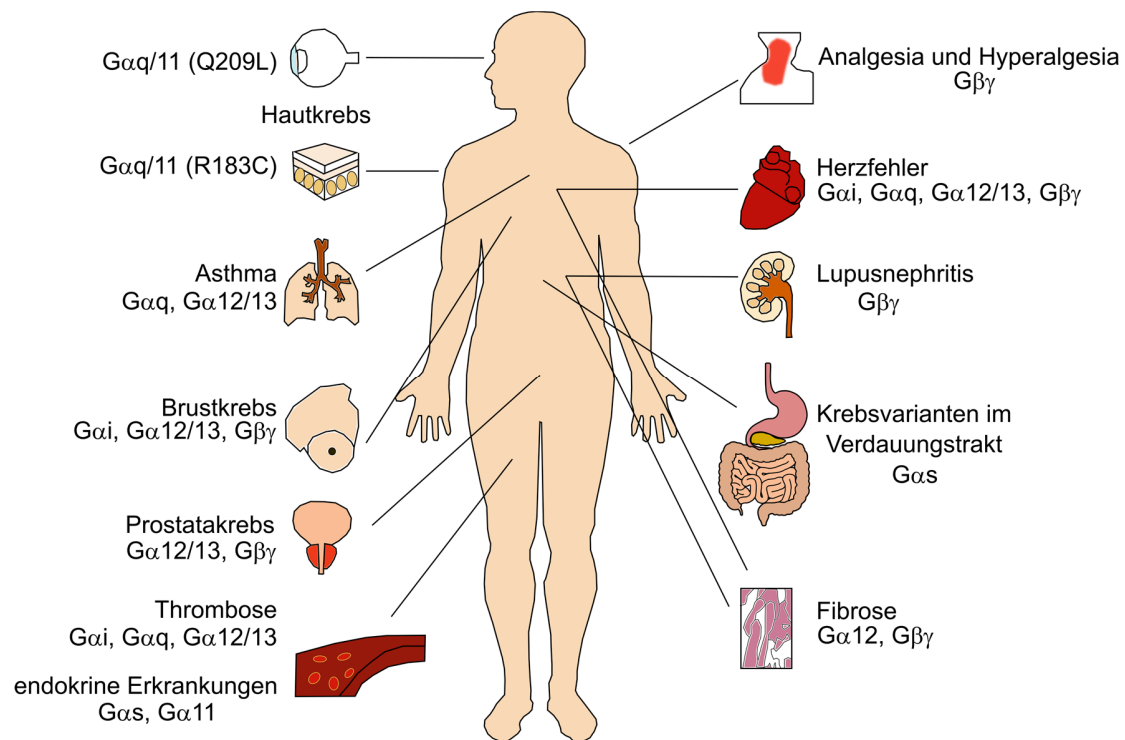


Abbildung 15: Beteiligung der Gai/s-Subfamilien bei verschiedenen Erkrankungen wie Krebs, Herzinsuffizienz, endokrinen Störungen oder Thrombose (nach dem Vorbild von Li et al.<sup>[14]</sup>).

Das GNAS-Gen, welches das Gas-Protein codiert, ist das am häufigsten in humanen Krebserkrankungen mutierte  $G\alpha$ -Protein.<sup>[170,172,225,226]</sup> Die Charakterisierung der Mutationen in verschiedenen Tumorarten ergab, dass ~5% der sequenzierten Tumore eine GNAS-Mutation beinhalteten, wobei diese verstärkt in Blinddarmkarzinomen (70%) und Hypophysentumoren (27%) auftritt.<sup>[169,171]</sup> Innerhalb der Datenbank „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) tritt eine GNAS-Mutation auch häufig bei Gebärmutterkörperkarzinomen (7,3%), Margenkarzinomen (5,7%), Pankreaskarzinomen (5,6%), Nebennierenrindenzellkarzinomen (5,5%), Speiseröhrenkrebs (4,9%) und Darmkrebs (4,7%) auf.<sup>[169,170,172,225]</sup> Weiterhin wurden Gas-Mutationen in Schilddrüsenadenomen, Leberzellkarzinomen, Eierstockkrebs und Lungenkrebs beobachtet.<sup>[169]</sup> Die Mehrzahl der Gas-Mutationen trat an zwei sogenannten „Hotspots“ auf, nämlich den beiden für die GTP-Hydrolyse bedeutenden Resten Arg201<sup>G.hfs2.2</sup> (v.a. Arg201Cys, Arg201His<sup>[169]</sup>) und Gln227<sup>G.s3h2.3</sup> (v.a. Gln227Leu, Gln227Arg, Gln227His<sup>[169]</sup>) (Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). Diese Mutationen bewirken die Expression einer konstitutiv aktiven, GTPase-defekten Gas-Untereinheit, wobei die Mutation des Arg201<sup>G.hfs2.2</sup> häufiger beobachtet wurde.<sup>[169–172,225,227,228]</sup> Der tumorerezeugende Effekt der Arg201<sup>G.hfs2.2</sup>-Mutation wurde zuerst in Hypophysentumoren nachgewiesen, bei denen die permanente Gas-Aktivierung zu einem Wachstum der Tumore unabhängig von der Stimulation durch Wachstumshormone führte.<sup>[170,227]</sup> Daneben ist es beachtlich, dass die Aktivierung von Gas in vielen Krebstypen des Verdauungstraktes durch beispielsweise aktivierende Mutationen oder Genamplifikation von GNAS/GNAL (GNAL codiert für G $\alpha$ olf) auftritt.<sup>[170]</sup> Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Gas Entzündungsmediatoren wie die von der Cyclooxygenase 2 (COX2) gebildeten Prostaglandine reguliert und somit eine proinflammatorische Reaktion in Dickdarmneoplasien aktivieren und die Tumorentwicklung begünstigen kann.<sup>[169,171,172,225]</sup> Zudem spielt der Gas-vermittelte Signalweg auch in der

Stammzellpopulation eine entscheidende Rolle, indem der Signalweg die Selbsterneuerung unterdrückt. In einigen stammzellähnlichen Zellzuständen kann Gas eine tumorsuppressive Rolle einnehmen, wenn beispielsweise eine Gas-Deletion oder niedrige Gas-Expression die Tumorumgebung oder -progression vorantreibt (z.B. Bildung von Medulloblastom-ähnlichen Tumoren oder weißem Hautkrebs).<sup>[170,229,230]</sup> In epithelialen Stammzellen kann die Aktivierung von Gas zur Erschöpfung von Haarfollikel-Stammzellen führen, was zu Haarausfall führen kann und somit eine zellkontextspezifische Auswirkung zeigt.<sup>[170,231]</sup> Die bereits genannten aktivierenden GNAS-Mutationen können auch in endokrinen Erkrankungen und bei hyperfunktionellen endokrinen Tumoren auftreten. Diese Gas-Aktivierung kann zusammen mit einer endokrinen Dysfunktion zum McCune-Albright-Syndrom, dem Cushing-Syndrom, dem Carney-Komplex und der mikronodulären adrenokortikalen Hyperplasie führen.<sup>[14,170,232–236]</sup>

Neben Gas zeigen auch konstitutiv aktive Mutanten von Gai/o protoonkogene Eigenschaften und haben die Möglichkeit die Zelle zu transformieren.<sup>[170]</sup> Zum Beispiel wurden aktivierende Mutationen in GNAI2 (codiert Gai2) in verschiedenen Tumortypen wie z.B. ovariellen oder Nebennierentumoren gefunden und werden zudem in Verbindung mit Krebserkrankungen des Gehirns und des Zentralnervensystems gebracht.<sup>[169,170,237–240]</sup> Ebenfalls koppeln viele GPCRs, wie beispielsweise der Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) an Gai, welche als Treiber der Metastasierung bekannt sind. In diesem Kontext ist der Krankheitsverlauf eines Brustkarzinoms durch hohe Invasionslevel und Metastasen gekennzeichnet, welche mit hochexprimierten GPCRs wie CXCR4 und den nachgeschalteten Signalwegen assoziiert werden.<sup>[14,169–171,225,241,242]</sup> Gai/o-gekoppelte Rezeptoren sind die am häufigsten durch Mutationen inaktivierte Klasse an GPCRs in Krebserkrankungen.<sup>[170,225]</sup> Darauf aufbauend wurde festgestellt, dass sich aktivierende Mutationen in Gas und inaktivierende Mutationen in Gai/o-gekoppelten GPCRs sich gegenseitig ergänzen, da beide eine erhöhte cAMP-Konzentration bewirken. In diesem Zusammenhang wurde zudem festgestellt, dass neben der häufigen Mutation von Gas auch eine Reihe von Gai/o-gekoppelten Rezeptoren in Krebstypen des Verdauungstraktes mutiert sind.<sup>[170,225,243]</sup>

Ein weiterer Gai-gekoppelter GPCR ist der  $\mu$ -Opioidrezeptor, der eine effektive Zielstruktur für Opioide in der klinischen Schmerztherapie ist.<sup>[183]</sup> Der Mechanismus der Schmerzlinderung (Analgesie) kann auf die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion zurückgeführt werden. Dabei wird die gehemmte Neurotransmitterfreisetzung und die verminderte Erregbarkeit der Neuronen durch die G $\beta\gamma$ -vermittelte Blockade der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und die G $\beta\gamma$ -gesteuerte Aktivierung der GIRKs (G-Protein-gekoppelte einwärts gerichtete Kaliumkanäle) verursacht.<sup>[14,244,245]</sup> Neben dem  $\mu$ -Opioidrezeptor koppelt die Gai-Subfamilie auch an Chemokinrezeptoren. Lupusnephritis ist eine chronisch-inflammatorische Nierenentzündung, die in Folge des systemischen Lupus erythematodes (SLE) auftritt. Der Krankheitsverlauf wurde mit verschiedenen Chemokinen und Chemokinrezeptoren assoziiert, wobei auch in diesem Fall das G $\beta\gamma$ -Dimer eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung in den Immunzellen spielt.<sup>[14,246,247]</sup>

Die Thrombose wird üblicherweise als pathologische Abweichung der Hämostase verstanden und hängt mit der Gerinnung und der Thrombozytenaktivierung zusammen.<sup>[248]</sup> Die Thrombose ist eine der humanen Haupttodesursachen, da diese unter anderem arterien- und venenassoziierte Erkrankungen auslöst.<sup>[248]</sup> G-Proteine können eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Thrombose spielen.<sup>[14]</sup> Neben einer Funktion von G $\alpha_q/11$  und G $\alpha_{12/13}$  für die Thrombozytenaktivierung wurde auch eine Koaktivierung von G $\alpha_q$  und Gai in der ADP-induzierten

Thrombozytenaggregation festgestellt. Deshalb wurde vermutet, dass beide G-Protein-vermittelten Signalwege entscheidend für diesen Prozess sind.<sup>[14,249–252]</sup>

Eine Herzinsuffizienz bedeutet das Versagen des Herzens, die Organe und das umliegende Gewebe mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen.<sup>[253,254]</sup> Bei einer Herzinsuffizienz verursacht eine erhöhte Gai-Aktivität und die herunterregulierten  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -AR) die Desensibilisierung der kardialen AC und das Entkoppeln von  $\beta$ -AR, Gai und AC. Dies führt zu einer Reduktion der myokardialen Reaktion auf Katecholamin und einer Abnahme der kardialen Kontraktilität.<sup>[14,255–258]</sup> Studien mit Kardiomyozyten zeigten, dass die Hemmung von Mitgliedern der Gai-Subfamilie einen positiven Effekt auf die Herzinsuffizienz hat.<sup>[14,255,256]</sup> Neben der bedeutenden regulatorischen Funktion der Gai-Subfamilie innerhalb der Herzinsuffizienz wurde auch ein Einfluss von G $\alpha$ q und dem G $\beta\gamma$ -Dimer auf die Herzinsuffizienz und die kardiale Hypertrophie beschrieben.<sup>[14]</sup>

Insgesamt sind sowohl G $\alpha$ s als auch Gai an einer Vielzahl von pathophysiologischen Zuständen beteiligt, weshalb diese Proteine bedeutend als Zielstrukturen für die pharmakologische Forschung sind.

### 2.3.3 Modulatoren der Gai/s-Proteinaktivität

Für die Entwicklung von Modulatoren für die G $\alpha$ -Proteinaktivität gibt es verschiedene Möglichkeiten. Ein Ansatz ist es, den Einfluss von Naturstoffen auf einen Organismus oder eine Zelle zu prüfen und diesem eine Zielstruktur innerhalb dieses Organismus oder der Zelle zuzuweisen.<sup>[259]</sup> Dieser Prozess kann sehr zeitaufwendig sein und ist ein nicht-gerichteter Ansatz. Dennoch ist diese Herangehensweise wirkungsvoll, da beispielsweise G-Proteine durch die Erforschung der Wirkungsweise zweier bakterieller Exotoxine entdeckt wurden.<sup>[104]</sup> Heutzutage werden vor allem niedermolekulare Verbindungen oder Peptide in Hochdurchsatztechniken oder strukturbasierten Analysen als potentielle Kandidaten für die Beeinflussung von Proteinaktivitäten oder PPIs identifiziert und in weiteren Studien analysiert.<sup>[54,260–263]</sup> Sobald ein geeigneter Effekt auf die Zielstruktur erreicht wurde, ist die Weiterentwicklung der Kandidaten in einem Leitstrukturansatz denkbar.<sup>[264–266]</sup>

Für die Adressierung der G $\alpha$ -Proteinaktivität sind vor allem drei Herausforderungen zu berücksichtigen: 1) die Verbindung muss zellpermeabel sein, um das intrazellulär lokalisierte G-Protein zu erreichen, 2) die Verbindung sollte spezifisch für eine G $\alpha$ -Subfamilie oder -Subtyp sein, welches aufgrund der hohen Sequenz- und Strukturhomologie erschwert ist, 3) die G $\alpha$ -Untereinheit durchläuft verschiedene Konformationen innerhalb des Aktivierungszyklus, weshalb es gegebenenfalls nötig ist, Aktivitätszustand-spezifische Modulatoren zu entwickeln.<sup>[17,260,266]</sup>

Bisher ist es nur für die G $\alpha$ q-Subfamilie gelungen, zwei spezifische Depsipeptide natürlichen Ursprungs, genauer FR900359 (FR, produziert von *Candidatus Burkholderia crenata* lokalisiert in den Blattknoten der Pflanze *Ardisia crenata*<sup>[267,268]</sup>) und YM-254890 (YM, *Chromobacterium* sp. QS3666<sup>[269]</sup>), zu identifizieren. Beide Verbindungen haben eine hohe strukturelle Ähnlichkeit und wirken als G $\alpha$ q-Inhibitor über eine GDI-Aktivität.<sup>[264,270]</sup> In zahlreichen Ansätzen wurden diese Depsipeptide als Leitstruktur verwendet, wobei u.a. versucht wurde, strukturell vereinfachte Derivate mit gleichbleibender Aktivität zu synthetisieren. Die Studien zeigten, wie spezifisch die Interaktion zwischen einem Modulator und der G $\alpha$ -Untereinheit sein kann oder sein muss, um den

gewünschten Effekt zu erzielen.<sup>[264,271–275]</sup> Das Potential von FR und YM wird dadurch deutlich, dass diese bereits Anwendungen in Aderhautkrebsstudien oder in Mausmodellen für Asthma finden.<sup>[276–278]</sup> Da bisher Verbindungen in vergleichbarer Qualität für die Gai/s-Subfamilien fehlen, war deren Adressierung das Thema der vorliegenden Arbeit. In den folgenden Unterkapiteln werden die literaturbekannten Ansätze und identifizierten Verbindungen, die bereits im Kontext der Gai/s-Adressierung beschrieben wurden, näher vorgestellt. Die Zuordnung dieser Verbindungen zu den  $\alpha$ -Kontaktflächen sollte dabei helfen, die einzelnen  $\alpha$ -Kontaktflächen nach deren Zugänglichkeit und Potential als Zielregion einzuschätzen. Diese theoretische Analyse wurde bereits in Form eines Übersichtsartikels publiziert.<sup>[17]</sup>

### 2.3.3.1 $\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche

Eine besondere Rolle bei der  $\alpha$ -GPCR-Wechselwirkung spielt der  $\alpha$ -C-Terminus. Neben der erfolgreichen Entwicklung von Antikörpern gegen den C-Terminus, zeigten viele natürlich vorkommende Substanzen einen Einfluss auf die G-Proteinaktivität durch Interaktion oder Modifikation von diesem.<sup>[17]</sup> Ein prominenter Vertreter ist das bakterielle Exotoxin Pertussistoxin (PTX, 105 kDa<sup>[279]</sup>, Abbildung 16A-B) aus *Bordetella pertussis*, welches selektiv die Gai-Subfamilie (außer Gaz) inhibiert.<sup>[104,280,281]</sup> Die inhibitorische Funktion wird durch die mono-ADP-Ribosyltransferaseaktivität von PTX erreicht, wodurch PTX eine ADP-Riboseeinheit von Nikotinamidadenindinuklotid (NAD<sup>+</sup>) irreversibel auf einen C-terminalen Cysteinrest (Cys<sup>G.H5.23</sup>, konserviert in der Gai-Subfamilie) überträgt und die Entkopplung von GPCR und G-Protein bewirkt.<sup>[17,279,280]</sup> Als Konsequenz können die Mitglieder der Gai-Subfamilie nicht mehr aktiviert werden und verbleiben im GDP-gebundenen, heterotrimeren Zustand. Dies kann zur Akkumulation von cAMP und einer Reihe von pathologischen Effekten in der Wirtszelle führen.<sup>[17,280]</sup> Dennoch sind für PTX auch G-Protein-unabhängige Effekte beschrieben, weshalb PTX vor allem als Werkzeug für Studien an der Gai-Subfamilie genutzt wird.<sup>[17,280]</sup>

Neben PTX existieren auch eine Reihe an kationisch-amphiphilen Substanzen, die einen Einfluss auf die Gai/s-Proteinaktivität zeigten.<sup>[17,282–286]</sup> Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind Mastoparan (H-INLKALAAKIL-NH<sub>2</sub>) aus Wespengift (Abbildung 16C) und Melittin (H-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub>) aus Bienengift.<sup>[287–289]</sup> Mastoparan bewirkt eine erhöhte GTP-Bindung in einer GEF-ähnlichen Aktivität und eine erhöhte GTPase-Aktivität für Gi/o (weniger für Gt, Gs), wohingegen Melittin die Gi-Aktivität stimuliert und die Gs-Aktivität inhibiert, welches in beiden Fällen in einer AC-Inhibition resultiert.<sup>[282,287,288,290,291]</sup> Vor allem Mastoparan wurde als Leitstruktur für synthetische Derivate und als GPCR-Mimetikum verwendet, da es an den N- und C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit bindet.<sup>[282,292–296]</sup> Trotz der potentiellen Anwendung als neuroaktive pharmakologische Werkzeuge, sind diese Verbindung weniger geeignet als  $\alpha$ -Proteinmodulatoren. Grund dafür ist, dass diese zelltypabhängig agieren sowie auch andere Zielstrukturen beeinflussen und somit eine große Bandbreite an Effekten verursachen können.<sup>[17,289,297–300]</sup>

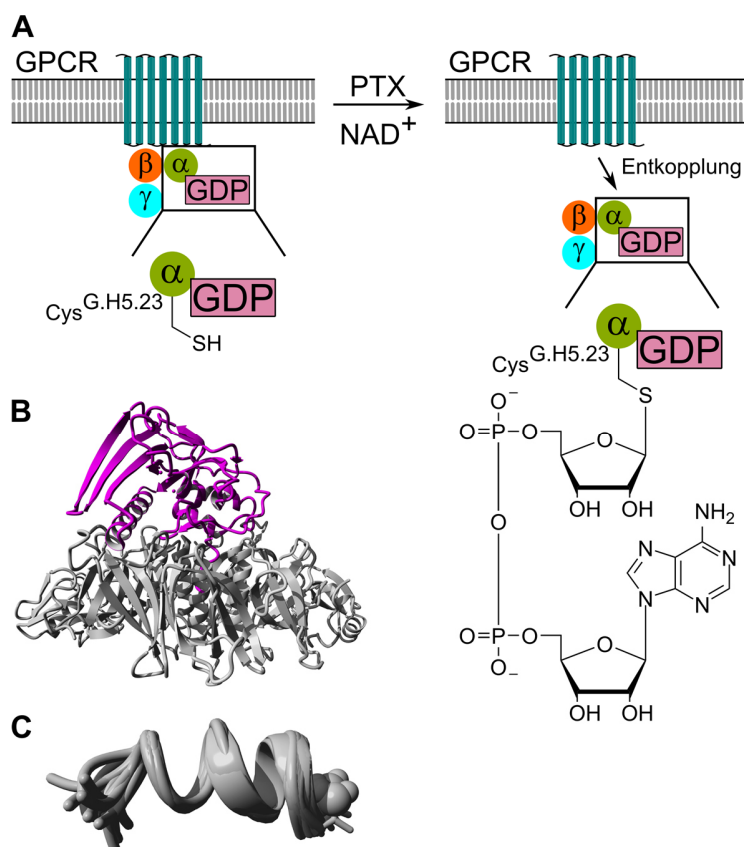


Abbildung 16: Naturstoffe, die an der  $G\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche binden. **A:** Modifikation von  $G\alpha_i$  durch Pertussis toxin (PTX), modifiziert nach Mangmool et al.<sup>[280]</sup> PTX überträgt das ADP-Ribose-Element von Nicotinamidadenindinukleotid ( $NAD^+$ ) auf  $G\alpha_i$ . **B:** Kristallstruktur von PTX (grau, PDB: 1PRT<sup>[279]</sup>). Die S1-Untereinheit (magenta) katalysiert die  $G\alpha_i$ -Inhibition. **C:** G-Protein-gebundenes NMR Strukturrensemble (14 Strukturen) von Mastoparan-X (H-INWKGIAAMAKLLNH<sub>2</sub>, PDB: 1A13<sup>[301]</sup>). Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>

### 2.3.3.2 $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ -Interaktionsfläche

Suramin (**4**, ein Polysulfonatnaphthylaminbenzamidderivat, 1297,29 g/mol, Abbildung 17) ist eine relativ große niedermolekulare Verbindung, die von Bayer zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit entwickelt wurde.<sup>[16,17,302]</sup> Bei *in vitro* Versuchen mit rekombinanten  $G\alpha$ -Proteinen zeigte sich, dass Suramin an die  $G\alpha$ -Untereinheit bindet, die GDP-Dissoziation und daher den Nukleotidaustausch GDI-ähnlich inhibiert.<sup>[14,16,302,303]</sup> In diesem Kontext kann Suramin die Assoziation von  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  verhindern und somit die GPCR-G-Protein-Kopplung unterbrechen.<sup>[303]</sup> Da Suramin mit der  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_s$ -Subfamilie interagieren kann, wurden in der Folge Analoga mit erhöhter Selektivität entwickelt.<sup>[14]</sup> Die Analoga NF449 (**5**) und NF503 (**6**) zeigten eine erhöhte Selektivität für  $G\alpha_s$  und waren in der Lage den Nukleotidaustausch zu inhibieren (Abbildung 17).<sup>[14,304,305]</sup> NF023 (Abbildung 19, Seite 31) hingegen ist  $G\alpha_i/o$ -selektiv und wird im Kapitel 2.3.3.4 näher betrachtet.<sup>[306]</sup> Ein großer Nachteil von Suramin und dessen Analoga ist die hohe strukturelle Komplexität und die geringe Zellpermeabilität, was deren pharmakologisches Potential und die weiterführende Anwendung limitiert.<sup>[14,16,17,306]</sup>



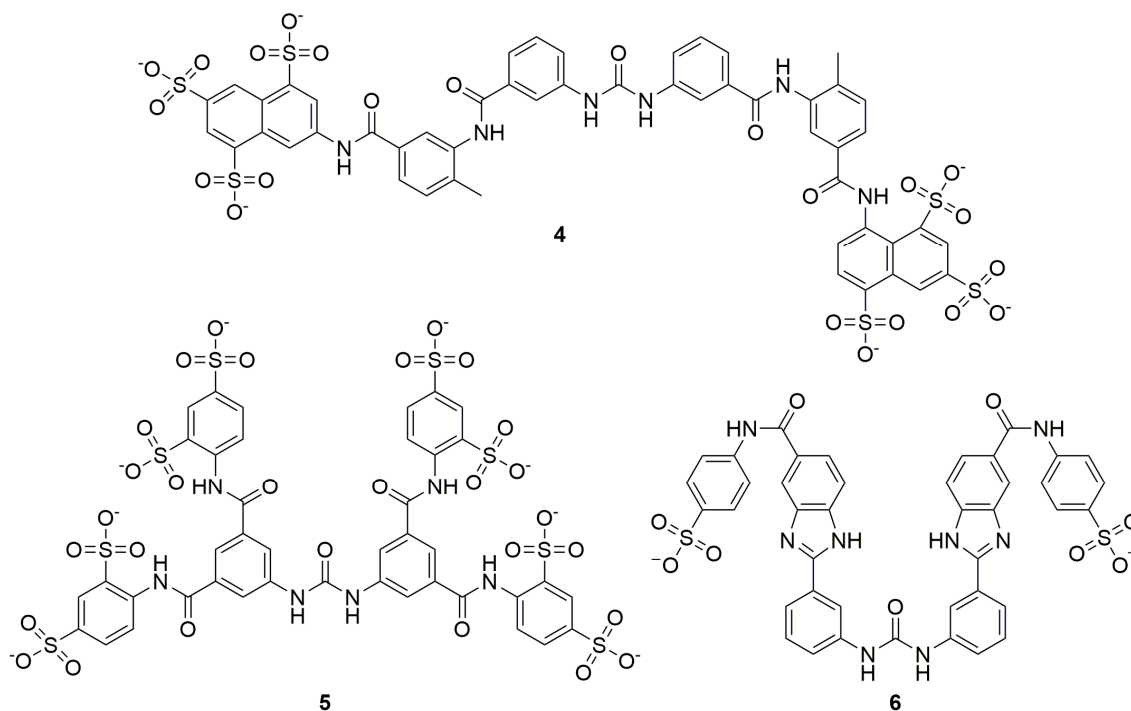


Abbildung 17: Chemische Strukturen von Suramin (**4**)<sup>[14,16]</sup> und dessen Analoga NF449 (**5**)<sup>[14]</sup> und NF503 (**6**)<sup>[14],[17]</sup>

### 2.3.3.3 $\alpha$ -Effektor-Interaktionsfläche

Für die  $\alpha$ -Effektor-Interaktionsfläche existieren keine bekannten Modulatoren, außer den natürlichen, kompetitiv wirkenden Signalwegsmolekülen. Dies kann durch eine erschwerte Klassifizierung der  $\alpha$ -Kontaktflächen durch räumliche Überlagerung begründet werden oder eine schwierige Adressierbarkeit implizieren.<sup>[17]</sup> Für die Analyse der  $\alpha$ -AC-Kontaktregion wurden AC-abgeleitete Peptide synthetisiert, die in der Lage waren die Gas-AC-Interaktion (AC II, AC VI) zu inhibieren.<sup>[307]</sup> Diese Studie wurde aus der Intention heraus durchgeführt, die Loop-Regionen innerhalb der zytosolischen Domänen der AC zu identifizieren, die entscheidend für die Gas-vermittelte AC-Stimulation sind.<sup>[307]</sup> Zusammenfassend kann an dieser Stelle geschlossen werden, dass diese Studie eine funktionelle Analyse der Gas-AC-Interaktion ermöglicht und ein geeigneter Ansatz für die Erforschung dieses Abschnitts der Signalweiterleitung ist.<sup>[17,307]</sup> Es erfolgte aus diesem Schritt heraus allerdings keine Weiterentwicklung der synthetisierten Peptide als  $\alpha$ -Proteinmodulatoren.<sup>[17]</sup>

### 2.3.3.4 $\alpha$ -Hilfsproteine-Interaktionsfläche

Die  $\alpha$ -Hilfsprotein-Kontaktfläche ist besonders relevant für die Entwicklung von Modulatoren der  $\alpha$ -Proteinaktivität. Der Grund dafür ist, dass die Hilfsproteine als GDIs, GEFs, GEMs, oder GAPs die  $\alpha$ -Proteinaktivität durch Binden an die  $\alpha$ -Untereinheit beeinflussen können.<sup>[17,127,128]</sup> Der Bindungsmodus dieser Proteine ist daher ein geeigneter Ausgangspunkt.<sup>[17]</sup> Außerdem kann durch die Beeinflussung der GTPase-Aktivität die  $\alpha$ -Proteinaktivität maßgeblich in zwei Richtungen gelenkt werden.<sup>[17,104]</sup> Entweder wird durch Stimulation der GTPase-Aktivität eine



schnellere Terminierung des Signalwegs erreicht, so wie es bei GAPs der Fall ist, oder eine Inhibition der GTPase-Aktivität führt zur permanenten Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit und somit fortwährender Effektorsignalweiterleitung (Kapitel 2.3.2).<sup>[17,104,119]</sup> Das Letztgenannte führte zur Entdeckung der heterotrimeren G-Proteine.<sup>[104]</sup> Grund dafür war das bakterielle Exotoxin Cholera toxin (CTX, 84 kDa<sup>[308]</sup>, Abbildung 18A, C) aus *Vibrio cholerae*, dem Bakterium, welches für die Symptome der Choleraerkrankung verantwortlich ist.<sup>[16,104]</sup> CTX agiert ähnlich mechanistisch wie PTX und kann irreversibel ein ADP-Ribose-Element von  $\text{NAD}^+$  auf Arg201<sup>G.hfs2.2</sup> (RXXTXGI-Motiv, Kapitel 2.2.2) der Gas-Untereinheit übertragen.<sup>[104,309–311]</sup> Dies hat die Inhibition der GTP-Hydrolyse und eine permanente Gas-Aktivierung zur Folge, was zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Level führt.<sup>[309,312–314]</sup> Über einen ähnlichen Mechanismus kann ein hitzelabiles Enterotoxin (HLT, 86 kDa<sup>[315]</sup>, Abbildung 18C) aus *Escherichia coli* (*E. coli*) die Gas-Untereinheit permanent aktivieren.<sup>[315–317]</sup>

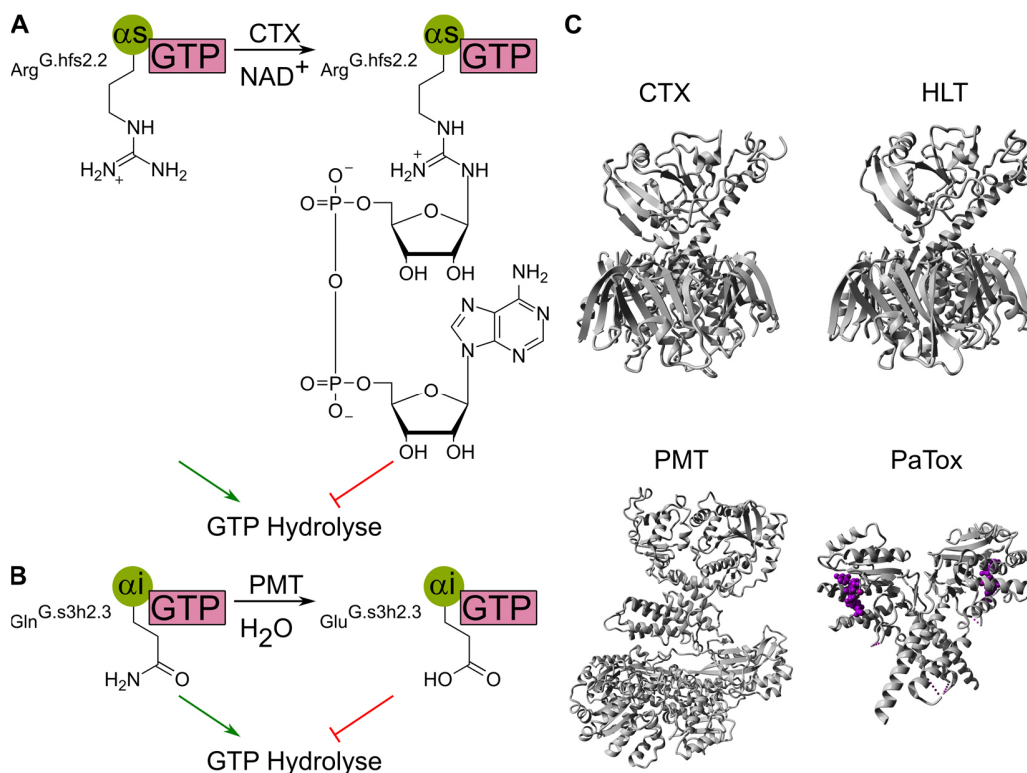


Abbildung 18: Inhibition der GTPase-Aktivität durch bakterielle Toxine. **A:** Gas-Inhibition mittels Cholera toxin (CTX) durch Übertragung des ADP-Ribose-Elements von  $\text{NAD}^+$  auf den „Argininfinger“. **B:** Gai-Inhibition mittels *Pasteurella multocida*-Toxin (PMT) durch Deamidierung von Gln. **C:** Kristallstrukturen von CTX (PDB: 1XTC<sup>[318]</sup>), hitzelabiles Enterotoxin (HLT, PDB: 1LTS<sup>[316]</sup>), PMT (PDB: 2EC5<sup>[319]</sup>) und der Glykosyltransferase-Domäne von *Photobacterium* *asymbiotica* Proteintoxin (PaTox, PDB: 4MIX<sup>[320]</sup>, UDP-GlcNAc (violett)) (Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17]</sup>).

Zwei weitere Toxine, *Pasteurella multocida* Toxin (PMT, 146 kDa<sup>[321]</sup>, Abbildung 18B-C) und *Photobacterium asymbiotica* Proteintoxin (PaTox, 335 kDa, UniProt: C7BKP9, Abbildung 18C), blockieren die GTP-Hydrolyse durch Deamidierung von Gln205<sup>G.s3h2.3</sup> (Gai) zu Glu205<sup>G.s3h2.3</sup> (Kapitel 2.2.2).<sup>[321,322]</sup> PMT beeinflusst dadurch die Gai/q/13-Aktivität und PaTox die Gai/q/11-Aktivität, was im Kontext von Gai zu einem reduzierten cAMP-Spiegel durch permanente Gai-Aktivierung führt.<sup>[320,322–324]</sup>

All diese Toxine sind wichtige pharmakologische Werkzeuge, besitzen aber den entscheidenden Nachteil, dass sie eine irreversible Modifizierung der  $\alpha$ -Untereinheit bewirken und daher für die klinische Anwendung unbrauchbar sind.<sup>[14,17,324,325]</sup>

### Niedermolekulare Verbindungen

Im Kontext niedermolekularer Verbindungen zur Blockierung der  $\alpha$ -Hilfsprotein-Interaktion sind drei Ansätze zu nennen. Der erste Ansatz führte innerhalb eines Screeningansatzes für die Identifikation von Gas-Modulatoren zu BIM-46174 (**7**, ein Imidazopyrazinderivat) und wenig später zur Entdeckung des disulfidverbrückten Dimers BIM-46187 (**8**, Abbildung 19).<sup>[262,326,327]</sup> Als funktioneller Mechanismus wurde für BIM-46187 postuliert, dass dieses an die GDP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit bindet (Switch II, III und  $\alpha$ B- $\alpha$ C-Loop sind postulierte Bindungsregionen), die GDP-Dissoziation jedoch nicht die GTP-Bindung erlaubt und somit die  $\alpha$ -Untereinheit pharmakologisch in der *empty pocket*-Konformation festhält.<sup>[328]</sup> Allerdings agieren diese Imidazopyrazinderivate als Pan-Inhibitoren für die  $\alpha$ -Untereinheit und bevorzugen abhängig vom zellulären Kontext die G $\alpha$ q-Subfamilie.<sup>[328]</sup>

Im zweiten Ansatz war es die Intention, niedermolekulare Verbindungen mit GDI-Aktivität für G $\alpha$ i gegenüber G $\alpha$ q zu entwickeln. Es wurden die G $\alpha$ i-selektiven Verbindungen 0990 (**9**) und 4630 (**10**, Abbildung 19) und drei Verbindungen, genauer 2967, 6715, und 1026, mit Selektivität zu G $\alpha$ i1 und G $\alpha$ q identifiziert, allerdings zeigte keine dieser Verbindungen den gewünschten inhibitorischen Effekt.<sup>[14,17,263]</sup> Der letzte Ansatz lieferte in einer Kombination aus *in silico* Ligandscreening und chemischen Hochdurchsatzassays das Suraminderivat NF023 (**11**) und Aurintricarbonsäure (**12**, ATA) als G $\alpha$ i3-Binder und Inhibitoren der G $\alpha$ i3-GIV-Bindung (Abbildung 19).<sup>[306]</sup> NF023 bindet dabei wie GEMs an Switch II,  $\alpha$ 3 und den  $\alpha$ 3- $\beta$ 5-Loop.<sup>[306]</sup> Trotzdem sind diese beiden Verbindungen nicht als  $\alpha$ -Proteinmodulatoren geeignet, da NF023 nicht zellpermeabel ist sowie P2X-Rezeptoren inhibieren kann und ATA auch andere Zielstrukturen wie Topoisomerase II adressieren kann.<sup>[17,306]</sup>

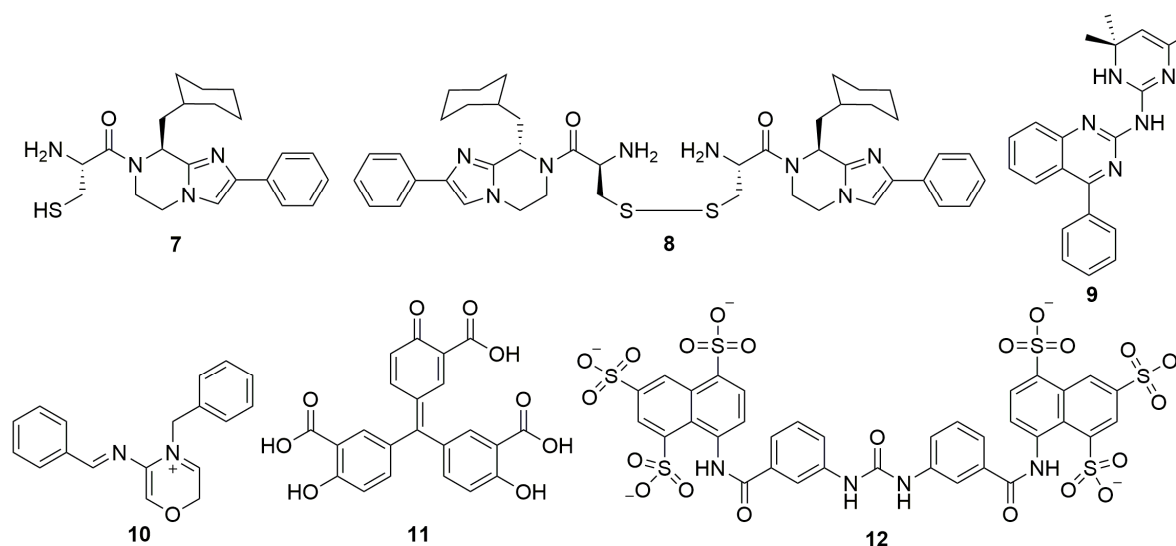


Abbildung 19: Chemische Strukturen der Imidazopyrazin-Derivate BIM-46174 (**7**) und BIM-46187 (**8**)<sup>[327]</sup>, von 0990 (**9**) und 4630 (**10**)<sup>[263]</sup>, sowie Aurintricarbonsäure (ATA, **11**) und dem Suramin-Derivat NF023 (**12**)<sup>[306],[17]</sup>

Die Ansätze mit den niedermolekularen Verbindungen zeigen, dass eine Adressierung der  $G\alpha$ -Untereinheit auf diesem Wege nicht den gewünschten Effekt erzielen kann, da die Interaktion nicht die erzielte Wirkung zeigte oder die Verbindungen auch andere Zielstrukturen ansteuerten.<sup>[14,15,17]</sup> In dieser Hinsicht ist die Entwicklung von peptidischen Modulatoren vielversprechend, da diese über eine größere Kontaktfläche mit der  $G\alpha$ -Untereinheit interagieren können.<sup>[17,27,59]</sup> Es wurde gezeigt, dass Proteine mit GPR-Motiven und GPR-abgeleitete Peptide *in vitro* die Gai-Proteinaktivität beeinflussen können.<sup>[14,100,123,202]</sup> Dies verdeutlicht das Potential von GPR-, GEM- oder RGS-Domäne-abgeleiteten Peptiden, die  $G\alpha$ -Proteinaktivität zu beeinflussen.<sup>[17]</sup> Um die Zellpermeabilität eines GPR- (H-TMGEEDFFDLLAKSQSKRMDQRV-DLAK-NH<sub>2</sub>) und eines GIV-abgeleiteten Peptides (210 Aminosäuren, GEM-Motiv) zu erhöhen, wurden CPP-Konstrukte mit TAT hergestellt, welche die GDI-Aktivität gegenüber Gai in HEK293-Zellen beziehungsweise die GEF-Aktivität gegenüber Gai in HeLa-Zellen ausüben konnten.<sup>[263,329]</sup> Diese Ansätze verdeutlichen, dass Peptide von Hilfsproteinen abgeleitet werden können, um die  $G\alpha$ -Proteinaktivität zu modulieren und die Zellpenetration durch Synthese von CPP-Konstrukten zu erhöhen.<sup>[263,329]</sup> Allerdings sind die beschriebenen Konstrukte relativ groß für eine Anwendung als chemische Werkzeuge.<sup>[17,263]</sup>

### *Peptide aus Hochdurchsatzverfahren*

Im Jahr 2003 wurde ein Phage Display mit einer kommerziell verfügbaren Peptidbibliothek (X<sub>7</sub>) gegenüber Gai1 durchgeführt und zwei Peptidfamilien (Konsensus 1:  $\Omega$ PXXQHP, Peptid 1: YPSMFHP, Konsensus 3: LPQXXXH, Peptid 3: LPALHGH, mit  $\Omega$ : aromatische Aminosäure<sup>[199]</sup>) mit G-Protein-aktivierenden Eigenschaften identifiziert (Tabelle 3).<sup>[330]</sup> Für diese Peptide wurden jedoch keine strukturellen Information oder weiterführende Studien beschrieben.<sup>[330]</sup> Zwei Jahre später wurde in der Arbeitsgruppe von David P. Siderovski ein Phage Display gegenüber Gai1·GDP und Gai1·GTP $\gamma$ S durchgeführt.<sup>[152,153]</sup> Im ersten Ansatzes wurde das GDP-selektive KB-752 identifiziert (Tabelle 3), welches sich als GEF für Gai1 und GDI für Gas herausgestellt hat und insgesamt eine GEM-ähnliche Aktivität aufweist.<sup>[127,152,331]</sup> Die daraus resultierende Reduktion des cAMP-Levels wurde in Membranpräparationen nachgewiesen.<sup>[331]</sup> KB-752 besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu dem GEM-Motiv (Kapitel 2.3.1.4) und bindet wie das GEF-Motiv von GIV an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region von Gai.<sup>[126,127,148,152]</sup> Im zweiten Ansatz wurden die drei Peptide KB-1753, KB-1746 und KB-1755 identifiziert (Tabelle 3), die selektiv an die aktive Konformation der Gai-Untereinheit binden.<sup>[153,261]</sup> Eine Kristallstrukturanalyse von KB-1753 in Komplex mit Gai1·GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> (GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> induziert die aktivierte Struktur der GTP-Hydrolyse) zeigte, dass auch dieses Peptid an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region von Gai1 bindet.<sup>[153]</sup> In kompetitiven Bindungsstudien wurde gefunden, dass die Gai1-Bindungsstellen von KB-1753 und KB-1755 sowie die von KB-1755 und KB-1746 partiell überlappen, allerdings nicht die von KB-1753 und KB-1746. KB-1753 ist in der Lage, die Interaktion von Gat mit dem Effektor cGMP PDE $\gamma$  sowie die Gat-vermittelte Aktivierung des cGMP-Abbaus zu inhibieren und die RGS-Proteinbindung zu stören.<sup>[153,261]</sup> Auf der Grundlage der strukturellen Analysen wurde abgeleitet, dass KB-1746 hauptsächlich mit der RGS-Bindungsstelle der  $G\alpha$ -Untereinheit interferiert, da KB-1753 vornehmlich mit der Effektorbindungsstelle und KB-1755 mit beiden Bindungsstellen interagiert.<sup>[153,261]</sup>

Tabelle 3: Gai/s-bindende Peptide aus Hochdurchsatzverfahren.

Name	Sequenz	Verfahren	Spezifität	$K_d$ [nM]	Ref.
<b>Gai-bindende Peptide</b>					
Peptid 1	YPSMFHP	Phage Display	n.d.	n.d.	[330]
Peptid 3	LPALHGH	Phage Display	n.d.	n.d.	[330]
KB-752	SRVTWYDFLMEDTKSR	Phage Display	GDP	3.900	[152]
KB-1753	SSRGYYHGIWVGEEGRLSR	Phage Display	GDP·AIF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1.200	[153]
KB-1746	SSSYSEHCQRWGICYARLSR	Phage Display	GDP·AIF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1.000	[261]
KB-1755	SSRLCPEWICPWEWPASSR	Phage Display	GDP·AIF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1.800	[261]
R6A	MSQTKRLDDQLYWWEYL	mRNA Display	GDP	60	[260]
R6A-1	DQLYWWEYL	mRNA Display	GDP	200	[260,266]
AR6-05	DESDPEELMYWWEFLSEDPS	mRNA Display	GDP	20	[332]
GSP	MAMSDRNKRLTVWEFLALPSST	mRNA Display	GDP	280	[333]
linGiBP	MITWYEFVAGTK	mRNA Display	GDP	31	[334]
cycGiBP	cyc [MITWYEFVAGTK]	mRNA Display	GDP	2,1	[334]
cycPRP-1	cyc [MITWIDFISPSK]	mRNA Display	GDP	90	[335]
cycPRP-2	cyc [MTWFEYLSGSK]	mRNA Display	GDP	n.d.	[335]
cycPRP-3	cyc [MTWFEFLSSTSK]	mRNA Display	GDP	9	[335]
Gα SUPR	cyc [MFY (NMeA) YEY (NMeA) QWSK]	mRNA Display	GDP	60	[336]
<b>Gas-bindende Peptide</b>					
KB-752	SRVTWYDFLMEDTKSR	Phage Display	GDP	5.100	[152]
R6A-1	DQLYWWEYL	mRNA Display	GDP	50.000	[266,333]
GSP	MAMSDRNKRLTVWEFLALPSST	mRNA Display	GDP	100	[333]
mGSP-1	MAMSDQNKRMRTVREFLALPSSL	mRNA Display	GDP	300	[333]
mGSP-2	MYTSDHNKLLTVREFLALPSST	mRNA Display	GDP	130	[333]
GsIN-1	cyc [YFESVYAIWGTLIC]	RaPID System	GMPPNP	190	[337]

GSP: Gas-binding peptide, linGiBP: linear Gai binding peptide; cycGiBP: cyclic Gai binding peptide; cycPRP: cyclic protease resistant peptide; SUPR: scanning unnatural-protease-resistant, mGSP: matured GSP, GMPPNP: Guanosine-5'-[(β,γ)-imido]triphosphat, n.d.: nicht bestimmt, Ref.: Referenz.

Neben den Phage Display-Ansätzen wurden von der Arbeitsgruppe um Richard W. Roberts seit 2004 mRNA Display-Techniken mit Gα-Proteinen durchgeführt.<sup>[260]</sup> Die Gruppe benutzte für das Design einer RNA Display-Peptidbibliothek (C-GPR X<sub>6</sub>: MSQSKRLDDQRX<sub>6</sub>) das GPR-Motiv als Vorbild.<sup>[260]</sup> In einem Screening gegenüber Gai1·GDP wurde das Gai-GDP-spezifische Peptid R6A identifiziert und zu dem 9mer Peptid R6A-1 reduziert (Tabelle 3). Beide Peptide konkurrieren mit dem Gβγ-Dimer um die Gai1-Bindung, der Erhalt der GDI-Aktivität wurde 2006 für das Peptid R6A-1 widerlegt.<sup>[260,338]</sup> Für R6A-1 wurde eine hohe sequentielle Ähnlichkeit zu KB-752 (Konsensus: [T/Y/F]-W-[WY]-[ED]-[FY]-L) und eine Bindung an die Switch II/α3-Region beschrieben.<sup>[338]</sup> Des Weiteren wurde postuliert, dass R6A-1 ein Kernmotiv für die Bindung an verschiedene Gα-Untereinheiten darstellt, da dieses auch die anderen Gα-Subfamilien im GDP-

gebundenen Zustand adressieren kann.<sup>[266]</sup> Im Folgenden wurde R6A-1 als Ausgangspunkt für die Identifikation von Bindern für Gai·GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> und Gas·GDP eingesetzt, oder mittels N-Methylierungen mit der Intention, die proteolytische Stabilität zu erhöhen, modifiziert.<sup>[332,333,339]</sup> Aus dem Screening mit Gai·GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> wurde AR6-05 erhalten (Tabelle 3). AR6-05 bevorzugt den Gai·GDP- gegenüber dem Gai·GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>-gebundenen Zustand und konkurriert mit dem Gβγ-Dimer um die Gα-Bindung.<sup>[332]</sup> Um Gas·GDP-selektive Peptide zu identifizieren, die innerhalb der Switch II/α3-Region binden, wurde ein zweistufiger Selektionsprozess durchgeführt.<sup>[333]</sup> Im ersten Schritt wurde die R6A-1-abgeleitete Bibliothek (MX<sub>6</sub>DQLYWWEYLX<sub>6</sub>) gegen Gas·GDP für die Identifikation von Gas·GDP-Bindern gescreent. Basierend auf den identifizierten Hits wurde im Folgenden eine GSP-Bibliothek (Gas·GDP-spezifische Peptide, Bibliothek basiert auf der GSP-Sequenz: MAMSDRNKRLTVWEFLALPSST) entworfen und die GSP-Varianten ausgewählt, die auf den Gas-Beads in Gegenwart eines molaren Überschusses an Gai verblieben.<sup>[333]</sup> Die erhaltenden Peptide wurden als mGSP-Varianten bezeichnet („m“ für gereift (*matured*)). Die resultierenden Peptide mGSP-1 und mGSP-2 inhibieren die Heterotrimerbildung und binden, wie angestrebt, an die Switch II/α3-Region.<sup>[333]</sup> Es wurde für mGSP-1, mGSP-2 und GSP (Tabelle 3) gezeigt, dass diese als GDIs für Gas wirken, wobei GSP auch ein GEF für Gai1 ist und somit ein GEM-ähnliches Verhalten zeigt.<sup>[333]</sup> GSP wies außerdem eine sequentielle Ähnlichkeit zu dem GEM-Motiv von Proteinen auf.<sup>[210,211,214]</sup>

Wie bereits eingangs erwähnt, sind lineare Peptide anfälliger gegenüber proteolytischem Abbau als zyklische Peptide (Kapitel 2.1).<sup>[27,41,82,334]</sup> Basierend auf diesem Fakt hat die Roberts-Gruppe weitere mRNA-Display-Ansätze mit makrozyklischen Peptidkonstrukten (MX<sub>10</sub>K) durchgeführt.<sup>[334,335]</sup> Bei einem Screening gegenüber Gai1·GDP identifizierten sie cycGiBP (**13**, zyklisches, Gi-bindendes Peptid, Abbildung 20), welches eine deutlich höhere Stabilität gegenüber Chymotrypsin als dessen lineare Variante linGiBP zeigte (Tabelle 3).<sup>[334]</sup> Durch Wettbewerbsstudien mit R6A schlossen die Autoren darauf, dass alle Peptide eine ähnliche Bindungsstelle an der Gα-Untereinheit adressieren.<sup>[334]</sup> Um die proteolytische Stabilität der identifizierten Hits zu erhöhen, wurde in einer weiteren Studie ein zweistufiger Selektionsprozess durchgeführt.<sup>[335]</sup> Nachdem die zuvor erwähnte Bibliothek mit Chymotrypsin verdaut wurde, erfolgte die Selektion gegenüber Gai1·GDP, welches zu den zyklischen Protease-resistenten Peptiden (cycPRP) cycPRP-1 (**14**), cycPRP-2 und cycPRP-3 (**15**, Tabelle 3, Abbildung 20) führte.<sup>[335]</sup> Diese Peptide zeigten eine erhöhte Chymotrypsinresistenz und eine verbesserte humane Plasmastabilität.<sup>[335]</sup> Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu den zuvor identifizierten Gai-selektiven mRNA Display-Peptiden wurde auch für diese Peptide die Bindung an Switch II/α3 vermutet.<sup>[335]</sup> In einer weiterführenden Studie wurde dieser zweistufige Selektionsprozess mit einem makrozyklischen mRNA Display-Konstrukt mit unnatürlichen und natürlichen Aminosäuren wiederholt. Dies führte zur Identifikation von Gα SUPR (**16**, scanning unnatural protease resistant, Tabelle 3, Abbildung 20), einem Gai·GDP-selektiven Peptid, welches eine erhöhte Stabilität in humanem Serum und eine 35-fach verbesserte *in vivo*-Stabilität in Mäusen im Vergleich zu cycGiBP aufweist.<sup>[336]</sup> Die Studien der Roberts Gruppe zeigen, dass durch den Einsatz von makrozyklischen Peptiden die Stabilität gegenüber Proteasen, in humanem Plasma und *in vivo*, in Kombination mit N-Methylierungen erhöht werden kann.<sup>[334–336]</sup> Aus den beschriebenen Studien geht jedoch nicht hervor, ob die Gai-selektiven Peptide lediglich an die Gα-Untereinheit binden oder ob diese auch deren Aktivität beeinflussen können.

Erst kürzlich wurde durch Verwendung des RaPID-Screeningansatzes gegenüber Gas·GTP das zyklische, Gas·GTP-selektive GsIN-1 (**17**, Tabelle 3, Abbildung 20) identifiziert, welches ebenso die Switch II/ $\alpha$ 3-Region adressiert und Gas inhibieren kann.<sup>[337]</sup>

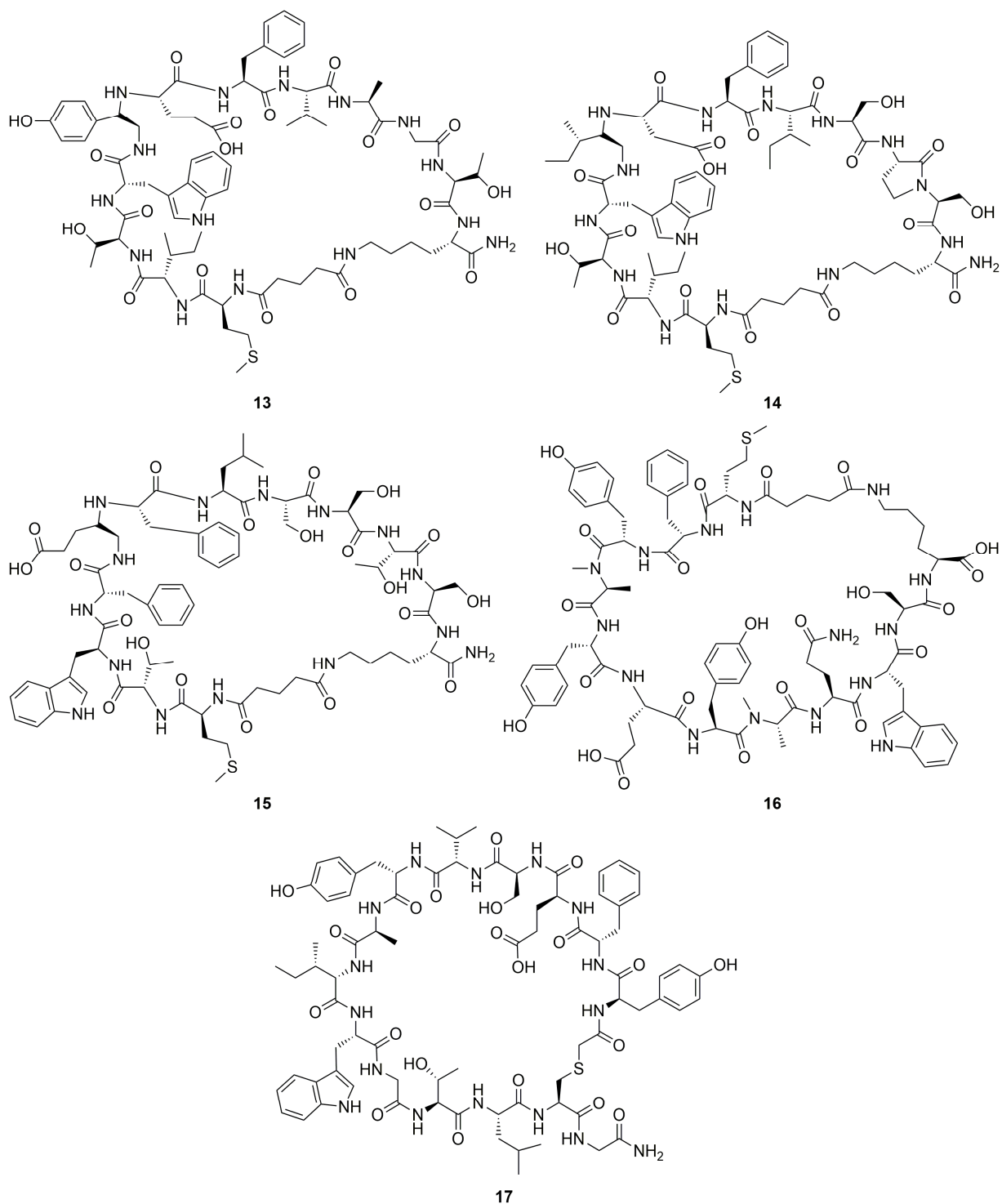


Abbildung 20: Chemische Strukturen von mRNA-Display- und RAPID-abgeleiteten Peptiden, die die  $\alpha$ -Hilfsprotein-Interaktionsfläche adressieren. Die Peptide cycGiBP (**13**)<sup>[334]</sup>, cycPRP-1 (**14**), cycPRP-3 (**15**)<sup>[335]</sup>, und  $\alpha$  SUPR (**16**)<sup>[336]</sup> sind Gai1-GDP-selektiv. GsNI-1 (**17**)<sup>[337]</sup> ist Gas·GTP-selektiv.<sup>[17]</sup>

## 2.4 Kombinatorisches Peptidbibliotheksscreening

Wie bereits im Kapitel 2.1 beschrieben, können Proteine über PPIs mit anderen Proteinen wechselwirken.<sup>[27,59]</sup> Um diese PPIs zu unterbrechen, sind Peptide ein wertvolles Werkzeug.<sup>[17,27,51,59]</sup> Durch das Screening von kombinatorischen Peptidbibliotheken gegen eine Zielstruktur können hoch-affine Bindungssequenzen in einem Hochdurchsatzverfahren identifiziert werden.<sup>[27,51,52,54,59]</sup> Die identifizierten Hits können im Anschluss auf ihre Funktion getestet werden und für die pharmakologische Anwendung weiter optimiert werden.<sup>[152,153,260,331,334]</sup> Im Kapitel 2.3.3 wurde bereits der Einsatz von Phage Display, mRNA Display und dem RaPID-System vorgestellt. In den in der vorliegenden Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten wurden kombinatorische Peptidbibliotheken mittels einer Streptavidin (SA)-basierten Methode gescreent, weshalb dieser Ansatz im Folgenden näher beschrieben wird.

### 2.4.1 SA-basierter Screeningansatz

Der SA-basierte Screeningansatz (Abbildung 21) wurde von Sweeney et al.<sup>[340]</sup> im Jahre 2005 für die Identifikation von Peptidbindesequenzen für die SH2-Domäne aus den Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1, SHP-2 sowie der Inositolphosphatase (SHIP) entwickelt.<sup>[340]</sup> Diese Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin ( $10^{14} \text{ M}^{-1}$ <sup>[341]</sup>).<sup>[340]</sup> Biotin (Vitamin B7) spielt in der Biochemie eine bedeutende Rolle, da dieses u.a. als prosthetische Gruppe von Enzymen in Stoffwechselprozessen involviert ist.<sup>[342]</sup> Bei der SA-basierten Screeningtechnik wird Biotin in Form des Biotin-N-hydroxysuccinimidesters (NHS-Biotin) an das zu untersuchende Zielprotein über Amidbindungen mit an der Proteinoberfläche zugänglichen Lysinseitenketten verknüpft.<sup>[58,340]</sup> Im Folgenden wird eine harzgebundene, kombinatorische Peptidbibliothek mit dem biotinylierten Protein inkubiert, wobei das Zielprotein selektiv an ausgewählte Sequenzen der Peptidbibliothek über nicht-kovalente Wechselwirkungen binden kann. Für den Nachweis der Peptid-Protein-Interaktionen ist das Streptavidin bedeutend.<sup>[58,340]</sup> Durch die Arbeitsgruppe um Dehua Pei wurden vor allem zwei Selektionsmethoden etabliert. Die ursprünglich von Sweeney et al.<sup>[340]</sup> verwendete Selektionsmethode beruht auf der Verwendung eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats (SA-AP, Abbildung 21B). Nachdem das überschüssige, nicht-peptidgebundene Protein entfernt wurde, wurde die Peptidbibliothek mit SA-AP inkubiert. Dabei kann das Konjugat sich durch die hohe Affinität zu Biotin an alle Harzkugeln anlagern, an denen bereits das biotinylierte Zielprotein gebunden war.<sup>[340]</sup> Sobald auch das überschüssige Konjugat entfernt wurde, wurde die Bindung des Zielproteins an die harzgebundene Peptidsequenz über eine Farbreaktion katalysiert durch die Alkalische Phosphatase-Einheit nachgewiesen. Durch Dephosphorylierung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) zu 5-Bromo-4-chloro-1H-indol-3-ol wird durch Keto-Enol-Tautomerie und Oxidation mit Luftsauerstoff der türkis-blaue Indigofarbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo gebildet. Dieser schlägt sich an der Oberfläche der Zielprotein-Konjugat-gebundenen Harzkugel nieder.<sup>[340]</sup> Die positiven Hits können darauffolgend unter dem Mikroskop selektiert werden.<sup>[340]</sup> Eine weitere Methode für die Selektion der positiven Hits ist der Einsatz von Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikeln (Abbildung 21A).<sup>[92]</sup> Mit dieser Methode können die harzgebundenen Peptidsequenzen, an die das biotinylierte Zielprotein gebunden hat, über magnetisches Sortieren identifiziert werden. Dabei haften die positiven Harzkugeln an einer magnetischen Oberfläche (z.B. Gefäßwand), während die negativen Hits auf den Gefäßboden sinken.<sup>[92]</sup> Häufig wird das magnetische Sortieren vor dem SA-AP-basierten

Screeningansatzes zum Zweck der Vorselektion der Peptidsequenzen durchgeführt.<sup>[92,95]</sup> Die Identifikation der Peptidsequenz erfolgt über partiellen Edman-Abbau (PED) gekoppelt mit MALDI-MS (Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisierung-Massenspektrometrie), ein Verfahren, dass im nächsten Kapitel näher erläutert wird.<sup>[343,344]</sup> Die Anzahl der positiven Hits hängt von der Spezifität der Peptidbibliothek, den Screening-Bedingungen, der Bindungsaffinität und der Stärke der Protein-Peptid-Interaktionen ab.<sup>[340,345]</sup>

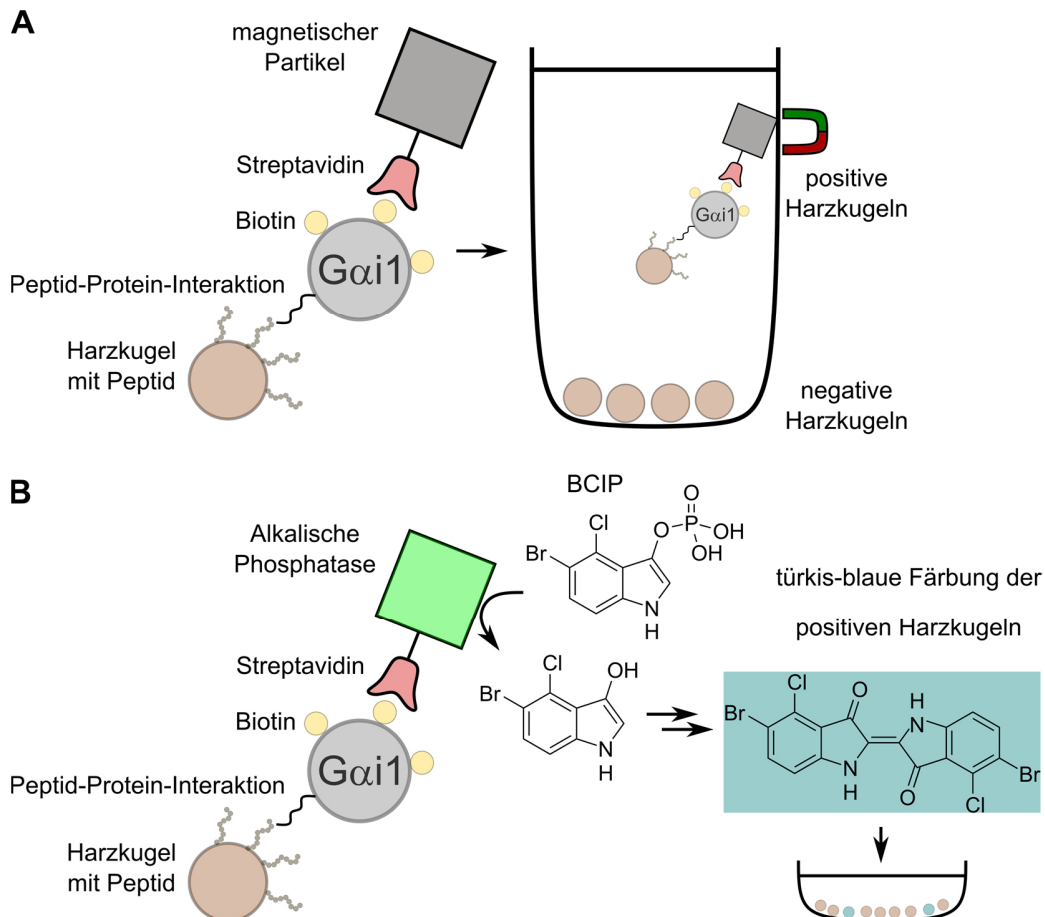


Abbildung 21: Schematische Darstellung des SA-basierten Screeningansatzes. **A:** Magnetische Selektion: Die Peptid-Protein-Interaktion wird durch ein Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikel nachgewiesen, durch Bindung an eine magnetische Gefäßwand. **B:** SA-AP-basierte Selektion: Die Peptid-Protein-Interaktion wird durch ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat durch BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)-Färbung nachgewiesen.

Die Arbeitsgruppe um Dehua Pei hat seit der ersten Anwendung von Sweeney et al.<sup>[340]</sup> eine Vielzahl an kombinatorischen Peptidbibliotheken mittels der Split-und-Pool-Methode hergestellt und gegen diverse Zielproteine gescreent.<sup>[92,93,96,340,345]</sup> Zunächst wurden sogenannte one-bead-one-compound (OBOC) Bibliotheken verwendet.<sup>[58,60,346]</sup> Der Begriff OBOC bedeutet, dass an einer Harzkugel nur eine Peptidsequenz in vielfacher Ausfertigung gebunden ist, da während der Synthese mehrere, äquivalente Peptidketten unter denselben chemischen Bedingungen verlängert werden.<sup>[60,346]</sup> Um auch makrozyklische Peptide (mono- oder bityklich) zu screenen, wurden in der Folgezeit auch one-bead-two-compound (OBTC) Bibliotheken etabliert.<sup>[92,347]</sup> Durch das Anwenden einer speziellen Synthesetechnik wird dabei die parallele Synthese von zwei verschiedenen Peptidstrukturen an einer Harzkugel erreicht.<sup>[347]</sup> An der äußeren Sphäre der



Harzkugel wird die makrozyklische Peptidsequenz synthetisiert, gegenüber der das Bibliotheksscreening durchgeführt wird. In der inneren Sphäre befindet sich die entsprechende lineare Peptidsequenz („encoding tag“), um die Peptidsequenz des makrozyklischen Peptids über PED-MALDI-MS zu identifizieren.<sup>[92,347]</sup>

Insgesamt ist durch die Verwendung dieser Screening-Methode die Identifikation von diversen, strukturell unterschiedlichen Peptiden möglich. Durch den SPPS-basierten Syntheseansatz ist der Einbau von nicht-proteinogenen Aminosäuren leicht möglich, welches die Abdeckung eines großen chemischen Raums für die Interaktion mit dem Zielprotein ermöglicht.<sup>[346]</sup>

#### 2.4.2 PED-MALDI-MS

Die Methode des partiellen Edman-Abbaus (PED) wurde für die Sequenzierung von Protein- und Peptidsequenzen entwickelt und erstmals im Zusammenhang mit kombinatorischen Peptidbibliotheksscreenings von Wang et al.<sup>[344]</sup> eingesetzt.<sup>[344,348]</sup> Diese Technik basiert auf dem klassischen Edman-Abbau, ermöglicht jedoch im Vergleich eine schnellere und kostengünstigere Sequenzierung mit hohem Durchsatz.<sup>[343,344,348–351]</sup> Wie beim klassischen Edman-Abbau erfolgt beim PED ein N-terminaler Abbau der Protein- oder Peptidsequenz aminosäureweise in sich wiederholenden Reaktionszyklen mit den Schritten Phenylisothiocyanat (PITC)-Kopplung, Trifluoressigsäure (TFA)-Spaltung und Konvertierung mit Wasser.<sup>[349,351]</sup> Der Abbau findet an einer festen Trägersubstanz statt, sodass alle Reagenzien und Nebenprodukte einfach durch Waschen entfernt werden können. Nur die Peptidkette verbleibt am Trägermaterial, weshalb keine Isolation der Peptide nach jedem Zyklus erforderlich ist.<sup>[343,349]</sup> Beim PED wird innerhalb des Kopplungsschrittes neben PITC (90-95%) auch ein Cappingreagenz (5-10%) zugesetzt, welches auch an den N-Terminus der Peptidkette addiert, jedoch nicht unter den sauren Bedingungen des Folgeschritts abgespalten werden kann.<sup>[343,349]</sup> Als Konsequenz werden 90-95% der Peptidketten am Harz über den konventionellen Edman-Abbau N-terminal um eine Aminosäure verkürzt, während 5-10% der Peptidketten für den weiteren Abbau blockiert werden. Durch Wiederholung der Vorgehensweise werden insgesamt Peptidsequenzen unterschiedlicher Länge durch den N-terminalen Abbau des jeweiligen Peptids erhalten, was als Peptidleiter bezeichnet wird.<sup>[343,349]</sup> Nach Abspaltung der Peptidleiter vom Trägermaterial können die Aminosäuren innerhalb der kombinatorischen Positionen durch MALDI-MS identifiziert werden (Abbildung 22).<sup>[343,349]</sup> Die Massendifferenzen der einzelnen Ionenpeaks können einer spezifischen Aminosäure zugeordnet werden, wobei für Aminosäuren gleicher Massen zusätzlich Marker bei der Synthese eingesetzt werden, um diese im MALDI-MS unterscheidbar zu machen.<sup>[343,344,347,349]</sup> Die positiven Hits einer harzgebundenen Peptidbibliothek können über diese Methode einzeln betrachtet werden, da eine Selektion individueller Harzkugeln vor der Abspaltung der Peptidsequenzen vom Trägermaterial möglich ist.<sup>[343,344,347,349]</sup>

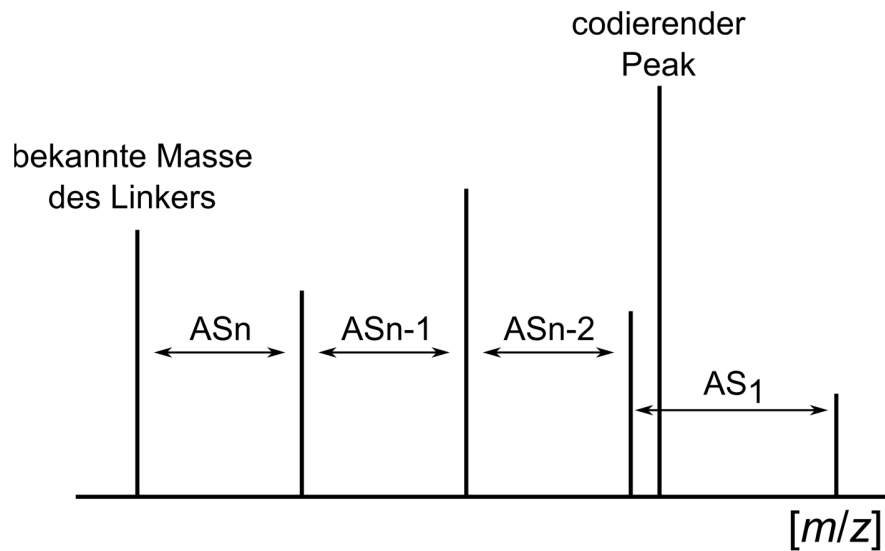


Abbildung 22: Schematische Darstellung eines MALDI-MS-Spektrums einer Peptidleiter aus einem partiellen Edman-Abbau (PED). Bei  $n$ -kombinatorischen Positionen kann die N-terminale Aminosäure ( $AS_1$ ) durch Vergleich der beiden höchsten  $[m/z]$ -Peaks identifiziert werden. Durch Vergleich der folgenden Peaks im niedrigeren  $[m/z]$ -Bereich können weitere Aminosäuren in C-terminaler Richtung bis zur C-terminalen Aminosäure ( $AS_n$ ) ermittelt werden. Die Sequenzierung endet bei der bekannten Masse der Linkereinheit. Durch codierende Peaks können Aminosäuren gleicher Masse durch gezielte Verwendung von Cappingsubstanzen bei der Synthese im MALDI-MS unterschieden werden.

### 3 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Identifizierung von Peptiden mittels Screenings zweier kombinatorischer Peptidbibliotheken und der Überprüfung ihres Potentials hinsichtlich Anwendung als Modulatoren der Gai/s-Proteinaktivität. Da bisher spezifische Gai/s-Modulatoren für die pharmakologische und medizinische Forschung und/oder Anwendung fehlen, sollte in diesem Zusammenhang eine Leitstruktur entwickelt werden. Diese Leitstruktur sollte weitere Einblicke in die G-Protein-vermittelten Signalwege und damit assoziierte Krankheitsbilder ermöglichen und perspektivisch die Wirkstoffentwicklung unterstützen.

Mittels des SA-basierten Screeningansatzes sollten zwei literaturbekannte kombinatorische Peptidbibliotheken nach Bindungssequenzen gegenüber verschiedenen  $G\alpha$ -Untereinheiten untersucht werden. Die Anwendbarkeit des Ansatzes sollte dabei durch das Screening einer linearen Peptidbibliothek<sup>[352]</sup> gegenüber Gai1·GDP getestet werden. Nach erfolgreicher Durchführung des ersten Ansatzes sollte eine bityklische Peptidbibliothek<sup>[92,93]</sup> nach Bindern für Gai1·GDP (inaktiv), Gai1·GMPPNP (aktiv), Gas·GDP (inaktiv) und Gas·GMPPNP (aktiv) gescreent werden. Um das Potential der identifizierten Peptide zu evaluieren, sollten Konsensussequenzen abgeleitet und vielversprechende Vertreter synthetisiert und analytisch charakterisiert werden. Darauffolgend sollte eine funktionelle Charakterisierung der Peptide erfolgen. Dafür sollten die Peptide auf ihre Bindungsaffinität gegenüber Gai1 und Gas (kurze Isoform) untersucht und ausgewählte Vertreter auf ihre funktionelle Aktivität in einem zellfreien und einem zellbasierten Ansatz getestet werden. Die Aktivitätstestungen sollten in Kooperation mit Prof. Dr. Hermann Ammer (LMU München) und Prof. Dr. Evi Kostenis (Universität Bonn) durchgeführt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten mit den bisher literaturbekannten Peptiden und Proteinen, die einen Einfluss auf die Gai/s-Proteinaktivität zeigen, verglichen werden. Das vielversprechendste Peptid aus dem ersten Ansatz sollte als Leitstruktur verwendet und weiter optimiert werden, mit der Intention die proteolytische Stabilität und die Zellpermeabilität des linearen Peptids zu erhöhen.

Parallel zu den experimentellen Studien sollten computerbasierte Analysen auf molekularer Ebene Einblicke in die Peptid-Protein-Interaktionen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) liefern. Die entsprechenden Arbeiten zur Erstellung der computerbasierten Peptidstrukturen und eines Gai1-Homologiemodells sowie die Molekulardynamiksimulationen (MD-Simulationen) und molekularen Dockings mit Gai1 und Gas sollten in enger Zusammenarbeit mit Dr. Ajay Abisheck Paul George (BioSolveIT GmbH, davor Universität Bonn) durchgeführt werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die  $G\alpha$ -Bindungsregionen der Peptide sollte mit den Kontaktflächen der literaturbekannten Gai/s-Bindern korreliert werden, um bevorzugte Regionen für die Adressierung der  $G\alpha$ -Untereinheit und einhergehend der  $G\alpha$ -Proteinaktivität abzuleiten. Diese Analyse sollte einen fundamentalen Beitrag zur gezielten Entwicklung von chemischen Werkzeugen für die Erforschung der Gai/s-vermittelten Signalwege und Krankheitsbilder liefern.

Zusammenfassend dient die vorliegende Dissertation der Identifizierung von potentiellen Gai/s-Proteinmodulatoren und Analyse der Gai/s-Zielstrukturen für die Entwicklung von chemischen Werkzeugen für die Erforschung von G-Protein-vermittelten Signalkaskaden.

## 4 Materialien und Methoden

Der Großteil der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurde in den Laboratorien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Diana Imhof (Universität Bonn) durchgeführt.

### 4.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden in hoher Qualität erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Für analytische Methoden, die Screeningexperimente, Bindungsstudien und funktionellen Studien wurden HPLC-gradient grade Lösungsmittel oder Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer Reinstwasseranlage (Purelab Flex, Veolia Water Technologies) verwendet. Für die Synthesen wurden synthesesreine Reagenzien und Lösungsmittel oder vollentsalztes Wasser eingesetzt. Es wurde nach den üblichen Methoden der präparativen Flüssig- und Festphasenpeptidchemie gearbeitet. Die Chemikalien für die funktionellen Studien wurden von Prof. Dr. Hermann Ammer und Prof. Dr. Evi Kostenis bereitgestellt und sind daher an dieser Stelle nicht näher aufgeführt.

Alle Abkürzungen für Aminosäuren und entsprechende Derivate wurden gemäß den Empfehlungen des *Nomenclature Committee of IUB* (NC-IUB) und des *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) verwendet, wobei die Aminosäuren L-konfiguriert sind, sofern es nicht anders angegeben ist.<sup>[353]</sup>

Tabelle 4: Eingesetzte Chemikalien/Reagenzien und Lösungsmittel.

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Acetanhydrid	Merck KGaA
Acetonitril (MeCN, HPLC-Qualität)	VWR International
Ammoniumiodid (NH <sub>4</sub> I)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Anisol	Fluka Analytical
H-Arg(Pbf)-2-chlortritylchloridharz	Iris Biotech GmbH
O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)	Novabiochem/Merck KGaA
Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)	Novabiochem/Merck KGaA
(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) (HBTU)	Iris Biotech GmbH
Bromcyan	Iris Biotech GmbH
5(6)-Carboxyfluorescein (Cf)	Novabiochem/Merck KGaA
(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat (COMU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
α-Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dichlormethan (DCM, HPLC-Qualität)	VWR International
Diethylamin (DEA)	Merck KGaA
Diethylether (technisch)	VWR International
Diisopropylethylamin (DIPEA)	Merck KGaA
Dimethylformamid (DMF, analysenrein und technisch)	VWR International

Dimethylsulfid (DMS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO, analysenrein)	Fluka Analytical
Dinatrium-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH
<i>Dulbecco's minimum essential medium</i> (DMEM)	Biochrom/Merck KGaA
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen Dynal AS
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Guaninnukleotiddiphosphat (GDP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Guanosine-5'-[(β,γ)-imido]triphosphat (GMPPNP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure (AcOH)	VWR International
Essigsäureanhydrid (Ac <sub>2</sub> O)	Merck KGaA
1,2-Ethandithiol	Fluka Analytical
Ethanol (EtOH, analysenrein)	Merck KGaA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Fluka Analytical
8-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl-amino)-3,6-dioxaoctanoic acid (Fmoc-Ado-OH)	Iris Biotech GmbH
N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (FmocOSu)	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Ala-OH·H <sub>2</sub> O, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH	ORPEGEN Pharma
Fmoc-D-Ala-OH·H <sub>2</sub> O, Fmoc-Lys(Biotin)-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Val-OH	Novabiochem/Merck KGaA
Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Dap(Aloc)-OH, Fmoc-D-Glu(tBu)-OH·H <sub>2</sub> O, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-2Nal-OH, Fmoc-D-2Nal-OH, Fmoc-Orn(Aloc)-OH, Fmoc-Phg-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH	Iris Biotech GmbH
Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Fpa-OH, Fmoc-Rinkamid-4-methylbenzhydrylaminharz (MBHA)	NeoMPS group SNPE
Fötales Rinderserum (FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i> )	Bachem Holding AG
HEK293 ( <i>human embryonic kidney cells</i> )	Iris Biotech GmbH
1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Biochrom/Merck KGaA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin)	Iris Biotech GmbH
Isophthalsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Isopropanol (HPLC-Qualität)	Fluka Analytical
Kaliumcyanid (KCN)	Alfa Aesar
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	VWR International
	Merck KGaA
	Merck KGaA

Methanol (MeOH, HPLC-Qualität)	VWR International
N-Methylimidazol	Merck KGaA
N-Methylmorpholin (NMM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International
Natriumdimethyldithiocarbamat·XH <sub>2</sub> O (SDDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH, 1M)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG
NHS-PEG <sub>4</sub> -Biotin	Thermo Fisher Scientific
Nicotinsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester (NicOSu)	Iris Biotech GmbH
Ninhydrin	Chemapol Lachema
Penicillin	Biochrom/Merck KGaA
Peptide Calibration Standard II	Bruker Daltonics GmbH
Phenol	Merck KGaA
Phenylisothiocyanat (PITC)	Thermo Fisher Scientific
Phenylsilan (Ph <sub>3</sub> SiH)	Alfa Aesar
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) ohne Calcium und Magnesium	Biochrom/Merck KGaA
Piperidin	Alfa Aesar
H-Pro-2-chlorotriethylchloridharz	Iris Biotech GmbH
Protein Calibration Standard I	Bruker Daltonics GmbH
Probenverdünnungspuffer	LaborService ONKEN
Puffer A-F	LaborService ONKEN
Pyridin	VWR International
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Roti®-Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (HCl, 1M)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase 1 (SA-AP-Enzym 1, Bonn)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase 1 (SA-AP-Enzym 2, Columbus)	Life Technologies™
Streptomycin	Biochrom/Merck KGaA
<i>tert</i> -Butanol	Alfa Aesar
Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) ([Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ])	Alfa Aesar
<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> 98% (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Thioanisol	Alfa Aesar
Triethylamin	Fluka Analytical
Trifluoressigsäure (TFA, analytisch)	Merck KGaA
Trifluoressigsäure (TFA, für die Synthese)	Solvay GmbH
Triisopropylsilan (TIPS)	Alfa Aesar
Trimesinsäure	Alfa Aesar
2,4,6-Trimethylpyridin (TMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween® 20	VWR International

## 4.2 Puffer und Lösungen

Für die pH-Wert-Einstellung der verschiedenen Pufferlösungen wurden 1 M Salzsäure und 1 M Natronlauge verwendet. Die einfach konzentrierte Arbeitslösung Roti®-Nanoquant für die Proteinbestimmung nach Bradford<sup>[354]</sup> wurde aus der fünffach konzentrierten Stammlösung nach den Herstellerangaben verdünnt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Puffer/Lösungen

Puffer	pH-Wert	Konzentration/Menge	Substanz
Blocking-Puffer 1	8,0	100 mM	Natriumchlorid
		20 mM	HEPES
		2mM	DTT
		1 mM	Magnesiumchlorid
		0,1%	Gelatine
Blocking-Puffer 2	7,4	150 mM	Natriumchlorid
		10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		2,7 mM	KCl
		1,8 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		1 mM	Magnesiumchlorid
		0,1%	Gelatine
MST-Puffer	8,0	100 mM	Natriumchlorid
		20 mM	HEPES
		2mM	DTT
		1 mM	Magnesiumchlorid
		5%	DMSO
		0,05%	Tween20®
NMT-Puffer	7,4	150 mM	Natriumchlorid
		20 mM	TRIS·HCl
		10 mM	Magnesiumchlorid
PBS-Puffer	7,4	150 mM	Natriumchlorid
		10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		2.7 mM	KCl
		1,8 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer	6,5	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
		50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Reagenz K	-	0,75 g	Phenol
		0,5 ml	Thioanisol
		0,25 ml	Ethandithiol

SA-AP-Puffer 1	7,4	250 mM	Natriumchlorid
		30 mM	Tris
		10 mM	Magnesiumchlorid
		0,07 mM	Zinkchlorid
SA-AP-Puffer 2	7,4	100 mM	Natriumchlorid
		30 mM	Tris
		5 mM	Magnesiumchlorid
		0,02 mM	Zinkchlorid
SA-AP-Reaktionspuffer 1	7,4	30 mM	Tris
		10 mM	Natriumchlorid
		5 mM	Magnesiumchlorid
		0,02 mM	Zinkchlorid
SA-AP-Reaktionspuffer 2	8,5	30 mM	Tris
		10 mM	Natriumchlorid
		5 mM	Magnesiumchlorid
		0,02 mM	Zinkchlorid
Screening-Puffer	8,0	100 mM	Natriumchlorid
		20 mM	HEPES
		2mM	DTT
		1 mM	Magnesiumchlorid
SPR-Puffer	7,4	150 mM	Natriumchlorid
		10 mM	HEPES
		1 mM	Magnesiumchlorid
		0,05%	Tween20®
Stopplösung	8,15	50 mM	Tris
		8 M	Guanidinhydrochlorid
Tris-Puffer	8,15	2 M	Tris



### 4.3 Geräte und Software

Tabelle 6: Allgemeine Ausrüstung und Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Analysenwaage GR-202-EC	A&D Instruments	Abingdon, GBR
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode (Harz), GER
Mikrozentrifuge MiniStar siverline	VWR International	Darmstadt, GER
Rotationsverdampfer Rotavapor RE111	BÜCHI Labortechnik	Flawil, CHE
Vakuumkonzentrator RVC 2-18 CD <sub>plus</sub>	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode (Harz), GER
Vakuumpumpe ChemStar 2070-02,	Welch by Gardner Denver	Fürstfeldbruck, GER
Vakuumpumpe Chemvac P6Z-101,		
Vakuumpumpe LVS 106 T-10 ef		
Vakuumpumpe MZ 2C NT	Vacuubrand®	Wertheim, GER
Vortex VF2	IKA® Labortechnik	Staufen, GER
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Zentrifuge EBA 20, Zentrifuge Mikro 20	Hettich	Tuttlingen, GER
Zentrifuge 5410	Eppendorf	Wesseling, GER

Zur Auswertung verschiedener Daten, Erstellung von Abbildungen und Verfassung der vorliegenden Dissertation wurden die folgenden Programme verwendet: Citavi (6.4.0.35), ChemDraw Prime (16.0), GIMP (2.10.20), GraphPad Prism (Version 7.04), Inkscape (0.92 1), Microsoft Office (2016) und YASARA<sup>[355]</sup> (19.9.17 und 20.4.24).

### 4.4 Methoden

#### 4.4.1 Reversed-phase Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)

##### *Analytische RP-HPLC*

Die analytische reversed-phase HPLC (RP-HPLC) wurde mit einem Shimadzu LC-10AT-System (Duisburg, Deutschland) ausgestattet mit einer Vydac-Säule (218TP54: C18, oder 208TP24: C8, Reverse Phase, 5 µm Teilchengröße, 300 Å Porengröße, 4,6 mm × 25 mm) für (nicht) gereinigte Peptide oder mit einem Shimadzu LC-20AD-System (Duisburg, Deutschland) ausgestattet mit einer Vydac-Säule (218TP54: C18, 5 µm Teilchengröße, 300 Å Porengröße, 4,6 mm × 250 mm) für gereinigte Peptide durchgeführt. Die Elution der Peptide erfolgte über einen Gradienten (1%/min) von Eluent B (0,1% TFA in MeCN) in Eluent A (0,1% TFA in ddH<sub>2</sub>O) bei einer Flussrate von 1 ml/min (Tabelle 7). Das Injektionsvolumen lag je nach Konzentration des zu untersuchenden Peptides zwischen 10 µl und 400 µl. Die Detektion fand photometrisch bei 220 nm statt.

Tabelle 7: Verwendete Gradienten bei der analytischen RP-HPLC.

Methoden-ID	Gradient
003030	0%-30% Eluent B in 30 min
004040	0%-40% Eluent B in 40 min
005050	0%-50% Eluent B in 50 min
006060	0%-60% Eluent B in 60 min
103525	10%-35% Eluent B in 25 min
104030	10%-40% Eluent B in 30 min
105040	10%-50% Eluent B in 40 min
204525	20%-45% Eluent B in 25 min
205030	20%-50% Eluent B in 30 min
206040	20%-60% Eluent B in 40 min
208060	20%-80% Eluent B in 60 min
306030	30%-60% Eluent B in 30 min

### *Semipräparative RP-HPLC*

Die Reinigung der Peptide wurde mit einer semipräparativen reversed-phase HPLC (RP-HPLC) erreicht. Dafür wurden die Peptide entweder mit einem Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt, Deutschland) PU-987 System (Duisburg, Deutschland) oder einem Shimadzu LC-8 System (Duisburg, Deutschland) isoliert. Peptidmengen bis zu 20 mg wurden mithilfe einer semipräparativen Vydac 218TP1022-Säule (C18 Reverse Phase, 250 mm x 22 mm, 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) und Peptidmengen zwischen 20-80 mg mittels einer semipräparativen Knauer Eurospher-Säule (C18 Reverse Phase, 250 mm x 32 mm, 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) gereinigt. Für jedes Peptid wurde ein Gradient entsprechend des Elutionsverhaltens in der analytischen RP-HPLC gewählt, wobei zum Eluieren der Peptide der Anteil an Eluent B (0,1% TFA in MeCN/ddH<sub>2</sub>O (9:1)) in Eluent A (0,1% TFA in ddH<sub>2</sub>O) bei einer Flussrate von 10 ml/min um 50% über 120 min variiert und die Peaks bei 220 nm detektiert wurden. Die Reinheit der Peptide (> 95%) wurde per analytischer RP-HPLC überprüft. Die entsprechenden Peptidfraktionen wurden lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4, Kapitel 4.3), vereinigt und bei -20 °C gelagert.

### **4.4.2 Massenspektrometrie**

Die Identität der Peptide wurde mittels massenspektroskopischer Analyse bestätigt, wobei die Flüssigkeitschromatographie (LC)-gekoppelte Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS, zusammen LC-ESI-MS) und die Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisierung-Massenspektrometrie (MALDI-MS) eingesetzt wurden.

### LC-ESI-MS

Die LC-ESI-MS-Analysen wurden mit einem micrOTOF-Q III-System (*Quadrupole time-of-flight*) der Firma Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland) verbunden mit einem Dionex Ultimate 3000 LC-System der Firma Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Das LC-System war mit einer EC 100/2 Nucleoshell RP18-Säule (C18 Reverse Phase, 100 mm × 2 mm, 2,7 µm Partikelgröße, 90 Å Porengröße) ausgestattet. Als Gradientensystem wurde 0,1% AcOH in MeCN (Eluent B) und 0,1% AcOH in ddH<sub>2</sub>O (Eluent A) verwendet. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 ml/min durch Erhöhung von Eluent B (0%-60% in 12 min). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Compass DataAnalysis 4.1.

### MALDI-MS

Die MALDI-MS-Messungen wurden an einem microFleX, einem Autoflex II-TOF/TOF, einem UltraFleX TOF/TOF, einem UltrafleXtreme TOF/TOF und einem 15 T SolariXR FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) aufgenommen und mit den Programmen mmass.exe 5.5.0 und FlexAnalysis 3.4 ausgewertet. Als MALDI-Target wurde eine MTP 384 target plate polished steel T F-Platte der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) verwendet. Für die MALDI-MS-Messungen am microFleX wurde das Target MSP 96 polished S/N01549 der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) eingesetzt. Die Kalibrierung der Spektrometer erfolgte mittels Protein Calibration Standard I (4-20 kDa) und Peptide Calibration Standard II (500-4000 Da).

Für die Peptidcharakterisierung wurde als Matrix eine gesättigte HCCA-Lösung (7 mg/ml) in 50% MeCN/ddH<sub>2</sub>O + 0,1% TFA verwendet. Die Peptide wurden entsprechend der Eigenschaften in verschiedenen Verhältnissen an MeCN/ddH<sub>2</sub>O + 0,1% TFA gelöst, 1 µl der Lösung mit 1 µl der HCCA-Lösung auf dem MALDI-Target gemischt und bei Raumtemperatur oder im Vakuum eingedampft. Die MALDI-Spektren wurden an dem Autoflex II-TOF/TOF und dem UltrafleXtreme TOF/TOF aufgenommen.

Für die PED-MS-Analysen (Kapitel 4.6.3) der OBOC-Hits wurde eine gesättigte HCCA-Lösung (7 mg/ml) in 50% MeCN/ddH<sub>2</sub>O mit 0,1% TFA hergestellt und die Peptide in 50% MeCN/ddH<sub>2</sub>O mit 0,1% TFA (3 µl) gelöst. Nachdem HCCA-Lösung (2 µl) zur Probe hinzugegeben wurde, wurden 2 µl der finalen Lösung auf das MALDI-MS-Target aufgetragen. Die MALDI-Spektren wurden an dem Autoflex II TOF/TOF und dem UltraFleX TOF/TOF aufgenommen.

Für die PED-MS-Analysen (Kapitel 4.6.3) der OBTC-Hits wurden die Peptide in einer 2:2:1-Mischung aus 0,1%TFA/ddH<sub>2</sub>O, 0,1%TFA/MeCN und Isopropanol (6 µl) gelöst, 1 µl mit einer gesättigten HCCA-Lösung (1 µl) gemischt und 1 µl auf das MALDI-Target aufgetragen. Die MALDI-Spektren wurden mit dem microFlex oder dem 15 T SolariXR FT-ICR aufgenommen.

#### 4.4.3 Aminosäureanalytik

Die Aminosäureanalyse wurde mit dem Aminosäureanalysator LC 3000 der Firma Eppendorf-Biotronik (Hamburg, Deutschland) ausgestattet mit einer Kationenaustausch-Säule (CK10M, Korngröße 4  $\mu\text{m}$ , Quervernetzung 10%, Mitsubishi Chemical Corporation, Tokyo, Japan) nur für die OBOC-Peptide durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Peptide für 24 h mit 6 N Salzsäure bei 100 °C hydrolysiert und in einem Vakuumkondensator (Vakuumkonzentrator RVC 2-18 CD<sub>plus</sub>, Kapitel 4.3) bei 60 °C für 5 h getrocknet. Die Proben wurden in Probenverdünnungspuffer aufgenommen und mittels eines Costar Spinx Centrifuge Tube Filter gefiltert. Die Detektion erfolgte mit Ninhydrin bei 570 nm und 440 nm durch Vergleich mit einem geeichten Aminosäurestandard (Laborservice Onken, Gründau, Deutschland). Die ermittelte Aminosäurezusammensetzung entsprach den theoretischen Erwartungen. Der berechnete Peptidgehalt wurde zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Auf Basis des **GPM-1**- und **Cf-GPM-1**-Peptidgehalts wurde eine Eichgerade mittels analytischer RP-HPLC für die Konzentrationsbestimmungen der weiteren Peptide hergestellt.

#### 4.4.4 UV-VIS-Spektroskopie

UV-VIS-Messungen wurden an einem Multiscan GO UV-VIS-Spektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland), einem Ultrospec 2100 *pro* der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) und einem NanoDrop™ One<sup>C</sup> der Firma Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Nach Einstellung der entsprechenden Wellenlänge wurde zunächst eine Nullwertmessung und anschließend die Probenmessung durchgeführt.

#### 4.4.5 Sequenzierung mittels Edman-Abbau

Die N-terminale Sequenzierung von Btn-**GPM-1c** und der entstandenen Nebenprodukte (zweifach biotinyliertes Produkt (zur Kontrolle) und N-terminal biotinyliertes Produkt) wurde mit einem Shimadzu PPSQ-53A Proteinsequenzer (Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurde das jeweilige Peptid in 0,5% Essigsäure gelöst, 10 pmol des Peptids auf eine Polybren-behandelte Glasfaserscheibe aufgetragen und anschließend 10 min im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurden zwei Zyklen der N-terminalen Sequenzierung nach Edman durchgeführt. Die derivatisierten Aminosäuren wurden isokratisch mittels RP-HPLC auf einer Shimadzu LC-20AT mit einer Wakopak® Wakosil PTH-II-Säule (C18, Reverse Phase, 4,6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße) getrennt, bei 269 nm detektiert und durch Vergleich mit einer PTH-Standardmischung identifiziert.

### 4.5 Expression und Reinigung der G $\alpha$ -Proteine

Die entsprechende Etablierung der Protokolle für die Expression und anschließende Reinigung nach Tesmer et al.<sup>[132]</sup>, Lee et al.<sup>[356]</sup>, Chen et al.<sup>[191]</sup>, McCusker et al.<sup>[357]</sup>, Liss<sup>[358]</sup> und Burgess et al.<sup>[359]</sup> erfolgte durch Dr. Toni Kühl in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Diana Imhof. Die weitere Optimierung der Protokolle erfolgte ebenfalls durch Dr. Toni Kühl sowie Anna Pepanian. Das Gas-Protein wurde in einem 15 l-Bioreaktor in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erwin A. Galinski (Universität Bonn) von Dr. Toni Kühl exprimiert. Die Gai1-Expression und die

Reinigung der Gai/s-Proteine wurde von Dr. Toni Kühl, Sabrina Linden und Anna Pepanian durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden für diese Promotionsarbeit bereitgestellt.

Die G $\alpha$ -Proteinexpression von Gai1 und Gas wurde in transformierten *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen mit einem pET28a (+)-Plasmid und einer DNA-Sequenz, die für eine Hexahistidin-Enterokinase-Sequenz [Met-Gly-Ser-Ser-(His)<sub>6</sub>-Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg-Ser-(Asp)<sub>4</sub>-Lys] und die Gai1- (UniProt ID: P63096) oder Gas- (kurze Isoform, UniProt ID: P63092-2) codierende Sequenz abzüglich des ersten Methionins nach Suzuki et al.<sup>[360]</sup> beinhaltet, durchgeführt.<sup>[191,360,361]</sup> Die eingeführten Vektorkonstrukte enthielten einen Kanamycin-Resistenzmarker. Die Gai1-Proteinexpression und -Reinigung erfolgte nach Tesmer et al.<sup>[132]</sup>, Lee et al.<sup>[356]</sup> und Chen et al.<sup>[191]</sup> und lieferte ca. 400 mg/10 l Kultur. Für Gas wurde ein anderer Expressions- und Reinigungsansatz verwendet werden, da die erhaltenen Mengen aus dem für Gai beschriebenen Protokoll nur sehr geringe Mengen ergaben, ein Phänomen, welches bereits in der Literatur beschrieben wurde.<sup>[356,357]</sup> Dafür wurde ein modifiziertes Protokoll nach Tesmer et al.<sup>[132]</sup>, Lee et al.<sup>[356]</sup>, Chen et al.<sup>[191]</sup>, McCusker et al.<sup>[357]</sup>, Liss<sup>[358]</sup> und Burgess et al.<sup>[359]</sup> in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Diana Imhof entwickelt und verwendet. Es wurden ca. 50-70 mg Gas pro 10 l Kultur erhalten. Die Reinheit der proteinhaltigen Fraktionen wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung nachgewiesen (Abbildung 23).<sup>[137]</sup>

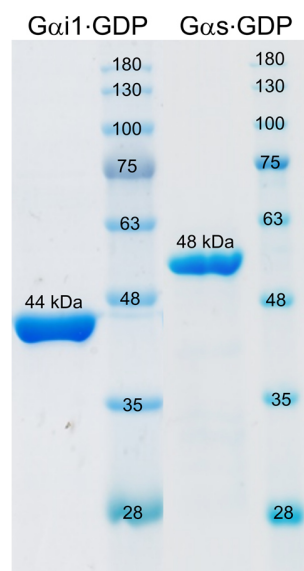


Abbildung 23: SDS-PAGE der rekombinant exprimierten und gereinigten Gai1/s-GDP-Proteine. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Die GDP-gebundenen Gai1/s-Proteinproben wurden mit 10% Glycerin schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Gai1/s-Proteinproben wurden kurz vor Gebrauch auf Eis aufgetaut und die Lagerungslösung mittels PD-10-Säule (Sephadex<sup>TM</sup> G-25 M mit 0,1% Kathon<sup>TM</sup> CG, GE Healthcare UK) gegen den gewünschten Puffer nach den Herstellerangaben ausgetauscht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford<sup>[354]</sup> mit der Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung nach den Herstellerangaben.

## 4.6 Screening der kombinatorischen Peptidbibliotheken und Analyse

Für das Screening der kombinatorischen Peptidbibliotheken wurden Protokolle nach Sweeney et al.<sup>[340]</sup>, Imhof et al.<sup>[345]</sup>, Lian et al.<sup>[92]</sup> und Qian et al.<sup>[362]</sup> angewendet. Für das erste Screeningexperiment wurde eine kombinatorische OBOC-Peptidbibliothek der Form  $A_2X_4[C/H/Y]X_4B_4RM$ -Tentagel-S-NH<sub>2</sub>-Harz<sup>[352]</sup> verwendet. Diese Peptidbibliothek setzt sich aus zwei N-terminalen Alaninresten (A), acht randomisierte Positionen X (P-4 bis P-1 und P+1 bis P+4) mit achtzehn möglichen proteinogenen Aminosäuren (außer Cystein und Methionin) sowie Norleucin (Nle, isoster zu Methionin), einer zentralen, teilrandomisierten Position P0 mit den Aminosäuren Cystein/Histidin/Tyrosin, sowie der Linkereinheit aus vier  $\beta$ -Alaninen (B), einem Arginin (R) und einem Methionin (M) zusammen. Die Bindung an das Tentagel-S-NH<sub>2</sub>-Harz (0,3 mmol/g,  $\varnothing = 90 \mu\text{m}$ ) erfolgt über das Methionin.<sup>[352]</sup>

Für das zweite Screeningexperiment wurde eine bityklische OBTC-Peptidbibliothek (90  $\mu\text{m}$ , ~100 pmol Peptide/Harzkuigel;  $2,86 \cdot 10^6$  Harzkuigel/g, Abbildung 24) von Lian et al.<sup>[92]</sup> und Upadhyaya et al.<sup>[93]</sup> verwendet, die in der äußeren Sphäre das bityklische Peptid und in der inneren Sphäre die entsprechende lineare Peptidvariante aufweist.<sup>[92,93]</sup>

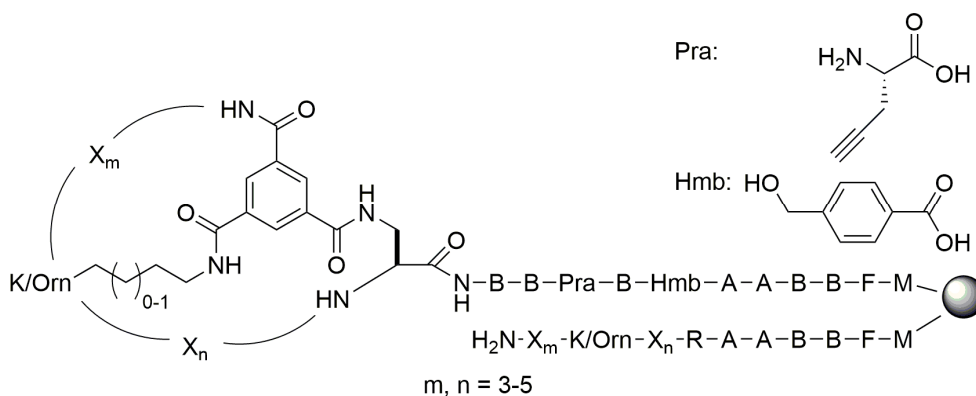


Abbildung 24: Verwendete bityklische Peptidbibliothek von Lian et al.<sup>[92]</sup> und Upadhyaya et al.<sup>[93]</sup>

Die folgenden Aminosäuren können in den kombinatorischen Positionen enthalten sein: 10 proteinogene Aminosäuren (Ala, Arg, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Ser, Trp, Tyr), 4 nicht-proteinogene  $\alpha$ -L-Aminosäuren (L-4-Fluorophehnylalanin (Fpa), L-Norleucin (Nle), L-Ornithin (Orn), L-Phenylglycin (Phg)) und 10 D-Aminosäuren (D-2-Naphthylalanin (D-Nal), D-Ala, D-Asn, D-Glu, D-Leu, D-Lys, D-Phe, D-Pro, D-Thr, D-Val).

### 4.6.1 Biotinylierung der $G\alpha$ -Proteine und Nukleotidaustausch

Die Gai1- und Gas (kurze Isoform)-Proteine wurde von Dr. Toni Kühl und Sabrina Linden (beide Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) für die Screeningexperimente bereitgestellt (Kapitel 4.5). Die Biotinylierung der Proteine erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Toni Kühl.

Für die Biotinylierung der  $G\alpha$ -Proteine wurde NHS-Biotin (2,5  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ ) in DMSO gelöst und mit der  $G\alpha$ -Proteinlösung (1  $\mu\text{g}$ , 0,6  $\mu\text{mol/l}$ , in Screeningpuffer) bei Raumtemperatur für 60 min gerührt. Anschließend wurde Tris-Puffer hinzugegeben, die Lösung für weitere 10 min gerührt und das biotinylierte  $G\alpha$ -Protein mittels PD-10-Säule isoliert. Nach

Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test<sup>[354]</sup> wurde die  $\alpha$ -Proteinlösung aliquotiert, mit 10% Glycerol schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum Gebrauch gelagert.<sup>[137]</sup>

Für den Nukleotidaustausch wurde ein Protokoll von Upadhyaya et al.<sup>[93]</sup> und Maurer et al.<sup>[363]</sup> abgeleitet. Dafür wurden die  $\alpha$ -Untereinheiten (Gai1:  $8\text{ }\mu\text{M}$ ; Gas:  $4\text{ }\mu\text{M}$ , in Screeningpuffer) mit EDTA ( $40\text{ mM}$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$  pH 7,5) und GMPPNP ( $2\text{ mM}$  in PBS-Puffer pH 7,4) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde  $60\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  (in PBS pH 7,4) hinzugegeben, weitere 10 min inkubiert und das  $\alpha$ -Protein mittels Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting column ( $2\text{ ml}$ , Thermo Scientific, eingespült mit  $5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  in PBS-Puffer pH 7,4) isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test<sup>[354]</sup> wurden die  $\alpha$ -Proteine aliquotiert und schnellst möglichst verbraucht oder nach Schockfrieren für wenige Tage gelagert.

#### 4.6.2 Screening der kombinatorischen Peptidbibliotheken

##### *OBOC-Screening*

In analogen Ansätzen wurde abgeleitet von Sweeney et al.<sup>[340]</sup>  $20\text{--}45\text{ mg}$  der harzgebundenen Peptidbibliothek intensiv mit DCM, MeOH und  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend mit Blockingpuffer 1 bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Darauf folgte ein Waschschrift mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und die Inkubation mit biotinyliertem Gai1·GDP ( $0,1\text{--}1\text{ }\mu\text{M}$ , Kapitel 4.6.1) für 4 h (später auf 1 h reduziert). Nachdem die harzgebundene Peptidbibliothek 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit SA-AP-Puffer 1 ( $800\text{ }\mu\text{l}$ ) und Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase (SA-AP-Enzym 1,  $1\text{ }\mu\text{l}$ ,  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) vorsichtig geschüttelt wurde, wurden die Harzkugeln mit SA-AP-Puffer 1 und SA-AP-Reaktionspuffer gewaschen, mit BCIP ( $100\text{ }\mu\text{l}/\text{Ansatz}$ ,  $5\text{ mg/ml}$  in SA-AP Reaktionspuffer 1) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Stopplösung ( $1\text{ ml}/\text{Ansatz}$ ) hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  erfolgte die Selektion der positiven Hits anhand der türkis-blauen Farbe mittels Mikroskop Stemi DV4 der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland).

##### *OBTC-Screening*

Das Screening der bityklischen Peptidbibliothek wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Dehua Pei, Dr. Curran A. Rhodes und Amritendu Koley (alle Ohio State University, Columbus, Ohio, USA) im Rahmen eines Forschungsaufenthalts in den Laboratorien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dehua Pei durchgeführt.

Mit der bityklischen Peptidbibliothek wurden zwei Screeningrunden nach Lian et al.<sup>[92]</sup> und Qian et al.<sup>[362]</sup> durchgeführt. Vor dem Screeningexperiment wurden die Harzkugeln gründlich mit DCM, DMF,  $\text{ddH}_2\text{O}$  und Blockingpuffer 2 gewaschen und 60 min mit Blockingpuffer 2 bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In der ersten Runde wurde  $180\text{ mg}$  (Btn-Gai·GDP:  $272\text{ mg}$ ) der harzgebundenen Peptidbibliothek mit biotinylierten Gai1·GDP, Gai1·GMPPNP, Gas·GDP oder Gas·GMPPNP ( $0,5\text{ }\mu\text{M}$ ) in Blockingpuffer 2 bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindestens 2 h inkubiert (Kapitel 4.6.1). Anschließend wurde die harzgebundene Peptidbibliothek mit Streptavidin-beschichteten Dynabeads ( $10\text{ }\mu\text{l}$ ) in Blockingpuffer 2 ( $1\text{ ml}$ ) für 60 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das magnetische Selektieren wurde mittels eines Dynal MPC<sup>TM</sup>-1 Magnetic Particle Concentrator (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) in

Blockingpuffer 2 durchgeführt, wobei die Harzkugeln vorsichtig entlang des Magneten pipettiert wurden. Nachdem die negativen Hits vom Gefäßboden abgenommen wurden, wurde der Magnet entfernt. Die positiven Hits sanken auf den Gefäßboden und konnten entnommen werden. Anschließend wurden die negativen Hits drei weitere Runden des magnetischen Selektierens unterzogen, um möglichst alle positiven Hits für die zweite Screeningrunde zu erhalten. Anschließend wurden die selektierten Harzkugeln gründlich mit DCM, DMF, ddH<sub>2</sub>O und Blockingpuffer 2 gewaschen und für 60 min mit Blockingpuffer 2 bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation mit biotinyliertem Gai1·GDP, Gai1·GMPPNP, Gas·GDP oder Gas·GMPPNP (0,2-0,5 µM) in Blockingpuffer 2 bei 4 °C für mindestens 2 h wurde für 10 min bei 4 °C mit SA-AP-Enzym 2 (1 µl, 1 µg/µl) in Blockingpuffer 2 (1 ml) inkubiert. Darauffolgend wurden die Harzkugeln mit Blockingpuffer 2 und SA-AP-Reaktionspuffer 2 gewaschen und anschließend mit SA-AP-Reaktionspuffer (900-950 µl) und BCIP (50-100 µl, 5 mg/ml in SA-AP-Reaktionspuffer 2) im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zur Entwicklung eines guten Farbkontrasts (maximal 60 min) inkubiert. Die Färbung wurde mittels HCl (1 M, 1 ml) gestoppt und die türkis-blau-gefärbten Harzkugeln unter dem Mikroskop (Stereomaster 12-562-1, Fisher Scientific International, Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) vereinzelt.

#### 4.6.3 Partiieller Edman-Abbau und massenspektrometrische Analyse

##### *PED OBOC-Hits*

Es wurden zwölf Zyklen nach Sweeney et al.<sup>[343]</sup> durchgeführt, wobei je nach Aminosäureposition das Verhältnis von PITC (variierende Menge in Pyridin) und NicOSu (Cappingreagenz, 8,8 mg in 92 µl Pyridin (71,2 µl der 0,43 M Lösung mit PITC-Lösung gemischt)) von 7:1 nach 3:1 variiert wurde (Tabelle 8, Tabelle 9).<sup>[352,364]</sup> Zwischen 100-200 Harzkugeln wurden mit einer frisch hergestellten NicOSU-PITC-Lösung (160 µl) und einem Lösungsmittelgemisch (160 µl) aus Pyridin und ddH<sub>2</sub>O (2:1) mit 0,1% Triethylamin versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur und 400 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Harzkugeln mit DCM, MeOH und 100% TFA gewaschen und zweimal für 5 min mit 100% TFA geschüttelt. Nach Waschen der Harzkugeln mit ddH<sub>2</sub>O, MeOH, Pyridin und dem Lösungsmittelgemisch wurde ein neuer Zyklus mit unmittelbar frisch hergestelltem Reaktionsgemisch gestartet. Für den finalen Cappingschritt wurden die Harzkugeln mit NicOSU in Pyridin (0,4 M, 160 µl) zusammen mit dem Lösungsmittelgemisch (160 µl) für 5 min bei Raumtemperatur und 400 U/min geschüttelt. Anschließend wurde mit DCM, MeOH und 100% TFA gewaschen.<sup>[352,364]</sup>

Tabelle 8: Verhältnisse der Reagenzien beim partiellen Edman-Abbau. Die Konzentrationen der PITC-Stammlösungen lagen zwischen 0,33 M und 0,81 M und die der NicOSu-Stammlösung betrug 0,43 M. Die Bezeichnung „Capping“ bedeutet, dass die restliche Sequenz vollständig mit 0,4 M NicOSu geblockt und kein PITC mehr hinzugesetzt wurde.<sup>[364]</sup>

Position	A	A	X1	X2	X3	X4	[C/H/Y]	X5	X6	X7	X8	Linker
PITC/NicOSu	7:1	7:1	6:1	6:1	5:1	5:1	5:1	4:1	4:1	3:1	3:1	Capping



Tabelle 9: Volumina von PITC in Pyridin entsprechend des PITC-NicOSU-Verhältnisses.<sup>[352,364]</sup>

PITC/NicOSu	V(PITC) [ $\mu$ l]	V(Pyridin) [ $\mu$ l]	c(PITC) [M]
7:1	23,8	245	0,81
6:1	20,4	248	0,69
5:1	17,0	252	0,56
4:1	13,6	255	0,45
3:1	10,2	259	0,33

*PED OBTC-Hits*

Der PED der OBTC-Hits wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Dehua Pei, Dr. Curran A. Rhodes und Amritendu Koley (alle Ohio State University, Columbus, Ohio, USA) im Rahmen eines Forschungsaufenthalts in den Laboratorien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dehua Pei durchgeführt.

Während dem PED wurden die OBTC-Hits mit einer 60:1-Mischung aus PITC und FmocOSu (Cappingreagenz) in allen 11 Zyklen nach Thakkar et al.<sup>[349]</sup> versetzt. Zunächst wurden die Harzkugeln mit DMF entfärbt und mit ddH<sub>2</sub>O, Pyridin und einem Lösungsmittelgemisch aus Pyridin und ddH<sub>2</sub>O (2:1) mit 0,1% Triethylamin gewaschen. Anschließend wurden die Harzkugeln mit dem Lösungsmittelgemisch (160  $\mu$ l) und der FmocOSu-PITC-Mischung (160  $\mu$ l) für 6 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die FmocOSu-PITC-Mischung wurde dafür frisch aus einer FmocOSu-Stammlösung (148  $\mu$ l, 0,02 mmol, 13,5 mM in Pyridin) und PITC (12  $\mu$ l, 0,12 mmol) hergestellt. Anschließend wurden die Harzkugeln mit Pyridin, DCM und 100% TFA gewaschen und zweimal für 6 min bei Raumtemperatur mit 100% TFA inkubiert. Nach Waschen mit DCM, Pyridin und dem Lösungsmittelgemisch wurde ein neuer Zyklus durch Inkubation mit der FmocOSu-PITC-Mischung gestartet. Im Anschluss an den letzten Zyklus wurde mit DCM, DMF und 20% Piperidin in DMF gewaschen und die harzgebundene Peptidbibliothek zweimal für 10 min bei Raumtemperatur mit 20% Piperidin in DMF inkubiert. Anschließend wurde mit DMF, DCM und TFA gewaschen.

*Methionin-Reduktion und Bromcyanabspaltung: OBOC- und OBTC-Hits*

Die Methionin-Reduktion erfolgte für 20-30 min bei 4 °C mit 100% TFA (1 ml), DMS (10  $\mu$ l) und wenigen Kristallen Ammoniumiodid. Darauffolgend wurden die Harzkugeln intensiv mit Wasser gewaschen und mittels Mikroskop vereinzelt. Die Abspaltung der Peptidleitern vom Harz erfolgte durch eine Bromcyanabspaltung (20  $\mu$ l einer 40  $\mu$ g/ $\mu$ l Lösung in 70% dissoziierter TFA) bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln. Anschließend wurde die Abspaltungslösung mittels Gefriertrocknung (Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4) oder Speed-Vac (Vakuumkonzentrator RVC 2-18 CD<sub>plus</sub>, beide Kapitel 4.3 oder SpeedVac Concentrator Savant SPD131DDA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) entfernt.

*MALDI-MS-Analyse*

Die massenspektrometrische Analyse der OBOC- und OBTC-Hits erfolgte nach den Angaben in Kapitel 4.4.2. Die Auswertung der MALDI-MS-Spektren aus dem OBOC-Screening erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Toni Kühl (Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) und für das OBTC-Screening in Zusammenarbeit mit Amritendu Koley und Prof. Dr. Dehua Pei (beide Ohio State University, Columbus, Ohio, USA). Die folgenden Massendifferenzen einschließlich der codierenden Peaks bei isobaren Aminosäuren sind für die PED-Analyse verwendet worden (Tabelle 10, Tabelle 11). Nach einer charakteristischen Massendifferenz von Lys, Orn und manchmal Tyr, Thr, Ser sind plus  $m/z$  119 Masseneinheiten durch die Addition und Hydrolyse von PITC an die Seitenkette möglich, was bei der Analyse der OBTC-Hits beobachtet wurde. Dies führte zu einem zusätzlichen Peptid-Leiterleserahmen. Zudem wurden bei Lys innerhalb der Analyse der OBOC-Hits plus  $m/z$  105 Masseneinheiten durch die Addition von NicOSu an die Seitenkette festgestellt.

Tabelle 10: Aminosäuren in den kombinatorischen Positionen der OBOC-Peptidbibliothek und deren Massen im Peptid mit den entsprechenden codierenden Peaks.<sup>[352]</sup>

Aminosäure	Masse [ $m/z$ ]	Codierender Peak
Glycin	57,02	
Alanin	71,04	
Serin	87,03	
Prolin	97,05	
Valin	99,07	
Threonin	101,05	
Cystein (nur P0)	103,01	
Isoleucin	113,08	
Norleucin (Nle)	113,08	+8
Leucin	113,08	-6
Asparagin	114,04	
Asparaginsäure	115,03	
Glutamin	128,06	
Lysin	128,09	-6, +105
Glutaminsäure	129,04	
Histidin	137,06	
Phenylalanin	147,07	
Arginin	156,10	
Tyrosin	163,06	
Tryptophan	186,08	

Tabelle 11: Aminosäuren in den kombinatorischen Positionen der OBTC-Peptidbibliothek und deren hochaufgelösten Massen im Peptid (Messung am 15 T SolariXR FT-ICR) mit den entsprechenden codierenden Peaks.<sup>[92,93]</sup>

Aminosäure	Masse [m/z]	Codierender Peak
Glycin	57,0215	
Alanin	71,0371	
D-Alanin	71,0371	+45
Serin	87,0320	(+119)
D-Prolin	97,0528	
D-Valin	99,0684	
D-Threonin	101,0477	(+119)
Isoleucin	113,0841	
Norleucin (Nle)	113,0841	+58
D-Leucin	113,0841	+45
D-Asparagin	114,0429	
Ornithin	114,0793	+45, +119
Ornithin (P0)	114,0793	+58, +119
Asparaginsäure	115,0269	
Glutamin	128,0586	
D-Lysin	128,0950	+45, +119
Lysin (P0)	128,9450	+58, +119
D-Glutaminsäure	129,0426	
Phenyglycin (PhG)	133,0528	
Histidin	137,0589	
D-Phenylalanin	147,0684	
Arginin	156,1011	
Tyrosin	163,0633	(+119)
p-Fluorophenylalanin (Fpa)	165,0590	
Tryptophan	186,0793	
D-Naphthylalanin	197,0841	

#### 4.7 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Die Synthese aller Peptide oder Peptidvorläufer erfolgte durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) unter Verwendung der Fmoc-Strategie. Bei den manuellen Syntheseschritten wurde die Harzbeladung über das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt innerhalb des Fmoc-Abspaltungsschritt (20% Piperidin/DMF, 1 ml/100 mg Harz, 1x 5 min, 1x 15 min) nach Gleichung (1) mit  $d = 1$  cm,  $\epsilon = 6089$  l/mol·cm und  $\lambda = 289,8$  nm per UV-VIS-Spektroskopie (Kapitel 4.4.4) bestimmt.<sup>[365]</sup>

$$(1) \text{ Beladung } \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = E_{289,8} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot V(\text{Stammlösung}) / (\epsilon \cdot m(\text{Harz}) \cdot d)$$

### Synthese der OBOC-Hits

Die Synthese der OBOC-Peptide (Peptid **1-13**, HPQ-Peptid **1-2**) erfolgte automatisiert an einem Fmoc-Rinkamid-4-MBHA-Harz (je 100 mg, 0,53 mmol/g) und die Synthese von KB-752 (Kontrolle) an einem H-L-Arg(Pbf)-2-chlortritylharz (100 mg, 0,4 mmol/g) über einen ResPep SL Peptidsyntheseautomaten der Firma Intavis Instruments GmbH (Köln, Deutschland) nach dem standardisierten Fmoc-Protokoll (Angaben beziehen sich auf 100 mg Harz). Zur Vorbereitung des Harzes wurde dieses mit DMF (4x 400  $\mu$ l) gewaschen. Die Fmoc-Abspaltung (1x 5 min, 1x 10 min) erfolgte mit 20% Piperidin in DMF (400  $\mu$ l). Darauf folgend wurde wieder mit DMF (6x 500  $\mu$ l) gewaschen. Für die Kopplung (1. 1x 15 min, 2. 1x 20 min) wurden die entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäurederivate (4 Äq., 210  $\mu$ l, 0,5 M in DMF), HBTU (4 Äq., 200  $\mu$ l, 0,5 M in DMF) als Kopplungsreagenz, NMM (9 Äq., 50  $\mu$ l, 50% in DMF) als Base und DMF (2  $\mu$ l) als Lösungsmittel eingesetzt. Zwischen den beiden Kopplungsschritten wurde mit DMF (500  $\mu$ l) gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit DMF (6x 500  $\mu$ l). Die Peptidkette wurde entsprechend durch eine alternierende Abfolge von Fmoc-Abspaltung und Aminosäurekopplung N-terminal verlängert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung (1. 2x 10 min, 2. 1x 15 min) wurde mit DMF (1. 2x 600  $\mu$ l, 2. 6x 500  $\mu$ l) sowie DCM (3x 600  $\mu$ l) gewaschen. Nach Beendigung der Synthese wurde das harzgebundene Peptid getrocknet.<sup>[137]</sup>

### Synthese der **GPM-1-Derivate**

Die Derivate von **GMP-1** (H-RWLRYLRYP-NH<sub>2</sub>) wurden über manuelle SPPS hergestellt, wobei im Falle von **GPM-1b** und **GPM-1c** die Synthese der **GPM-1**-Sequenz und bei **GPM-1 Y5A** (H-RWLRALRYP-NH<sub>2</sub>) sowie Peptid **14** (H-KRWLRYLRYP-NH<sub>2</sub>) die Synthese der gesamten Sequenz automatisiert erfolgte (je 100 mg Harz, 1 ml Lösungsmittel/100 mg Harz, siehe Synthese der OBOC-Hits). Vor Beginn der Synthese wurde das Harz für 20 min mit DMF gequollen. Zwischen den manuellen Schritten wurde entweder mit DMF gewaschen oder eine Kombination von DMF- und DCM-Waschschriffen durchgeführt. Für die manuellen Syntheseschriffe von **GPM-1b** und **GPM-1c** wurden die entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäuren (4 Äq.), HBTU (4 Äq.) und HOBt (4 Äq.) als Kopplungsreagenzien und DIPEA (8 Äq.) als Base verwendet (1. Kopplung: 30 min, 2. Kopplung: 60 min). Die Synthese von **GPM-1b** erfolgte an einem H-Pro-2-chlorotritylchloridharz (0,70 mmol/g), wobei nach Synthese der **GPM-1**-Sequenz manuell Boc-Lys(Fmoc)-OH gekoppelt wurde. Nach Abspaltung des Peptidvorläufers einschließlich aller Seitenkettenschutzgruppen (außer der Fmoc-Schutzgruppe) vom Harz (Kapitel 4.8), wurde das Peptid in Lösung mit PyBOP (6 Äq.) und DIPEA (12 Äq.) zyklisiert. Anschließend erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe in Lösung mit Diethylamin (DEA, 20 Äq.) in DMF (20  $\mu$ l/ $\mu$ mol). Alle anderen **GPM-1-Derivate** wurden am Fmoc-Rinkamid-4-MBHA-Harz (0,53 mmol/g) synthetisiert. Im Falle von **GPM-1c** wurde die harzgebundene **GPM-1**-Sequenz um die Sequenz Phe-2Nal-(Arg)<sub>4</sub>-Lys verlängert. Diese Sequenz wurde ebenso als Peptid **15** (H-Phe-2Nal-(Arg)<sub>4</sub>-Lys-NH<sub>2</sub>) entsprechend synthetisiert. Nach Beendigung der Synthesen wurden die harzgebundenen Peptide getrocknet.<sup>[137]</sup>

Für die Synthese von **GPM-1d** und **GPM-1e** wurde HATU (4 Äq.) als Kopplungsreagenz und NMM (8 Äq.) als Base verwendet (1. Kopplung: 30 min, 2. Kopplung: 60 min). Zunächst wurde die Harzbeladung des Fmoc-Rinkamid-4-MBHA-Harzes (0,53 mmol/g) reduziert. Dies wurde erreicht, indem die erste Aminosäure, Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,6 Äq.) im Unterschuss (HATU: 0,6 Äq. und

NMM: 1,2 Äq.) gekoppelt wurde und anschließend die freien Aminofunktionen am Harz durch Acetylierung geblockt wurden. Vor der Acetylierung wurde ein Beladungstest mit einer kleinen Harzmenge mittels Fmoc-Abspaltung und Beladungsbestimmung durchgeführt. Die Acetylierung erfolgte für 30 min mittels Acetanhydrid (1 µl/mg Harz) und N-Methylimidazol (2 µl/mg Harz) in DMF (3 µl/mg Harz). Anschließend wurde das erfolgreiche Blockieren der freien Aminofunktionen mittels Kaisertest überprüft. Für den Kaisertest wurde eine kleine Menge Harz mit EtOH/AcOH (1:1) gewaschen, jeweils 2 Tropfen der Lösungen 1) KCN (0,02 mM) in Pyridin, 2) Ninhydrin (0,28 M) in EtOH, und 3) Phenol (0,043 M) in EtOH hinzugegeben und für 5 min bei 100 °C erhitzt. Nach gründlichem Waschen mit EtOH zeigte eine Blaufärbung freie Aminofunktionen an (Positivkontrolle), wohingegen keine Färbung die erfolgreiche Blockierung demonstrierte. Nachdem die Harzbeladung reduziert wurde, wurde abgeleitet von Lian et al.<sup>[92,366]</sup> im Falle von **GPM-1d** die Sequenz Phe-2Nal-(Arg)<sub>4</sub>-Lys mittels Fmoc-Phe-OH, Fmoc-2Nal-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH, dann Fmoc-Dap(Aloc)-OH und anschließend die **GPM-1**-Sequenz sowie Isophthalsäure gekoppelt. Für die Synthese von **GPM-1e** wurde Fmoc-Dap(Aloc)-OH, analog zu **GPM-1d** die Sequenz Phe-2Nal-(Arg)<sub>4</sub>-Lys, sowie Fmoc-Lys(Aloc)-OH, die **GPM-1**-Sequenz und Trimesinsäure (1x 60 min) gekoppelt. Anschließend wurde in beiden Fällen die Aloc-Abspaltung (**GPM-1d**: von Dap, **GPM-1e**: von Dap, Lys) unter Argon durch Umsetzung (3x 20 min) mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,5 Äq.) und Phenylsilan (10 Äq.) in DCM erreicht. Darauf folgend wurde mit DCM, DMF, 1% SDDC/DMF, DMF und DCM gewaschen. Die Zyklisierung erfolgte am Harz mit PyBOP (10 Äq.), HOBt (10 Äq.) und NMM (20 Äq.) in 4 h. Anschließend wurden die Harze getrocknet.<sup>[137]</sup>

#### Synthese der OBTC-Hits

Die Synthese der bizyklischen Peptide aus dem OBTC-Screening erfolgte nach Lian et al.<sup>[92,366]</sup> am Fmoc-Rinkamid-4-MBHA-Harz (0,53 mmol/g), wobei wiederum die Harzbeladung (auf 0,25-0,33 mmol/g) durch Umsatz mit Fmoc-Lys(Boc)-OH reduziert wurde (siehe **GPM-1d-e**). Anschließend erfolgte analog zur **GPM-1e**-Synthese die Kopplung von Fmoc-Dap(Aloc)-OH, der randomisierten Peptidsequenz, wobei die zentrale Aminosäure (Lys/Orn) mit der Aloc-Schutzgruppe seitenkettengeschützt eingesetzt wurde, und anschließend von Trimesinsäure. Als Kopplungsreagenz wurde HATU (4 Äq.) und als Base NMM (8 Äq.) verwendet, außer bei der Kopplung von Fmoc-Phg-OH, in diesem Falle wurde nach Liang et al.<sup>[367]</sup> entsprechend COMU (4 Äq.) und TMP (8 Äq.) eingesetzt.<sup>[367]</sup> Die Abspaltung der Aloc-Schutzgruppen und die Zyklisierung am Harz wurden analog zur **GPM-1d-e**-Synthese durchgeführt. Nach der Synthese wurden die Harze getrocknet.

## 4.8 Abspaltung der Peptide

Zur Abspaltung der Peptide vom Rinkamid-4-MBHA-Harz und Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen wurden bei 4 °C zunächst Reagenz K (150 µl/100 mg Harz) und anschließend 95% TFA (1 ml/100 mg Harz) zum harzgebundenen Peptid gegeben. Die Mischung wurde anschließend bei Raumtemperatur für 3 h geschüttelt und danach gefiltert. Das abgespaltene Peptid wurde in eiskalten Diethylether gefällt und durch mehrere Zentrifugations- und Resuspensionschritte mit Diethylether gewaschen. Das Pellet wurde in unterschiedlichen Verhältnissen von MeCN/ddH<sub>2</sub>O + 0,1% TFA oder 80% *tert*-Butanol/ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und

gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4, Kapitel 4.3). Anschließend wurden die Peptide semipräparativ gereinigt (Kapitel 4.4.1).

Für die Abspaltung vom 2-Chlorotriylchlorid-Harz wurde mit TIPS (2,5%) und ddH<sub>2</sub>O (2,5%) statt Reagenz K als Scavenger abgespalten. Durch die sauren Abspaltungsbedingungen bleibt die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe während der Abspaltung bei der **GPM-1b**-Synthese gebunden.

## 4.9 Derivatisierung der Peptide

### *Fluoreszenzmarkierung der Peptide*

Die Fluoreszenzmarkierung der linearen Peptide erfolgte harzgebunden am N-Terminus mit 5(6)-Carboxyfluorescein (Cf, 2 Äq.), PyBOP (2 Äq.) als Kopplungsreagenz und DIPEA (3 Äq.) als Base in DMF (2x 60 min). Anschließend wurde gründlich mit DMF und DCM im Wechsel gewaschen. Die Abspaltung der Peptide vom Harz (Kapitel 4.8) und die semipräparative Reinigung per RP-HPLC (Kapitel 4.4.1) erfolgte analog zu den nicht markierten Peptiden.<sup>[137]</sup>

Die Fluoreszenzmarkierung von **GPM-1b** und **GPM-1d** erfolgte in Lösung an der Lysinseitenkette nach Trinh et al.<sup>[96]</sup> Dafür wurden die Peptide (1,5 mg) in DMSO (34 µl) und NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (34 µl, 100 mM, pH 8,5) gelöst, FITC (15 µl, 10 µg/µl in DMSO) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 40 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 50% TFA/ddH<sub>2</sub>O (7,5 µl) hinzugegeben und das Peptid per RP-HPLC (Shimadzu LC-10AT, Vydac218TP54-Säule, Kapitel 4.4.1) gereinigt. Die HPLC-Reinheit der Peptide lag bei >98%.<sup>[137]</sup>

### *Biotinylierung von **GPM-1**, **GPM-1c**, **GPM-1d** und Peptid 15*

Die Synthese von Btn-**GPM-1** und Btn-**15** erfolgte automatisiert am Fmoc-Rinkamid-4-MBHA-Harz (0,53 mmol/g) über SPPS nach der Fmoc-Strategie mit dem ResPep SL Peptidsyntheseautomaten der Firma Intavis Instruments GmbH (Köln, Deutschland). Als erstes wurde Fmoc-Lys(Biotin)-OH (4 Äq.), dann Fmoc-Ado-OH (4 Äq.) und anschließend die entsprechende Aminosäuresequenz (4 Äq. der Fmoc-Derivate) von **GPM-1** und **15** mit HBTU (4 Äq.) und NMM (9 Äq.) gekoppelt (siehe OBOC-Hits, Kapitel 4.7). Die Abspaltung der Peptide vom Harz (Kapitel 4.6.) und die semipräparative Reinigung per RP-HPLC (Kapitel 4.4.1) wurde analog zu den nicht markierten Peptiden durchgeführt.<sup>[137]</sup>

Die Biotinylierung von **GPM-1c** und **GPM-1d** erfolgte mit NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin in Lösung an der Lysinseitenkette nach den Herstellerangaben. Nachdem die Peptide (1-2 mg) in DMSO (50 µl) und Phosphatpuffer (950 µl, 50 mM, pH 6,5) gelöst wurden, wurde NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin (**GPM-1c**: 0,5 Äq., **GPM-1d**: 5 Äq., 10 mM in DMSO) hinzugegeben und 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Peptide per RP-HPLC (Shimadzu LC-10AT, Vydac218TP54-Säule, Kapitel 4.4.1) gereinigt. Die HPLC-Reinheit der Peptide lag bei >98%. Da bei der Biotinylierung von **GPM-1c** sowohl der N-Terminus, also auch (wie gewünscht) die Lysinseitenkette biotinyliert werden konnte, wurde das Peptid mit dem korrekten Biotinylierungsmuster per Edman-Sequenzierung (Kapitel 4.4.5) identifiziert.<sup>[137]</sup>

## 4.10 Bindungsstudien

### *Microscale Thermophorese (MST)-Messungen*

Die Microscale Thermophorese (MST)-Messungen wurden in den Laboratorien von Prof. Dr. Michael Famulok und Prof. Dr. Matthias Geyer (beide Universität Bonn) an zwei Monolith NT115-Geräten (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die  $\alpha$ -Proteine wurden von Sabrina Linden und Anna Pepanian bereitgestellt (Kapitel 4.5).

Die  $\alpha$ -Proteine (Gai1·GDP und Gas·GDP) wurden mittels PD-10 Säule auf den Screening-Puffer eingespült und nach Zusatz von 5% DMSO und 0,05% Tween20® (entspricht MST-Puffer) seriell in MST-Puffer verdünnt (0,5-40.000 nM). Die fluoreszenzmarkierten Peptide wurden in DMSO gelöst, 1:20 in DMSO-freien MST-Puffer verdünnt und auf eine finale Konzentration von 100 nM in MST-Puffer eingestellt. Für die Bindungsstudien wurden die Peptidlösung und die entsprechenden  $\alpha$ -Proteinkonzentrationen 1:1 (v/v) verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen in Monolith NT115 Standardglaskapillaren (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland) aufgenommen und die Thermophorese in zwei Zyklen bei 50% LED-Power und 40% MST-Power gemessen. Die Daten wurden basislinienkorrigiert, auf die Kurvenamplitude normiert und mit GraphPad Prism 7.0 analysiert. Zur Auswertung und Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) wurde die von NanoTemper Technologies GmbH bereitgestellte Gleichung (2) verwendet.<sup>[137]</sup>

$$(2) f(c) = \text{frei} + \frac{(\text{gebunden} - \text{frei})}{2 \cdot c_{\text{Peptid}}} \cdot \left( c + c_{\text{Peptid}} + K_d - \sqrt{(c + c_{\text{Peptid}} + K_d)^2 - 4 \cdot c \cdot c_{\text{Peptid}}} \right)$$

Für das Konkurrenzexperiment von **GPM-1** und KB-752 wurden 200 nM Cf-KB-752 und 200 nM Gai1·GDP 1:1 (v/v) gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde **GPM-1** (1,22-10.000 nM) hinzugegeben 1:1 (v/v) und unmittelbar die Lösungen in Monolith NT115 Standardglaskapillaren (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland) aufgenommen und die Thermophorese gemessen. Als Kontrolle wurde ein Experiment ohne den Zusatz von **GPM-1** durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden auf die maximale Amplitude normiert, indem die vollständige Bindung von Cf-KB-752 und Gai1·GDP abzüglich der maximalen Verdrängung durch die höchste **GPM-1**-Konzentration geteilt wurde. Der  $IC_{50}$ -Wert wurde über das One-Site-Fit  $\log IC_{50}$ -Modell (3) in GraphPad Prism 7.0 berechnet.<sup>[137]</sup>

$$(3) Y = \text{unteres Plateau} + (\text{oberes Plateau} - \text{unteres Plateau}) / (1 + 10^{(X - \text{Log}(IC_{50}))})$$

### *Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)-Messungen*

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)-Messungen wurden in den Laboratorien von Prof. Dr. Matthias Geyer (Universität Bonn) an einem Biacore 8K-Gerät (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) bei 25 °C in SPR-Puffer durchgeführt. Die  $\alpha$ -Proteine wurden von Sabrina Linden und Anna Pepanian bereitgestellt (Kapitel 4.5), die Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit Dr. Kornelia Hampel (Biaffin GmbH & Co KG).

Ein Streptavidin-beschichteter Sensorchip (Serie S, Sensorchip SA, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) wurde mit 1 M NaCl/50 mM NaOH-Lösung nach Angaben des Herstellers konditioniert. Die biotinylierten Peptide wurden bei einer Flussrate von 10  $\mu$ l/min für 1 min bis zu

einem Level von 600 RU (Btn-**GPM-1**, Btn-**15**) oder 1200 RU (Btn-**GPM-1c**, Btn-**GPM-1d**) an die Flusszelle 2 des Sensorchips immobilisiert. Die Flusszelle 1 wurde als Kontrollfläche nicht beladen. Für die Bindungsstudien wurden steigende, seriell verdünnte Gα-Proteinkonzentrationen (Gα1·GDP: 15-2.000 nM und Gαs·GDP: 7,8-1.000 nM in SPR-Puffer) für 2 min bei einer Flussrate von 30 µl/min über den Sensorchip geleitet (Assoziation). Nach der Injektion der Proteinlösung erfolgte die Dissoziation mit SPR-Puffer für 400 s. Anschließend wurde die Chip-Oberfläche dreimal mit 200 mM NaCl/10 mM NaOH für 15 s bei einer Flussrate von 30 µl/min regeneriert. Die Auswertung und Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) erfolgte mittels Biacore™ Insight Evaluation Software 3.0.12.15655 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) und GraphPad Prism 7.0 mit dem 1:1 (Gα1, n=1) oder dem 1:2 (Gαs, n=2) *steady state* Modell (4).<sup>[137]</sup>

$$(4) Y = RU_{max} \cdot X^{(n/(K_d^n + X^n))}$$

#### 4.11 MTT-Test

Der MTT-Test wurde von Dr. Maryam Shetab Boushehri in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alf Lamprecht (Universität Bonn) in Zusammenarbeit durchgeführt.

Die HEK293-Zellen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10% FBS (fötales Rinderserum), 50 µg Streptomycin und 50 U/ml Penicillin bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid und 95% befeuchteter Luft kultiviert. Um die Toxizität der Peptide auf die Zellen zu bestimmen, wurden die HEK293-Zellen in eine 96-Wellplatte mit einer Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^4$  pro Well ausgesät. Nach erfolgter Adhärenz wurden die Zellen über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen der unterschiedlichen Peptide inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, 0,5 mg/ml) für 90 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die MTT-Kristalle in MTT-Lösung gelöst und die Absorption bei 540 nm gemessen. Die Überlebensrate der HEK293-Zellen in % wurde relativ zur unbehandelten Kontrolle bestimmt.<sup>[137]</sup>

#### 4.12 Funktionelle Studien

##### *ELISA-basierter Aktivitätstest*

Der ELISA-basierte Aktivitätstest wurde in Kooperation von Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer (LMU, München) mit Unterstützung von Dr. Maximilian Muehlhaupt in den Laboratorien von Prof. Dr. Hermann Ammer durchgeführt.

Der Effekt der Peptide auf die intakte inhibitorische oder stimulatorische G-Protein-vermittelte Signaltransduktion wurde in einem zellfreien System mit Membranpräparationen von Neuroblastoma x glioma (NG108-15 cells) Hybridzellen, die ein hohes Level von endogenen δ-Opioidrezeptoren (0.67 pmol/mg Membranprotein) und humanen β2-adrenergen Rezeptoren (1.03 pmol/mg Membranprotein) aufweisen, durchgeführt.<sup>[368]</sup> Die NG108-15 Hybridzellen wurden in DMEM mit 5% FBS (v/v), 100 µM Hypoxanthin, 1 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid und 95% befeuchteter Luft kultiviert. Subkonfluente Monolagen (70% Dichte) wurden geerntet, die Membranen wie in



der Literatur beschrieben präpariert und in Aliquots in NMT-Puffer in einer Konzentration von 2 mg/ml Protein bei -80 °C gelagert.<sup>[369]</sup> Für die Testung des Peptideffekts wurden die Membranen aufgetaut und 300 µg mit den entsprechenden Peptiden (50 µM in 25% DMSO; Stammlösung: 200 µM in DMSO) in NMT-Puffer (300 µl) 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Adenylatzyklase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen, nach direkter Stimulation mit Forskolin (10 µM) und nach Aktivierung stimulierender und hemmender Rezeptoren mit maximal wirksamen Konzentrationen von Isoproterenol (10 µM β<sub>2</sub>-Adrenozeptor) bzw. DADLE ([Tyr-D-Ala<sup>2</sup>-Gly-Phe-D-Leu<sup>5</sup>]Enkephalin, 10 µM, δ-Opioidrezeptor) bestimmt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 µl der zuvor inkubierten Membranen zu einem Testsystem (final 100 µl) gestartet, das final 40 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,2 mM EGTA, 0,2 mM DTT, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ATP, 5 µg/ml Phosphokreatin, 5 IU/ml Kreatinphosphokinase, 10 µM GTP, 10 µM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin), 5% DMSO und die jeweiligen Peptide (10 µM) enthielt. Nach 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von eiskalter HCl (10 mM, 500 µl) gestoppt.<sup>[369]</sup> Die Menge an gebildeten cAMP wurde nach Acetylierung mit einem generischen cAMP-ELISA nach Horton et al.<sup>[370]</sup> bestimmt. Die cAMP-Spiegel wurden auf die Forskolin-stimulierten cAMP-Werte normalisiert, die in Gegenwart von DMSO allein in einem Kontrollexperiment erhalten wurden, und mit GraphPad Prism 7.0 ausgewertet.<sup>[137]</sup>

#### *Zellbasierter Aktivitätstest*

Der zellbasierte Aktivitätstest wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Evi Kostenis von Dr. Suvi Annala, Eva Marie Pfeil und Ulrike Rick mit einem *cAMP Gs dynamic kit* (Cisbio GmbH, Berlin, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die HEK293-Zellen (American Type Culture Collection (ATCC)) wurden in DMEM bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid und 95% befeuchteter Luft kultiviert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Es wurden 500 Zellen/Well in eine 384-Wellplatte ausgesät, in Assaypuffer mit 1 mM IBMX suspendiert und für 15 min inkubiert. Nachdem die Zellen für 2 h mit dem entsprechenden Peptid oder Lösungsmittel inkubiert wurden, wurde mit Iper-6-phth<sup>[371,372]</sup> (100 µM) für 30-35 min stimuliert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Lysepuffer, der die HTRF® -Reagenzien enthält, beendet. Nach der Inkubation für mindestens 1 h bei Raumtemperatur wurden die HTRF-Verhältnisse mit dem Mithras LB 940 Multimode-Reader (Berthold Technologies, Oak Ridge, Tennessee, USA) bei 665 nm und 620 nm gemessen, dann gemäß den Herstellerangaben in nm-Werte umgerechnet und auf das Isoproterenol-Signal normalisiert.<sup>[137]</sup>

## 4.13 Computerbasierte Studien

Die computerbasierten Studien wurden von Dr. Ajay Abisheck Paul George (BioSolveIT GmbH, vorher Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) in enger Zusammenarbeit durchgeführt.

### 4.13.1 Molekulare Modellierung und Erstellung eines Gai1-Homologiemodells

#### *Peptidmodelle*

Die 3D-Strukturen für die Peptide (**GPM-1**, **GPM-1b-d**, **GPM-1 Y5A** und Peptid **15**) wurden mittels YASARA<sup>[355]</sup> (Version 19.7.17) generiert. Dafür wurden die Peptidsequenzen in das FASTA-Format übersetzt, wobei die nicht standardisierten Aminosäurereste L-2-Naphthylalanin (2Nal), (S)-2,3-Diaminopropionsäure (Dap) und Isophthalsäure (Ipa) durch proteinogene Aminosäurereste als Platzhalter ersetzt wurden. Die 2Nal-Reste in **GPM-1c**, **GPM-1d** und **15** sowie Ipa in **GPM-1d** wurden zunächst als Phenylalanin im FASTA-Format dargestellt. In ähnlicher Weise diente ein Serin als Platzhalter für Dap in **GPM-1d**. Nachdem die FASTA-Dateien in YASARA geladen wurden, wurden die Platzhalter manuell in die gewünschten Strukturen geändert. Ebenso wurde die C-terminale Säureamidfunktion bei allen Peptiden und die entsprechenden Zyklisierung für **GPM-1b** und **GPM-1d** an den linearen Strukturen ergänzt. In diesem Stadium wiesen die meisten Peptide Bindungen mit unnatürlichen Längen auf und wurden daher einer Energieminimierung mit YASARA (Version 20.4.24, YASARA Biosciences GmbH, Wien, Österreich, Amber ff14SB-Kraftfeld<sup>[373]</sup>) unterzogen. Die Kraftfeldparameter für alle nicht-natürlichen Aminosäuren wurden mit der in YASARA implementierten AutoSMILES (<http://www.yasara.org/autosmiles.htm>)-Methode abgeleitet. Die Methode verwendet das AM1-BCC Modell<sup>[374]</sup> zur Berechnung der atomaren Teilladungen und das *General Amber Force Field* (GAFF)<sup>[375]</sup> zur Bestimmung der restlichen Kraftfeldterme. Das YASARA2-Kraftfeld wurde für die Energieminimierung durch simuliertes *Annealing* verwendet, einschließlich der Optimierung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks und der Äquilibration der Hydrathülle, bis eine Systemkonvergenz erreicht wurde. Die so erstellten energieminierten Peptidstrukturen wurden als Startkoordinaten für alle weiteren rechnerischen Analysen verwendet. Die Abbildungen wurden mit YASARA (YASARA Structure, Version 20.4.24, YASARA Biosciences GmbH, Wien, Österreich, [www.yasara.org](http://www.yasara.org)) und POVray (Persistence of Vision Raytracer Pty. Ltd., Williamstown, Australien [www.povray.org](http://www.povray.org)) erstellt.<sup>[137]</sup>

#### *Gai1-Homologiemodell*

Das Gai1-Homologiemodell wurde mithilfe des in YASARA (Version 20.4.24) verfügbaren Protokolls erstellt. Die Zielsequenz wurde zusammen mit explizit definierten Strukturen (PDB: 3UMS<sup>[135]</sup>, PDB: 5JS8<sup>[136]</sup> und PDB: 1Y3A<sup>[152]</sup>) als Vorlage in das Programm eingespeist. Die einzelnen Schritte wurden vom Programm automatisiert und ohne weitere Benutzereingriffe analog zu einer früheren Studie durchgeführt.<sup>[137,376]</sup>

### 4.13.2 Molekulardynamik-Simulationen und Molekulares Docking

#### *Peptidmodelle*

Molekulardynamik (MD)-Simulationen wurden für 100 ns mit den Peptiden **GPM-1**, **GPM-1b-d**, **GPM-1 Y5A** und Peptid **15** durchgeführt, um ein 3D-Konformationsensemble zu erzeugen. Die Simulationen wurden mit dem in YASARA verfügbaren Standardprotokoll (md\_run.mcr) unter Verwendung des Amber ff14SB<sup>[373]</sup> Kraftfeldes durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 4.13.1 erläutert, wurden die Kraftfeldparameter für die nicht-proteinogenen Aminosäuren mit der in YASARA implementierten AutoSMILES-Methode abgeleitet. Alle weiteren Parameter wurden identisch zu bereits etablierten Protokollen beibehalten.<sup>[137,376,377]</sup>

#### *Molekulares Docking und Simulation der gedockten Komplexe*

Die Blind-Docking-Simulationen wurden mit dem in YASARA implementierten „Ensemble Docking“-Ansatz<sup>[378,379]</sup> analog zu früheren Arbeiten durchgeführt.<sup>[377]</sup> Dabei wurden die Strukturen aus den MD-Simulationen der Peptide (**GPM-1**, **GPM-1b-d**, **GPM-1 Y5A**, Peptid **15**) an das erstellte Gai-Homologiemodell (Kapitel 4.13.1) und an Gas (PDB: 6EG8<sup>[143]</sup>, Kette I) gedockt. Die besten gedockten Posen der Peptid-Protein-Komplexe wurden basierend auf den vorhergesagten Bindungsenergien ausgewählt und analysiert. Als nächstes wurden die gedockten Peptid-Protein-Komplexe einer 50 ns-langen MD-Simulation unterzogen, äquilibriert und die Bindungsenergie der Gai-Peptid- und Gas-Peptid-Komplexe (**GPM-1b** und Peptid **15** wurden für Gas nicht durchgeführt) mit der in YASARA implementierten Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA)-Methode analog zu früheren Studien abgeschätzt.<sup>[137,377,380]</sup>

Die von YASARA erzeugten MD-Trajektorien wurden in das PDB-Format konvertiert und in VMD (Version 1.9.3) importiert, um die Entwicklung der strukturellen und energetischen Eigenschaften zu analysieren. SeeSAR 10.1 (BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Deutschland, 2020, [www.biosolveit.de/SeeSAR](http://www.biosolveit.de/SeeSAR)) wurde verwendet, um die atomaren Beiträge zu den Bindungsenergien ausgewählter Gai-GDP- und Gas-GDP-Simulationsschnappschüsse zu analysieren, wobei die im Programm implementierte HYDE-Scoring-Funktion<sup>[381]</sup> verwendet wurde. Darüber hinaus diente die Darstellung von HYDE-Coronas auf verschiedenen gebundenen Konformationen der GDP-Moleküle als visuelles Mittel, um die atomaren Beiträge zur Affinität zu veranschaulichen. SeeSAR wurde auch bei der unabhängigen Identifizierung und Validierung der potenziellen Bindungsstellen für die Peptide an Gai1/s unter Verwendung des DoGSiteScorer-Algorithmus<sup>[382]</sup> verwendet. Die Grafiken wurden mit VMD, SeeSAR und YASARA erstellt.<sup>[137]</sup>

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in zwei Masterarbeiten und einem Übersichtsartikel veröffentlicht.<sup>[17,383,384]</sup> Ein Originalartikel ist zur Begutachtung bei einer Fachzeitschrift eingereicht, ein weiteres Manuskript befindet sich in Vorbereitung.<sup>[137]</sup>

Wie bereits eingangs erwähnt, spielen G-Proteine eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl an (patho-)physiologischer Prozesse (Kapitel 2.2.1, 2.3.2). Aus diesem Grund wurden bereits umfassende Analysen der  $G\alpha$ -Untereinheit und deren Funktion in der Signaltransduktion sowie bei der Krankheitsentstehung und -progression durchgeführt und sind auch weiterhin Bestandteil aktueller Forschung.<sup>[14,15]</sup> Um Einblicke in die Signalweiterleitung einer einzelnen  $G\alpha$ -Subfamilie zu ermöglichen, sind Subfamilien-spezifische  $G\alpha$ -Proteinmodulatoren unabdingbar. Die pharmakologische Relevanz und das Potential dieser Modulatoren kann anhand der beiden Depsipeptide FR900359 (FR) und YM-254890 (YM) verdeutlicht werden, welche bereits in Untersuchungen von Aderhautkrebs und Asthma eingesetzt werden.<sup>[276,278]</sup> In Vorarbeit zu den in dieser Dissertation durchgeführten Analysen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Diana Imhof die  $G\alpha_q$ -Interaktion der beiden Depsipeptide und weiterer literaturbekannter und neu synthetisierter Derivate analysiert.<sup>[264,383]</sup> Die Studie lieferte mehrere wichtige Erkenntnisse, die fundamental für das Design der vorliegenden Arbeit waren. Eines der Erkenntnisse war, dass die Bindung von FR/YM in einer spezifischen Bindungstasche erfolgt, wobei nahezu die gesamte FR/YM-Struktur entscheidend für den pharmakologischen Effekt ist.<sup>[264,270]</sup> Da keines der Derivate eine bessere Aktivität als die beiden Leitstrukturen zeigte, konnten die folgenden Schlussfolgerungen getroffen werden: 1) Es ist eine Vielzahl an Interaktionen entscheidend für die spezifische Bindung und das inhibitorische Potential von FR und YM. 2) (Depsi-)Peptide können den G-Protein-vermittelten Signalweg durch Interaktion mit der  $G\alpha$ -Untereinheit modulieren. 3) Die genaue Kenntnis der Proteinoberfläche ist entscheidend für das Verständnis der Interaktion und die Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und somit für die Entwicklung neuer Modulatoren.<sup>[264]</sup> Peptidische Verbindungen sind somit in der Lage, die  $G\alpha$ -Proteinaktivität selektiv und spezifisch zu modulieren, was bisher für keine niedermolekularen Verbindungen in diesem Maße beschrieben wurde.<sup>[17,264,270]</sup> Peptide, im Speziellen makrozyklische Verbindungen, besitzen zudem den Vorteil, selektiv über eine größere Interaktion mit dem Zielprotein wechselwirken und PPIs unterbrechen zu können.<sup>[17]</sup>

Das hohe Potential von Peptiden für die Adressierung der  $G\alpha$ -Proteinaktivität kann auch für andere  $G\alpha$ -Subfamilien anhand der hoch-affin  $G\alpha_i/s$ -bindenden Peptide aus den Hochdurchsatzverfahren (Kapitel 2.3.3.4) verdeutlicht werden. KB-752 wurde beispielweise mittels eines Phage Display-Experiments als  $G\alpha_i1$ -Binder identifiziert und zeigte einen GEM-ähnlichen Effekt in einem membranbasierten Aktivitätstest.<sup>[152,331]</sup> Für dieses Peptid wurden allerdings keine Untersuchungen in zellbasierten Systemen beschrieben.<sup>[152,261,331]</sup>

Da bisher für die  $G\alpha_i/s$ -Subfamilien keine pharmakologischen Werkzeuge in FR/YM-Qualität existieren, sollten in der vorliegenden Dissertation durch peptidbasierte Hochdurchsatzscreenings potentielle Bindungssequenzen als mögliche Modulatoren für die  $G\alpha$ -Proteinaktivität identifiziert werden.

## 5.1 Screening einer OBOC-Peptidbibliothek gegen Gai1

### 5.1.1 Identifikation der Gai1-assoziierten Sequenzen

Es existieren verschiedene Hochdurchsatztechniken für die Identifikation von Peptiden als Binder an ein Zielprotein. In diesem Kontext stellen kombinatorische Peptidbibliotheken eine attraktive Möglichkeit dar, weil durch das Design der Bibliothek die Abdeckungen eines großen chemischen Raums für die spezifische Interaktion mit der Zielstruktur möglich ist.<sup>[27,59,346]</sup> Die Anwendbarkeit des SA-AP-basierenden Verfahrens (Kapitel 2.4.1) für die Identifizierung von  $\alpha$ -Bindern wurde anhand des Screenings einer OBOC-Bibliothek getestet.<sup>[137]</sup> Da bereits über diese Methodik Inhibitoren für das monomere G-Protein KRas identifiziert werden konnten, wurde dieser Ansatz als zielführend eingeschätzt.<sup>[93,95]</sup> Zu diesem Zweck wurde eine Peptidbibliothek der Form  $A_2X_4[C/H/Y]X_4B_4RM$ -Tentagel-S-NH<sub>2</sub>-Harz verwendet.<sup>[137,352]</sup> Innerhalb der Peptidbibliothek dient die B<sub>4</sub>RM-Einheit als flexibler Linker, die den Abstand zwischen der Harzkugel und der individuellen Peptidsequenz vergrößert. Dadurch werden die Peptidsequenzen räumlich zugänglicher für die Bindung des Zielproteins und mögliche Interaktionen mit der Harzoberfläche reduziert. Ebenso ist die Beschaffenheit des Linkers entscheidend für die Analyse der Peptidsequenz über PED-MALDI-MS, z.B. Argininrest(e) für die Ionisierung und Methionin für die Abspaltung der Peptidsequenz vom Harz über saure Bromcyanspaltung.<sup>[340,352]</sup> Die beiden N-terminalen Alanine dienen als Startpunkt für die Sequenzdeterminierung per MALDI-MS.<sup>[352]</sup> Insgesamt kann die verwendete Peptidbibliothek als Nonapeptidbibliothek  $X_4[C/H/Y]X_4$  bezeichnet werden, da die randomisierten Positionen X (18 proteinogene Aminosäuren (außer Cys, Met) und Nle) und die partiell randomisierte zentrale Position P0 [C/H/Y] variabel sind.<sup>[352]</sup> Die Auswahl dieser Peptidbibliothek wurde an dem Aufbau der bereits bekannten  $\alpha$ -bindenden Peptide angelehnt, da FR/YM aus acht Aminosäurebausteinen und R6A-1 (Kapitel 2.3.3.4) aus neun Aminosäuren besteht.<sup>[260,268,385]</sup> Zudem legt der sieben Aminosäure lange Konsensus des GEM-Motivs (Kapitel 2.3.1.4) nahe, dass die entscheidenden Proteinkontakte durch eine kurze Aminosäuresequenz vermittelt werden können.<sup>[210,213]</sup> Daher wurde angenommen, dass sieben bis neun Positionen ausreichend für eine spezifische und hoch-affine Bindung sein können.<sup>[137]</sup>

Für die Identifizierung von Gai1·GDP-bindenden Peptiden wurde die OBOC-Peptidbibliothek mittels des SA-AP-basierten Ansatzes mit biotinyliertem Gai1·GDP, welches von Dr. Toni Kühl und Sabrina Linden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Diana Imhof bereitgestellt und anschließend in Zusammenarbeit biotinyliert wurde, gescreent ( $\sim 8,6 \cdot 10^5$  harzgebundene Peptidsequenzen). Die positiven Hits ( $\sim 600$ ) wurden nach Sweeney et al.<sup>[340,343]</sup> über ihre türkis-blaue Farbe unter dem Mikroskop selektiert und per PED-MALDI-MS auf ihre Sequenz analysiert (Abbildung 25).<sup>[340]</sup> Es wurden 101 Sequenzen vollständig gelöst und für umfassende Analysen in Betracht gezogen (Anhang, Tabelle 21).<sup>[137]</sup> Neben den 101 potentiellen Gai1-Bindern wurden außerdem Sequenzen mit einem HPQ-Motiv identifiziert. Dieses Sequenzmotiv ist für eine bevorzugte Bindung an Streptavidin bekannt, weshalb diese Peptide von der weiteren Sequenzanalyse ausgeschlossen wurden.<sup>[60,386]</sup> Für zwei Vertreter dieser Gruppe (H-AFNleAHPQRR-NH<sub>2</sub> und H-YTINleHPQGF-NH<sub>2</sub>) wurde in Bindungsstudien keine Gai/s-Bindung nachgewiesen, was die direkte Streptavidin-Bindung der HPQ-enthaltenden Hits im Screeningexperiment nahelegt. Aufgrund des geringen Potentials dieser Peptide für die Entwicklung von  $\alpha$ -Proteinmodulatoren werden diese Studien nicht näher beschrieben.

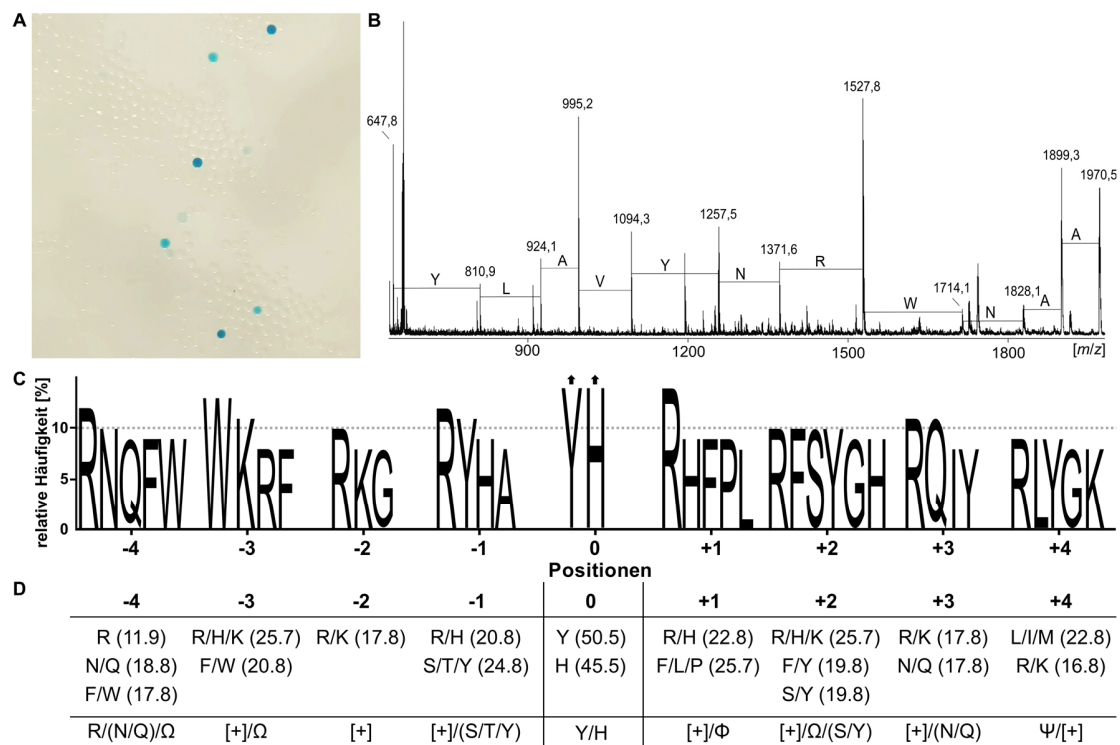


Abbildung 25: Ableitung der Konsensussequenz für Gai1-Binder basierend auf dem OBOC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GDP. **A**: Identifizierung von Gai1·GDP-Bindern nach Inkubation mit Gai1·GDP und anschließender BCIP-Detektion. **B**: PED-MALDI-MS-Spektrum einer Hit-Sequenz (NWRNYVALY). **C**: Relative Häufigkeit der Aminosäuren (≥ 8%) in P-4 bis P+4 relativ zur Position P0 [C/H/Y] und **D**: Aminosäurepräferenzen. Die postulierte Konsensussequenz wird nach Aasland et al.<sup>[199]</sup> angegeben: Φ: hydrophobe (V, I, L, F, W, Y, M), Ω: aromatische (F, W, Y), Ψ: große aliphatische (V, I, L, M), π: kleine (P, G, A, S), ζ: polar/neutral (N, Q, S, T), [+]: basische (H, K, R) und [-]: saure (D, E) Aminosäuren; M = Nle. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Die 101 identifizierten Hits wurden hingegen für die Ableitung einer Konsensussequenz auf bevorzugte Aminosäureeigenschaften (Symbolik nach Aasland et al.<sup>[199]</sup>) und sich wiederholende Sequenzmotive untersucht (Abbildung 25). Es zeigte sich, dass basische ([+]: H, K, R) und aromatisch/hydrophobe Aminosäuren (Ω: F, W, Y) in den N-terminalen Positionen P-4 bis P-1 und den C-terminalen Positionen P+1 bis P+4 häufig auftraten. Im Gegensatz dazu, wurden kaum saure Aminosäuren ([-]: D, E) detektiert. Dieser allgemeine Trend deckt sich mit der Beobachtung, dass eine Reihe von kationisch-amphiphilen Substanzen wie Mastoparan und Melittin (Kapitel 2.3.3.1) an die Gai/s-Untereinheit binden können.<sup>[17,282]</sup> In den N-terminalen Positionen P-4 bis P-1 wurden die basischen Aminosäuren Arg (P-4 bis P-1) und Lys (P-3, P-2) sowie die aromatischen Aminosäuren Trp und Phe (P-4, P-3) häufig beobachtet. Neben dem allgemeinen basisch-hydrophoben Trend waren auch polar-neutralen Aminosäuren (ζ: S, T, N, Q) in diesen Positionen vertreten, wie Asn und Gln in P-4 (beide besitzen Säureamid in der Seitenkette) und Ser, Thr und Tyr in P-1 (alle besitzen eine Hydroxylfunktion in der Seitenkette). Auch in den C-terminalen Positionen P+1 bis P+4 traten häufig basische (v.a. Arg) und aromatische Aminosäuren (v.a. Phe und Tyr) auf. Neben den vermehrt vorkommenden hydrophoben Aminosäuren (Φ: V, I, L, F, W, Y, Nle) in P+1, wurden auch aliphatisch/hydrophobe Aminosäuren (Ψ: V, I, L, Nle) in P+4 identifiziert. Zudem waren polar/neutralen Aminosäuren in den Positionen P+2 und P+3 häufig, wobei im Speziellen Tyr und Ser in P+2 und Asn und Gln in P+3 vermehrt präsent waren.<sup>[137]</sup>

Basierend auf der abgeleiteten Konsensussequenz wurden 13 Hits (Peptide **1-13**, Tabelle 12) aus dem Screeningexperiment für die Synthese und nachgeschaltete Analyse ausgewählt. Unter den 13 Peptiden waren Vertreter, die der Konsensussequenz in wenigstens sechs der neun Positionen entsprachen (Peptide **1, 3, 8, 9**) und Peptide, die mit der Konsensussequenz in nur 2 Positionen (Peptide **10** und **11**) übereinstimmten. Diese Auswahl wurde getroffen, um eine umfangreiche Analyse des Screeningergebnisses zu gewährleisten.<sup>[137]</sup>

### 5.1.2 Synthese und Charakterisierung der Peptide

Die Synthese der 13 Hits (Tabelle 12) erfolgte automatisiert über SPPS unter Verwendung der Fmoc-basierten Schutzgruppenstrategie. Anschließend wurden die Peptide zusammen mit den Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten und mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt. Alle Peptide wurden in ausreichender Menge mit einer HPLC-Reinheit von >98% für die anschließenden Testungen erhalten und analytisch charakterisiert. Das literaturbekannte KB-752<sup>[152]</sup> wurde zusätzlich als Kontrolle synthetisiert.<sup>[137]</sup>

Tabelle 12: Analytische Charakterisierung der ausgewählten Hits und KB-752<sup>[152]</sup> (Kontrolle).

Peptid	Peptidsequenz	Mw (Mw theor.)	HPLC C18 t <sub>R</sub> (min)	HPLC C8 t <sub>R</sub> (min)
<b>1</b>	RWLRYLRYLP	1321,73 <sup>a</sup> (1320,75)	31,63 <sup>d</sup>	22,72 <sup>e</sup>
<b>2</b>	NWGAYLDGL	1007,49 <sup>a</sup> (1006,48)	16,17 <sup>f</sup>	15,75 <sup>f</sup>
<b>3</b>	NFIRYAHKL	1160,66 <sup>a</sup> (1159,65)	18,70 <sup>e</sup>	18,35 <sup>e</sup>
<b>4</b>	WPKNYRQKI	1231,71 <sup>a</sup> (1230,69)	15,15 <sup>g</sup>	14,66 <sup>g</sup>
<b>5</b>	WVQRHPYAV	1154,62 <sup>a</sup> (1153,60)	15,28 <sup>g</sup>	15,04 <sup>g</sup>
<b>6</b>	FHQWHRTQK	1266,66 <sup>c</sup> (1265,64)	22,05 <sup>h</sup>	21,44 <sup>h</sup>
<b>7</b>	FQYQCRKHF	1255,61 <sup>a</sup> (1254,60)	15,58 <sup>g</sup>	15,27 <sup>g</sup>
<b>8</b>	TSRYHNleHRI	1181,71 <sup>c</sup> (1180,65)	14,90 <sup>g</sup>	14,68 <sup>g</sup>
<b>9</b>	NleYYYHKVRH	1277,65 <sup>c</sup> (1276,67)	14,08 <sup>g</sup>	13,93 <sup>g</sup>
<b>10</b>	SSNleFHIGLN	493,77 <sup>b</sup> (985,52)	14,66 <sup>f</sup>	14,64 <sup>f</sup>
<b>11</b>	KVRNleYEEIE	1177,66 <sup>c</sup> (1176,64)	19,16 <sup>e</sup>	18,93 <sup>e</sup>
<b>12</b>	QILKYYNFT	1188,65 <sup>a</sup> (1187,62)	21,85 <sup>e</sup>	21,58 <sup>e</sup>
<b>13</b>	PDRDHHKYR	1222,57 <sup>c</sup> (1221,60)	16,31 <sup>i</sup>	15,38 <sup>i</sup>
KB-752	H-SRVTWYDFLMEDTKSR-OH	2034,00 <sup>c</sup> (2032,97)	36,71 <sup>d</sup>	17,58 <sup>f</sup>

Alle Peptide, außer KB-752, wurden als Säureamide synthetisiert. Massenpeaks wurden als a) [M+H]<sup>+</sup> und b) [M+2H]<sup>2+</sup> im LC-ESI-MS und c) [M+H]<sup>+</sup> im MALDI-MS detektiert. Für die analytische RP-HPLC wurden die folgenden Gradienten verwendet: d) 0-60% Eluent B in 60 min, e) 10-50% Eluent B in 40 min, f) 20-50% Eluent B in 30 min, g) 10-40% Eluent B in 30 min, h) 0-40% Eluent B in 40 min und i) 0-30% Eluent B in 30 min. \*Alle Peptide waren >98% HPLC-rein. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

### 5.1.3 Gai1/s-Bindekapazität ausgewählter Peptide

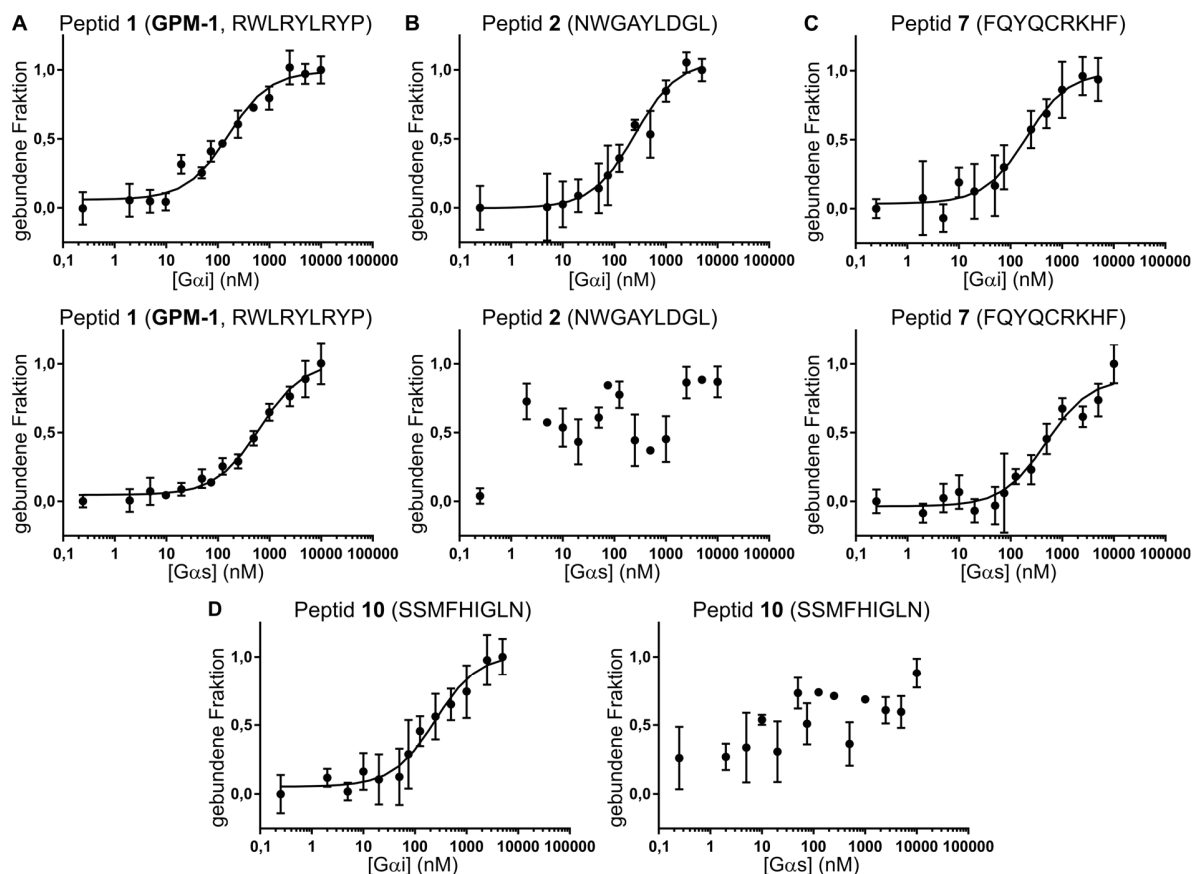
Um das Potential der identifizierten Peptide für die Modulation der G $\alpha$ -Proteinaktivität zu testen, wurde zunächst die Bindungsaffinität der Peptide gegenüber Gai1·GDP und Gas·GDP bestimmt. Dies ist noch keine funktionale Analyse im Hinblick auf die G $\alpha$ -Proteinaktivität, aber erforderlich, um die Hits auszuwählen, die mit einer hohen Affinität (Auswahlkriterium:  $K_D < 1 \mu\text{M}$ ) an die G $\alpha$ -Untereinheit binden. Für die Analyse der Bindungsaffinität mittels Microscale Thermophorese (MST) wurden die Peptide **1-13** und KB-752 (Kontrolle) fluoreszenzmarkiert (Tabelle 13). Die Derivatisierung mit 5(6)-Carboxyfluorescein (Cf) erfolgte am N-Terminus der harzgebundenen Peptide. Anschließend wurden die markierten Peptide vom Trägermaterial abgespalten, mittels semipräparativer RP-HPLC gereinigt und analytisch charakterisiert. Alle Peptide wurden in ausreichender Menge mit einer HPLC-Reinheit von >98% erhalten und für die MST-basierten Bindungsstudien eingesetzt (Abbildung 26). Für die Bindungsstudien wurden Gai1·GDP und Gas·GDP von Dr. Toni Kühn, Sabrina Linden, und Anna Pepanian (alle Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) bereitgestellt.<sup>[137]</sup>

Tabelle 13: Analytische Charakterisierung der 13 Cf-markierten Peptide und Cf-KB-752 (Kontrolle).

Peptid	Peptidsequenz	Mw (Mw theor.)	HPLC C18 t <sub>R</sub> (min)	HPLC C8 t <sub>R</sub> (min)
Cf-1	Cf-RWLRYLRYYP	1679,79 <sup>a</sup> (1679,07)	22,82, 23,25 <sup>c</sup>	21,69 <sup>d</sup>
Cf-2	Cf-NWGAYLDGL	1365,53 <sup>b</sup> (1365,42)	21,81, 22,58 <sup>c</sup>	23,59, 24,03 <sup>c</sup>
Cf-3	Cf-NFIRYAHKL	1519,71 <sup>b</sup> (1517,97)	19,24, 20,09 <sup>c</sup>	18,26, 18,90 <sup>d</sup>
Cf-4	Cf-WPKNYRQKI	1589,78 <sup>a</sup> (1589,01)	16,09, 17,46 <sup>c</sup>	15,36, 16,47 <sup>d</sup>
Cf-5	Cf-WVQRHPYAV	1512,65 <sup>b</sup> (1511,92)	18,08, 19,18 <sup>c</sup>	17,35, 18,27 <sup>d</sup>
Cf-6	Cf-FHQWHRTQK	1624,69 <sup>b</sup> (1623,96)	15,46, 16,44 <sup>d</sup>	14,43, 15,43 <sup>d</sup>
Cf-7	Cf-FQYQCRKHF	1613,67 <sup>b</sup> (1612,92)	17,36, 18,24 <sup>c</sup>	16,35, 17,21 <sup>d</sup>
Cf-8	Cf-TSRYHNleHRI	1539,70 <sup>b</sup> (1538,97)	13,11, 13,86 <sup>d</sup>	22,60, 23,10 <sup>e</sup>
Cf-9	Cf-NleYYYHKVRH	1635,83 <sup>a</sup> (1634,99)	17,33, 18,76 <sup>c</sup>	16,53, 17,83 <sup>d</sup>
Cf-10	Cf-SSNleFHIGLN	1344,58 <sup>b</sup> (1343,84)	22,62, 23,70 <sup>c</sup>	22,26, 23,20 <sup>c</sup>
Cf-11	Cf-KVRNleYEEIE	1535,78 <sup>a</sup> (1534,96)	17,81, 18,27 <sup>c</sup>	17,08, 17,48 <sup>d</sup>
Cf-12	Cf-QILKYYNFT	1547,69 <sup>b</sup> (1545,94)	22,47, 23,24 <sup>c</sup>	21,81, 22,48 <sup>c</sup>
Cf-13	Cf-PDRDHHKYR	1581,64 <sup>b</sup> (1579,92)	18,66, 19,20 <sup>e</sup>	18,06 <sup>f</sup>
Cf-KB-752	Cf-SRVTWYDFLMEDTKSR-OH	2392,11 <sup>a</sup> (2391,02)	41,29 <sup>g</sup>	21,87 <sup>c</sup>

Alle Peptide, außer KB-752, wurden als Säureamide synthetisiert. Massenpeaks wurden als a) [M+H]<sup>+</sup> im MALDI-MS b) [M+H]<sup>+</sup> im LC-ESI-MS detektiert. Für die analytische RP-HPLC wurden die folgenden Gradienten verwendet: c) 20-60% Eluent B in 40 min, d) 20-50% Eluent B in 30 min, e) 10-50% Eluent B in 40 min, f) 10-40% Eluent B in 30 min und g) 0-60% Eluent B in 60 min. \*Alle Peptide waren >98% HPLC-rein. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>





E	Peptid	$K_D(\text{Gai})$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D(\text{Gas})$ [ $\mu\text{M}$ ]	F	$\Phi$	$\zeta$	W	$\Phi$ [+/-]	$\Omega$	$\Phi$																
1	1	0,14±0,02	0,63±0,09	KB-752	-	-	-	-	-	S R	V	T	W	Y	D	F	L	M	E	D	T	K	S	R		
2	2	0,23±0,06	n.b.	GSP	M	A	M	S	D	R	N	K	R	L	T	V	W	E	F	L	A	L	P	S	S	T
3	3	n.b.	n.b.	R6A-1	-	-	-	-	-	-	D	Q	L	Y	W	W	E	Y	L	-	-	-	-	-	-	-
4	4	n.b.	n.b.	AR6-05	-	D	E	S	D	P	E	E	L	M	Y	W	W	E	F	L	S	E	D	P	S	S
5	5	n.b.	n.b.	cycGiBP	-	-	-	-	-	-	-	-	M	I	T	W	Y	E	F	V	A	G	T	K	-	-
6	6	n.b.	n.b.	cycPRP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	M	I	T	W	I	D	F	I	S	P	S	K	-	-
7	7	0,18±0,07	0,47±0,12	cycPRP-3	-	-	-	-	-	-	-	-	M	T	W	F	E	F	L	S	S	T	S	K	-	-
8	8	n.b.	n.b.	$\alpha$ SUPR	-	-	-	-	-	-	-	-	M	F	Y	A*	Y	E	Y	A*	Q	W	S	K	-	-
9	9	n.b.	n.b.	Peptid 1 (GPM-1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	W	L	R	Y	L	R	Y	P	-	-	-	-
10	10	0,23±0,07	n.b.	Peptid 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	W	G	A	Y	L	D	G	L	-	-	-	-
11	11	n.b.	n.b.	Peptid 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	Q	Y	Q	C	R	K	H	F	
12	12	n.b.	n.b.	Peptid 10	-	-	-	-	-	-	S	S	M	F	H	I	G	L	N	-	-	-	-	-	-	-
13	13	n.b.	n.b.																							

Abbildung 26: MST-Ergebnisse und Sequenzalignment der besten Gai1·GDP-Binder. Bindungskurven von Cf-1 (Cf-GPM-1, A), Cf-2 (B), Cf-7 (C) und Cf-10 (D) mit Gai1 und Gas, Fehlerbalken stellen Standardabweichung (SD) für n=3 dar; E: MST-Ergebnisse der 13 OBOC-Hits. (n.b.: keine Bindung, d.h.  $K_D > 1 \mu\text{M}$ ; M = Nle). F: Multiples Sequenzalignment von KB-752<sup>[152]</sup>, GSP<sup>[333]</sup>, R6A-1<sup>[260]</sup>, AR6-05<sup>[332]</sup>, cycGiBP<sup>[334]</sup>, cycPRP-1 und cycPRP-3<sup>[335]</sup>,  $\alpha$  SUPR<sup>[336]</sup> und den Peptiden 1 (GPM-1), 2, 7, 10. Das Alignment wurde mit CLUSTAL O (1.2.4)<sup>[387]</sup> erstellt, M = Nle für Peptid 10, \* = N-methylierte Aminosäuren,  $\Phi$ : hydrophobe (V, I, L, F, W, Y, M),  $\Omega$ : aromatische (F, W, Y),  $\zeta$ : polar/neutral (N, Q, S, T), [+]: basische (H, K, R) und [-]: saure (D, E) Aminosäuren.<sup>[199]</sup> Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Innerhalb der Bindungsstudien zeigte sich, dass nur vier der 13 Peptide (1, 2, 7, 10) mit einer hohen Bindungsaffinität (Abbildung 26A-E) an Gai1·GDP binden. Für die Bindung an Gas·GDP konnte nach dem Selektionskriterium nur für zwei Peptide (1 und 7) ein  $K_D$ -Wert bestimmt werden.

Allerdings waren diese höher als die entsprechenden  $K_D$ -Werte für die Gai1·GDP-Interaktion. Für KB-752 wurde ein  $K_D$ -Wert von  $345 \pm 40$  nM für die Gai1·GDP-Bindung ermittelt, welcher im Bereich der vier hoch-affinen Bindern (**1**, **2**, **7**, **10**) liegt, aber weit unterhalb der mittels SPR bestimmten literaturbekannten Angabe von 3900 nM (Tabelle 3, Seite 33, Abbildung 27A).<sup>[152]</sup> Für Gas wurde keine Bindung durch KB-752 beobachtet, welches vermutlich an dem Selektionskriterium lag, da in der Literatur eine höhere Dissoziationskonstante für die Gas-Bindung (5100 nM, Tabelle 3) von KB-752 beschrieben wurde.<sup>[137,331]</sup>

Im Vergleich zu den literaturbekannten Peptiden (Kapitel 2.3.3.4) besitzen die hier identifizierten Binder einen größeren Anteil an basischen und weniger saure Aminosäurereste, jedoch eine vergleichbare Anzahl an hydrophoben/aromatischen Aminosäuren (Abbildung 26F). Beim sequentiellen Vergleich der vier Peptide mit weiteren literaturbeschriebenen Peptiden ergab sich, dass die Peptide **1** und **2** eine hohe Ähnlichkeit zu KB-752 (TWX[-]FL)<sup>[152]</sup>, R6A/R6A-1 (T/YWX[-]QL)<sup>[260]</sup>, AR6-05 (YWWEFL)<sup>[332]</sup>, GSP (LTVWEFL)<sup>[333]</sup>, cycGiBiP (TWYEFV)<sup>[334]</sup>, cycPRP-1/3 (TWI/Y[-]FV/I)<sup>[335]</sup> und G $\alpha$  SUPR (YA\*YEYA\*, A\*: NMe-Ala)<sup>[336]</sup> besitzen, da die genannten Peptide im Kernmotiv (XWXXYL) eine hohe Übereinstimmung aufweisen. Insgesamt ließ sich für alle genannten Peptide ein  $\Phi\zeta W\Phi$ [+/-] $\Omega\Phi$ -Motiv als gemeinsamen Konsensussequenz ableiten, womit Peptid **1** durch das enthaltende ( $\zeta$ )W $\Phi$ [+] $\Omega\Phi$ -Motiv am besten übereinstimmte. Für die literaturbeschriebenen Peptide wurde bereits die gemeinsame Konsensussequenz im Kernmotiv festgestellt. Zusätzlich wurde für KB-752, R6A-1 und cycGiBP gezeigt, sowie für cycPRP-1/3 vermutet, dass die Peptide eine gemeinsame Gai-Bindungsstelle an der Switch II/ $\alpha$ 3-Region besitzen.<sup>[152,334,335,338]</sup> Um die Hypothese zu überprüfen, dass Peptid **1** wie KB-752 an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region binden kann, wurde ein Konkurrenzexperiment per MST durchgeführt (Abbildung 27B). Aufgrund der zuvor ermittelten höheren Dissoziationskonstante von KB-752 im Vergleich zu Peptid **1** wurde KB-752 mit Gai1·GDP inkubiert und anschließend die Verdrängung durch Peptid **1** bestimmt. Es wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $155 \pm 0,02$  nM ermittelt. Dies legte die Verdrängung von KB-752 durch Peptid **1** und somit eine Bindung von Peptid **1** an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region (Bindungsstelle von KB-752) nahe.<sup>[137]</sup>

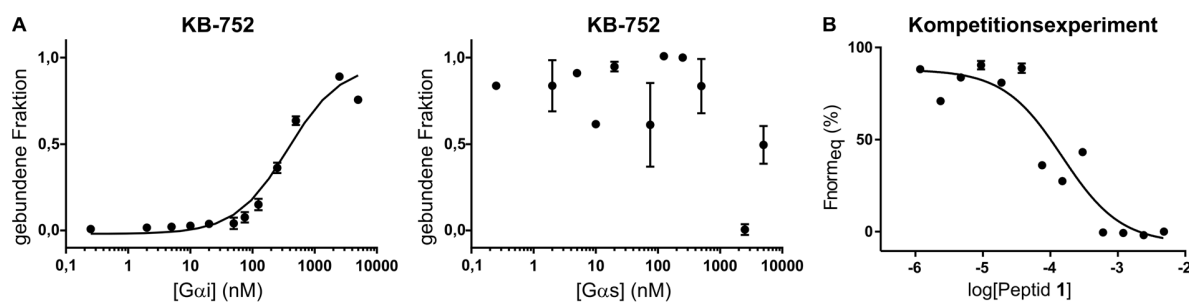


Abbildung 27: MST-Ergebnisse von Cf-KB-752 und Konkurrenzexperiment von Peptid **1** (GPM-1) und Cf-KB-752. **A**: 50 nM Cf-KB-752 mit Gai1 und Gas. **B**: Konkurrenzexperiment: Nach Vorinkubation von Cf-KB-752 (final 50 nM) und Gai1 (final 50 nM) wurden verschiedene Peptid **1**-Konzentrationen (0,61-5.000 nM) hinzugegeben und die Änderungen der thermophoretischen Effekte gemessen. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Das Ergebnis des Konkurrenzexperimentes ist möglicherweise ein Indiz dafür, dass die Region an Switch II/ $\alpha$ 3 gut zugänglich ist, was bereits durch die verschiedenen Hochdurchsatzpeptide vermutet wurde.<sup>[17]</sup> Eine gute Adressierbarkeit der Switch II/ $\alpha$ 3-Region wurde bereits im Kontext niedermolekularer Verbindungen beschrieben.<sup>[17,306]</sup>

Im Gegensatz zu den Peptiden **1** und **2** zeigen die Peptide **7** und **10** nur eine geringe Übereinstimmung mit dem  $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv, da nur die Positionen P-4 und P-2 in Peptid **7** und P-2 und P+1 in Peptid **10** das Motiv repräsentieren (Abbildung 26). Auf dieser Basis konnten keine Schlussfolgerungen über ähnliche Gai1-Bindungsstellen gezogen werden. Nach der Identifikation des  $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Kernmotivs wurden auch die anderen neun OBOC-Hits mit diesem verglichen (Tabelle 14). Es wurde festgestellt, dass die meisten dieser neun Peptide nicht gut mit dem  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Motiv übereinstimmten. Nur Peptid **3** wies eine hohe Übereinstimmung auf, woraus vermutet werden könnte, dass eine große aliphatische Aminosäure in Position 7 des  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Motives entscheidend für die Bindung an Gai1 ist.<sup>[137]</sup>

Tabelle 14: Multiples Sequenzalignment der 13 selektierten Hits mittels Clustal Omega O (1.2.4).<sup>[387]</sup>

Peptid			$\Phi$	$\zeta$	W	$\Phi$	[+/-]	$\Omega$	$\Phi$						
<b>1</b>	-	-	-	-	R	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	R	Y	P	-	-
<b>2</b>	-	-	-	-	<b>N</b>	<b>W</b>	G	A	<b>Y</b>	<b>L</b>	D	G	L	-	-
<b>7</b>	-	-	-	-	-	-	<b>F</b>	Q	<b>Y</b>	Q	C	R	K	H	F
<b>10</b>	-	S	S	<b>M</b>	F	H	<b>I</b>	G	L	N	-	-	-	-	-
<b>3</b>	-	-	-	-	<b>N</b>	F	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	A	H	K	L	-	-
<b>4</b>	-	-	-	-	-	<b>W</b>	P	<b>K</b>	N	<b>Y</b>	R	Q	K	I	-
<b>5</b>	-	-	-	-	-	<b>W</b>	<b>V</b>	Q	R	H	P	Y	A	V	-
<b>6</b>	-	-	F	H	<b>Q</b>	<b>W</b>	H	<b>R</b>	T	Q	K	-	-	-	-
<b>8</b>	T	S	R	<b>Y</b>	H	M	H	<b>R</b>	I	-	-	-	-	-	-
<b>9</b>	-	-	M	<b>Y</b>	Y	Y	H	<b>K</b>	V	R	H	-	-	-	-
<b>11</b>	-	K	V	R	M	Y	E	<b>E</b>	I	E	-	-	-	-	-
<b>12</b>	-	-	-	-	<b>Q</b>	I	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	N	F	T	-	-
<b>13</b>	-	P	D	R	D	H	H	<b>K</b>	<b>Y</b>	R	-	-	-	-	-

Symbole nach Aasland et al.<sup>[199]</sup>:  $\Phi$ : hydrophobe (V, I, L, F, W, Y, M);  $\Omega$ : aromatische (F, W, Y);  $\Psi$ : große, aliphatische (V, I, L, M);  $\pi$ : kleine (P, G, A, S);  $\zeta$ : polar/neutrale (N, Q, S, T); [+]: basische (H, K, R) und [-]: saure (D, E) Aminosäuren. Die Reste, die mit dem  $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv übereinstimmen, sind fettgedruckt dargestellt. Die ersten vier Peptide (**1** (**GPM-1**), **2**, **7**, **10**) zeigten eine Gai1·GDP-Bindung ( $K_D < 1 \mu\text{M}$ ). Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Peptid **1** wurde aufgrund der sequentiell höchsten Übereinstimmung mit den literaturbekannten Peptiden, der vermutlichen Switch II/ $\alpha 3$ -Bindung und der höchsten Bindungsaffinität gegenüber Gai1·GDP als am vielversprechendsten für die weitere Entwicklung eingeschätzt. Darüber hinaus war Peptid **1** auch aus einem anderen Grund interessant als Leitstruktur: Das ( $\zeta$ ) $W\Phi[+]\Omega\Phi$ -Motiv besitzt eine hohe Übereinstimmung mit dem GEM-Kernmotiv ( $\Phi T\Phi X[D/E]F\Phi$ ) von GIV und anderen Proteinen mit GEM-Aktivität (Tabelle 15, Kapitel 2.3.1.4).<sup>[127,148,210,213]</sup> In diesem Kontext kann der  $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Konsensus der Peptide aus den Hochdurchsatzverfahren minimal zu einem  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Konsensus angepasst werden. Dies lässt vermuten, dass das Trp3 im Motiv weniger entscheidend ist und auch durch eine andere hydrophobe Aminosäure ersetzt werden kann, wohingegen Leu7 bedeutend für die Interaktion zu sein scheint. Die Position 4 ist in diesem Konsensus variabler als im Konsensus der HTS-abgeleiteten Peptide. Da die Bindung von GEMs an die Gai-Untereinheit funktionell die G-Proteinaktivität beeinflussen kann, ist dies ein

entscheidender Punkt für die Weiterentwicklung dieses Peptids als potentiell Modulator der  $G\alpha$ -Proteinaktivität.<sup>[148]</sup> Peptid **1** wurde daher im Folgenden als **GPM-1** für „G-Protein Modulator-1“ bezeichnet.<sup>[137]</sup> Auf der Peptidebene konnte eine GEM-Aktivität bereits für KB-752 und GSP gezeigt werden, die genauso wie GIV als GEF für Gai und GDI für Gas wirken.<sup>[126,331,333]</sup> Allerdings wurden für diese Peptide keine Aktivitätsstudien im zellulären Kontext beschrieben.<sup>[331,333]</sup>

Tabelle 15: Multiples Alignment von **GPM-1** mit KB-752<sup>[152]</sup>, GSP<sup>[333]</sup> und den GEM-Motiven der GEM-Proteine, erstellt mit Clustal Omega O (1.2.4)<sup>[387]</sup>.<sup>[126,209–212,214]</sup>

		$\Phi$	$\zeta$	$\Phi$	X	[+/-]	$\Omega$	L	
KB-752	- - - - - S R	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>W</b>	Y	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	M E D T K S R
GSP	M A M S D R N K R	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	W	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	A L P S S T -
<b>GPM-1</b>	- - - - - - -		<b>R</b>	<b>W</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	R Y P - - - -
PLC $\delta$ 4b	- - - - - Q K	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	L	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	D F L Q E E Q
GIV	- - - - - E V	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	Q	Q	<b>F</b>	<b>L</b>	E E S N K L T
DAPLE	- - - - - E M	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	E	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	E E S N R S S
GBAS-1	- - - - - E T	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	E	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	M N S Y S - -
Calnuc	- - - - - R L	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	E	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	A S T Q R K E
NUCB2	- - - - - R L	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	E	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	K A T E K K E

Symbole nach Aasland et al.<sup>[199]</sup>:  $\Phi$ : hydrophobe (V, I, L, F, W, Y, M),  $\Omega$ : aromatische (F, W, Y),  $\zeta$ : polar/ neutrale (N, Q, S, T), [+]: basische (H, K, R) und [-]: saure (D, E) Aminosäuren. Die Reste, die mit dem  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Motiv übereinstimmen, sind fettgedruckt dargestellt. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Da insbesondere die  $\Omega$ -Position im  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Motiv, d.h. Phe8 in KB-752<sup>[152]</sup> und Phe168 im GIV-GEM-Motiv<sup>[148,388]</sup>, als entscheidend für die Gai-Bindung und die GEM-Aktivität beschrieben wurden, wurde die **GPM-1**-Mutante Tyr5Ala (**GPM-1 Y5A**) analog zu den OBOC-Hits synthetisiert und analytisch charakterisiert (Tabelle 16, Seite 77). Die MST-Bindungsstudien der Cf-markierten Variante (Tabelle 17, Seite 78) zeigten, dass die Mutante einen zweifach höheren  $K_D$ -Wert ( $285 \pm 40$  nM) als **GPM-1** gegenüber Gai1 aufweist und nicht an Gas bindet (Abbildung 28). Zusammen mit dem Konkurrenzexperiment unterstützt dies die Annahme, dass **GPM-1** Gai auf eine ähnliche Weise wie KB-752 und GEM-Proteine beeinflussen kann.<sup>[137,148,152,388]</sup>

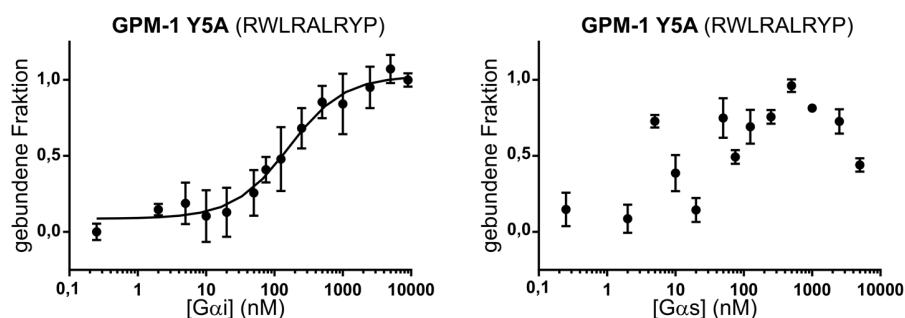


Abbildung 28: MST-Ergebnis von 50 nM Cf-**GPM-1 Y5A** mit Gai1 und Gas. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

### 5.1.4 Optimierung der Hitsequenz GPM-1

Nachdem **GPM-1** (Peptid **1**) als am vielversprechendsten aus den Vorstudien hervorgegangen ist, wurde dieses Peptid als Leitstruktur für die weitere Entwicklung von Gai/s-Proteinmodulatoren ausgewählt und verwendet. In Kapitel 2.1 wurde bereits thematisiert, dass lineare Peptidsequenzen und insbesondere lineare Peptide mit ausschließlich proteinogenen Aminosäuren anfällig gegenüber proteolytischem Abbau sind.<sup>[41,334]</sup> Des Weiteren können Peptide eine geringe Zellpermeabilität besitzen, was deren Verwendung als Gα-Proteinmodulator im zellulären Kontext limitiert.<sup>[41,334]</sup> Auf der Grundlage dieser Kenntnisse wurde die **GPM-1**-Struktur, mit dem Ziel optimiert, sowohl die proteolytische Stabilität als auch die Zellpermeabilität zu erhöhen. Dazu wurden schrittweise Veränderungen an der Leitstruktur vorgenommen, die entweder einen der beiden Charakteristika oder beide adressieren sollten (Abbildung 29).<sup>[137]</sup>

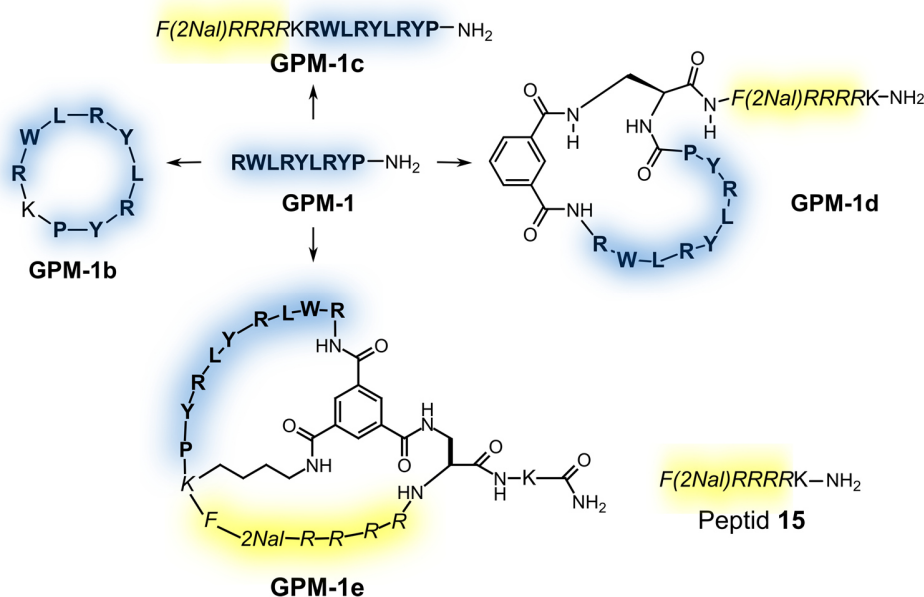
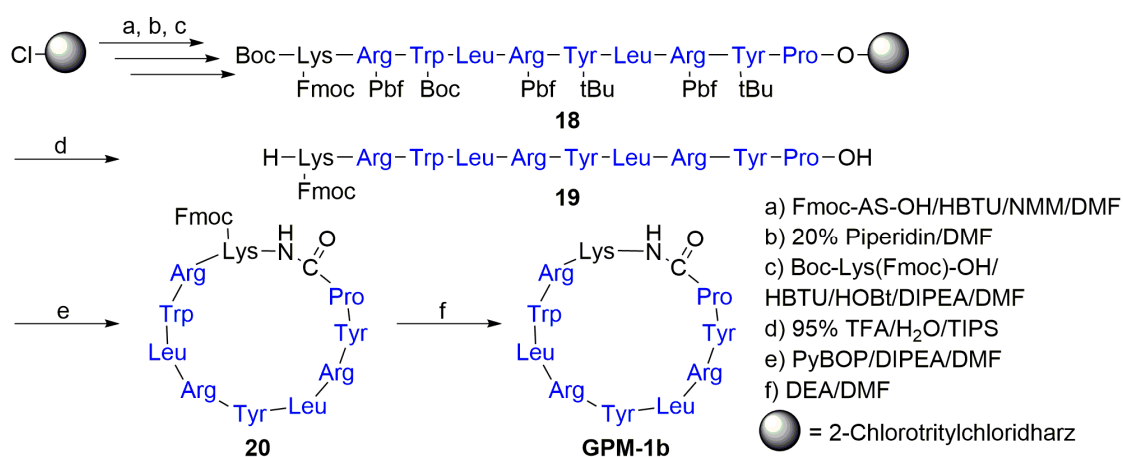


Abbildung 29: Ableitung der **GPM-1**-Derivate aus der **GPM-1**-Struktur. **GPM-1b** stellt das Kopf-zu-Schwanz-zyklisierte **GPM-1** dar (H-RWLRYLRYP-NH<sub>2</sub>, blau); **GPM-1c** umfasst **GPM-1** und eine CPP-Einheit (F(2NaI)RRRR, gelb); **GPM-1d/e** besteht aus dem zyklischen Peptid **GPM-1(b)** und der linearen/zyklischen CPP-Einheit. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Derivat **GPM-1b** wurde als eine Kopf-zu-Schwanz-zyklisierte Version des **GPM-1** synthetisiert, mit der Intention die proteolytische Stabilität zu erhöhen. Ein Lysinrest wurde zusätzlich für potentielle Modifikationen (z.B. Fluoreszenzmarkierung) in die Sequenz eingebaut. **GPM-1c** ist aus einer zellpenetrierenden Peptidsequenz (Phe-2NaI-Arg<sub>4</sub><sup>[96]</sup>), einem Lysinrest für Modifikationen und der **GPM-1**-Peptidsequenz zusammengesetzt, um die Zellpenetration des Peptids zu erleichtern. In einem ähnlich motivierten Ansatz wurde **GPM-1b** formal C-terminal um die zellpenetrierende Peptidsequenz (Phe-2NaI-Arg<sub>4</sub><sup>[96]</sup>) erweitert, um **GPM-1d** zu erhalten. Das Design der Verbindung wurde an den bityklichen Peptiden von Lian et al.<sup>[92]</sup> und Trinh et al.<sup>[96]</sup> angelehnt. Zu guter Letzt wurde auch ein bitykliches Peptid, **GPM-1e**, entworfen, welches in einem Ringsystem die **GPM-1**-Sequenz und im anderen die CPP-Sequenz enthält. Die Intention bei den letzten beiden Peptiden war es, die proteolytische Stabilität und gleichzeitig die Zellpermeabilität der Konstrukte zu verbessern. Im Falle von **GPM-1e** sollte auch die CPP-Sequenz aufgrund der Integration in den Zyklus vermehrt vor dem proteolytischen Abbau geschützt werden. Zusätzlich zu den **GPM-**

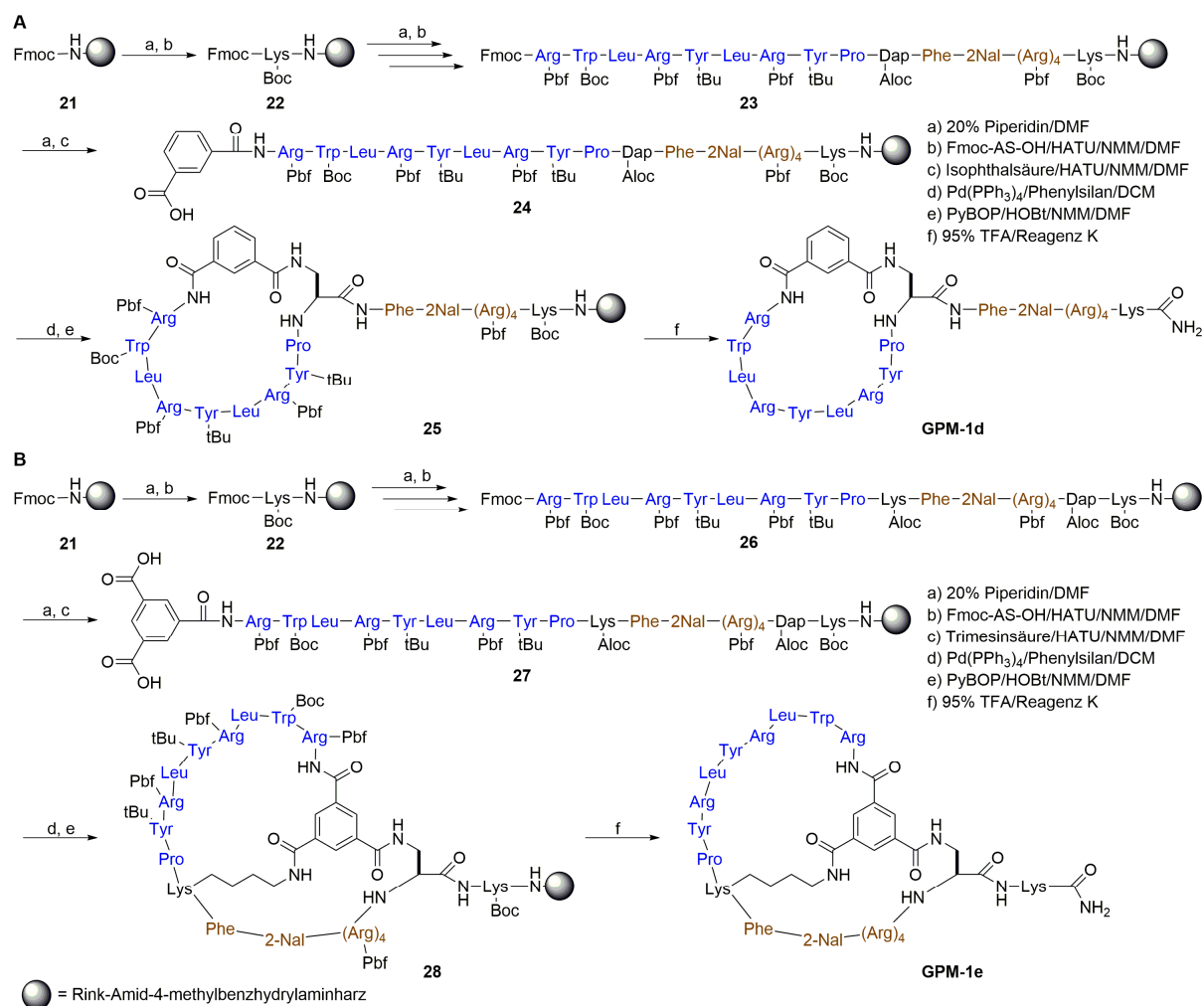
**1**-Derivaten wurde die lineare Version von **GPM-1b**, Peptid **14**, synthetisiert, um den Einfluss des Lysinrestes auf die Funktion des Peptides zu überprüfen. Als Kontrolle wurde außerdem das CPP mit einem C-terminalen Lysinrest hergestellt (Peptid **15**, H-Phe-2NaI-Arg<sub>4</sub>-Lys-NH<sub>2</sub>).<sup>[137]</sup> Die Wahl des CPPs erfolgte aufgrund der Tatsache, dass diese CPP-Sequenz einen bicyclischen, peptidischen Inhibitor für das monomere G-Protein KRas erfolgreich in Säugetierzellen eingebracht hatte und das Konstrukt durch die kurze Peptidsequenz vergleichsweise klein bleibt.<sup>[96,137]</sup> Die bisher beschriebenen CPP-Konstrukte mit  $\alpha$ -modulierenden Peptidsequenzen waren im Gegensatz dazu sehr groß ( $\geq 40$  Aminosäuren, Kapitel 2.3.3.4).<sup>[263,329]</sup>

Die Synthese der linearen Peptide, **GPM-1c**, **14** und **15**, erfolgte über automatisierte und manuelle SPPS mittels der Fmoc-basierten Schutzgruppenstrategie analog zu den OBOC-Hits. Für die Synthese der zyklischen Varianten wurden die linearen Vorläufer an der festen Phase synthetisiert, die Zyklisierung erfolgte für **GPM-1b** in Lösung (Schema 3) und für **GPM-1d** und **GPM-1e** harzgebunden angelehnt an die bicyclischen Peptide von Lian et al.<sup>[92,366]</sup> (Schema 4).<sup>[137]</sup>



Schema 3: Syntheschema für **GPM-1b**. Nach Synthese des linearen Vorläufers am 2-Chlorotriethylchloridharz (**18**) mittels HBTU/NMM und HBTU/HOBt/DIPEA wurde der Vorläufer vom Harz abgespalten (**19**) mittels 95% TFA, 2,5% H<sub>2</sub>O und 2,5% TIPS. Anschließend erfolgte die Zyklisierung durch PyBOP/DIPEA zu **20** und die Fmoc-Abspaltung von der Lysinseitenkette mit Diethylamin (DEA) zur Synthese von **GPM-1b**. Die **GPM-1**-Sequenz ist in blau dargestellt. AS = Aminosäure.

Um eine Kopf-zu-Schwanz-Zyklisierung innerhalb der Synthese von **GPM-1b** zu ermöglichen, wurde das Peptid an einem 2-Chlorotriethylchloridharz synthetisiert, welches bei der Abspaltung eine freie Säure liefert (Schema 3). Da durch die Seitenkettenfunktionen innerhalb der **GPM-1b**-Sequenz nur das zusätzlich eingebaute Lysin (Aminofunktion) die Kopf-zu-Schwanz-Zyklisierung in einer konkurrierenden Seitenketten-zu-Schwanz-Zyklisierung stören könnte, wurde an dieser Stelle eine erweiterte Schutzgruppenstrategie verwendet. Dafür wurden bei der Vorläufersynthese Fmoc-geschützte Derivate außer bei der Kopplung der letzten Aminosäure eingesetzt, bei der Boc-Lys(Fmoc)-OH benutzt wurde. Dies bewirkte bei der Abspaltung des Peptids vom Harz, dass unter den sauren Abspaltungsbedingungen der N-Terminus frei für die Zyklisierung vorlag und die Lysinseitenkette Fmoc-geschützt verblieb. Nach erfolgter Kopf-zu-Schwanz-Zyklisierung konnte die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe selektiv abgespalten werden.<sup>[137]</sup>



Schema 4: Syntheschema für **GPM-1d** (A) und **GPM-1e** (B). Nach Synthese der linearen Vorläufer (**23/26**) am beladungsreduzierten Rinkamid-MBHA-Harz (**21/22**) mittels HATU/NMM wurde Isophthal-/Trimesinsäure (**24/27**) mit HATU/NMM gekoppelt. Anschließend wurden die Aloc-Schutzgruppen mittels Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und Phenylsilan abgespalten und die Zyklisierung am Harz mit PyBOP/HOBt/NMM (**25/28**) durchgeführt. Darauffolgend wurden die Peptide vom Harz mit 95% TFA und Reagenz K abgespalten und **GPM-1d/GPM-1e** erhalten. Die **GPM-1**-Sequenz ist in blau, die CPP-Sequenz in braun dargestellt. AS = Aminosäure.

Bei der Vorläufersynthese von **GPM-1d** und **GPM-1e** wurde eine orthogonale Schutzgruppenstrategie nach Lian et al.<sup>[92,366]</sup> verwendet (Schema 4). Um die Zyklisierung am Harz zu gewährleisten, wurden die Aminofunktionen, die bei der Zyklisierung Verknüpfungen eingehen sollten, mit der unter neutralen Bedingungen entfernbaren Aloc-Schutzgruppe geschützt. Dies war im Falle von **GPM-1d** Diaminopropansäure (Dap) und für **GPM-1e** Dap und das zentrale Lysin, welches die **GPM-1**-Sequenz und die CPP-Sequenz voneinander trennte. Alle weiteren Aminosäurederivate wurden als Fmoc-Derivate mit säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen gekoppelt. Nachdem die vollständige Aminosäuresequenz synthetisiert wurde, wurde Isophthalsäure im Falle von **GPM-1d** und Trimesinsäure im Falle von **GPM-1e** über eine N-terminale Amidbindung gekoppelt. Die verbleibende(n) Säurefunktion(en) (**GPM-1d**: 1, **GPM-1e**: 2) wurde(n) dann nach Abspaltung der Aloc-Schutzgruppe(n) mit der freien Aminofunktion von Dap bei **GPM-1d** und von Dap und dem zentralen Lysin bei **GPM-1e** verknüpft. Durch eine geringe Harzbelastung konnte die Wahrscheinlichkeit der intramolekularen gegenüber

intermolekularen Verknüpfungen erhöht werden. Die Symmetrie der Trimesinsäure stellte sicher, dass bei der Zyklisierung innerhalb der **GPM-1e**-Synthese nur ein Produkt entstehen kann. Die genaue Aminosäureabfolge der Vorläufer ist dem Schema 4 zu entnehmen. In beiden Sequenzen wurde ein Lysinrest am C-Terminus für mögliche Markierungen eingebaut.<sup>[137]</sup>

Alle Peptide konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisiert und analytisch charakterisiert werden (Tabelle 16). Von **GPM-1e** wurden keine ausreichenden Mengen für weiterführende Analysen erhalten, weshalb dieses **GPM-1**-Derivat nicht für die weiteren Studien in Betracht gezogen wurde. Im Folgenden wurden daher nur die Derivate **GPM-1b-d** weiter charakterisiert, da diese in ausreichenden Mengen und mit >95% HPLC-Reinheit erhalten wurden.<sup>[137]</sup>

Tabelle 16: Analytische Charakterisierung der **GPM-1**-Derivate und des CPP-Peptids **15**.

Peptid	Peptidsequenz	Mw (Mw theor.)	HPLC C18 t <sub>R</sub> (min)	HPLC C8 t <sub>R</sub> (min)
<b>GPM-1b</b>	cyc[KRWLRYLRYP]	1432,88 <sup>a</sup> (1431,83)	34,27 <sup>c</sup>	15,23 <sup>d</sup>
<b>GPM-1c</b>	F(2Na)RRRRKRWLRYLRYP	2418,40 <sup>a</sup> (2417,41)	34,52 <sup>c</sup>	14,80 <sup>d</sup>
<b>GPM-1d</b>	cyc[RWLRYLRYP]F(2Na)RRRRK	2634,50 <sup>a</sup> (2633,46)	39,44 <sup>c</sup>	20,13 <sup>e</sup>
<b>GPM-1e</b>	bicyc[RWLRYLRYP][F(2Na)RRRR]K	2788,60 <sup>a</sup> (2787,54)	42,68 <sup>c</sup>	n.d.
<b>GPM-1 Y5A</b>	RWLRALRYP	1229,74 <sup>b</sup> (1228,73)	30,30 <sup>c</sup>	25,99 <sup>f</sup>
<b>14</b>	KRWLRYLRYP	1449,89 <sup>a</sup> (1448,85)	30,92 <sup>c</sup>	21,82 <sup>e</sup>
<b>15</b>	F(2Na)RRRRK	1114,69 <sup>a</sup> (1113,68)	25,99 <sup>c</sup>	16,79 <sup>g</sup>

Alle Peptide wurden als Säureamide synthetisiert. Massenpeaks wurden als a) [M+H]<sup>+</sup> im MALDI-MS und b) [M+H]<sup>+</sup> im LC-ESI-MS detektiert. Für die analytische RP-HPLC wurden die folgenden Gradienten verwendet: c) 0-60% Eluent B in 60 min, d) 20-50% Eluent B in 30 min, e) 10-50% Eluent B in 40 min, f) 20-60% Eluent B in 40 min und g) 10-40% Eluent B in 30 min. \*Alle Peptide waren >95% HPLC-rein, n.d. nicht bestimmt. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Da sich innerhalb der Derivate die **GPM-1**-Struktur (im Ring oder durch Interaktionen mit sequentiell benachbarten/räumlich nahen Aminosäureresten) und somit die Aktivität entscheidend ändern kann, wurde zunächst das Bindungsverhalten der Peptide gegenüber Gai1/s untersucht. Zu diesem Zweck wurden die linearen Peptide **14**, **15** und **GPM-1c** am N-Terminus analog zu den OBOC-Hits für die MST-basierten Bindungsstudien Cf-markiert (Tabelle 17). Die Fluoreszenzmarkierung der beiden zyklischen Peptide **GPM-1b** und **GPM-1d** erfolgte an der Lysinseitenkette mit FITC in Lösung mit anschließender Reinigung mittels analytischer RP-HPLC. Alle Peptide wurden analytisch charakterisiert und in ausreichender Menge mit einer HPLC-Reinheit von >98% erhalten und für die MST-basierten Bindungsstudien eingesetzt.<sup>[137]</sup>

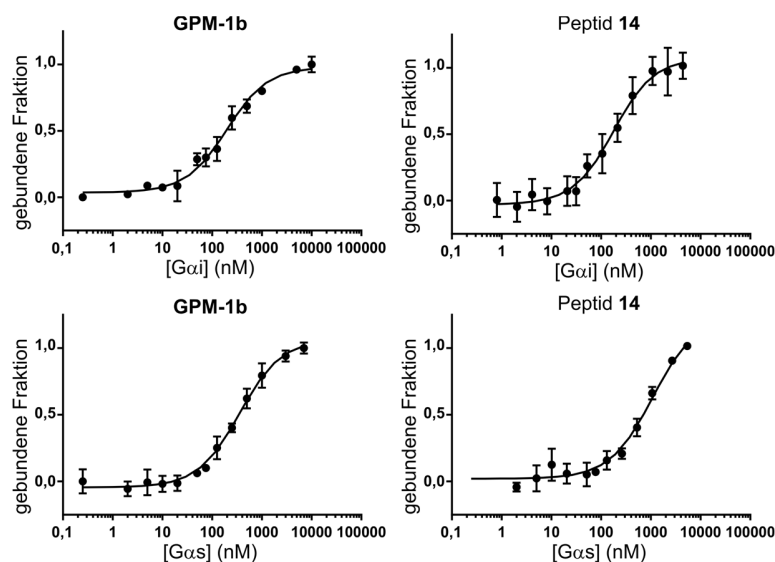


Tabelle 17: Analytische Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten **GPM-1**-Derivate und des CPP-Peptids **15**.

Peptid	Peptidsequenz	Mw (Mw theor.)	HPLC C18 $t_R$ (min)
<b>FITC-GPM-1b</b>	cyc[K(FITC)RWLRYLRYP]	1821,83 <sup>a</sup> (1820,86)	42,75 <sup>c</sup>
<b>Cf-GPM-1c</b>	Cf-F(2Na)RRRRKRWLRYLRYP	2776,37 <sup>a</sup> (2775,46)	41,12 <sup>c</sup>
<b>FITC-GPM-1d</b>	cyc[RWLRYLRYP]F(2Na)RRRRK(FITC)	3023,64 <sup>a</sup> (3022,50)	42,56 <sup>c</sup>
<b>Cf-GPM-1 Y5A</b>	Cf-RWLRLALRYP	794,40 <sup>b</sup> (1586,78)	39,80, 40,19 <sup>c</sup>
<b>Cf-14</b>	Cf-KRWLRYLRYP	1807,91 <sup>a</sup> (1806,90)	18,71, 19,63 <sup>d</sup>
<b>Cf-15</b>	Cf-F(2Na)RRRRK	1472,73 <sup>a</sup> (1471,73)	18,32, 18,99 <sup>d</sup>

Alle Peptide wurden als Säureamide synthetisiert. Massenpeaks wurden als a)  $[M+H]^+$  im MALDI-MS und b)  $[M+2H]^{2+}$  im LC-ESI-MS detektiert. Für die analytische RP-HPLC wurden die folgenden Gradienten verwendet: c) 0-60% Eluent B in 60 min und d) 20-50% Eluent B in 30 min. \*Alle Peptide waren >98% HPLC-rein. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Für Peptid **14** ergab sich eine Bindungsaffinität gegenüber Gai1 ( $K_D = 140 \pm 30$  nM, Abbildung 30), die vergleichbar mit der ermittelten Bindungsaffinität von **GPM-1** war ( $K_D = 137 \pm 20$  nM, Abbildung 26). Daraus wurde geschlossen, dass das N-terminale Lysin keinen Effekt auf die Bindungsaffinität hat. Die zyklisierte Variante **GPM-1b** zeigte hingegen einen erhöhten  $K_D$ -Wert ( $K_D = 170 \pm 20$  nM, Abbildung 30), welches vermutlich durch die rigide Ringstruktur hervorgerufen wurde. Dies könnte bewirkt haben, dass Peptid-Protein-Interaktionen, die in der linearen Variante vorliegen, im zyklischen **GPM-1b** nur noch eingeschränkt oder gar nicht möglich waren. Dennoch band das Peptid weiterhin mit hoher Affinität an Gai1. Für Gas war die Bindungsaffinität von **GPM-1** ( $K_D = 630 \pm 90$  nM, Abbildung 26), **GPM-1b** ( $K_D = 330 \pm 40$  nM) und **14** ( $K_D = 1010 \pm 160$  nM, Abbildung 30) im Vergleich zu Gai1 insgesamt geringer, wobei **GPM-1** und **14** eine signifikant höhere Dissoziationskonstante aufgewiesen haben. **GPM-1b** zeigte überraschenderweise eine höhere Bindungsaffinität zu Gas im Vergleich zu **GPM-1**, welches möglicherweise durch eine größere Kontaktfläche durch das zyklische Grundgerüst begründet werden könnte.<sup>[137]</sup>

Abbildung 30: MST-Bindungskurven von 50 nM FITC-**GPM-1b** und 50 nM Cf-**14** mit Gai1 und Gas. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Für die CPP-gekoppelten Peptide konnten keine Dissoziationskonstanten per MST abgeleitet werden. Dies lag wahrscheinlich an ionischen Wechselwirkungen der positivgeladenen Aminosäureseitenketten (Nettoladungen: **GPM-1**: +3, **GPM-1c**: +8, **GPM-1d**: +8, **15**: +5) mit der negativgeladenen Glaswand der Kapillaren, da U-förmige Fluoreszenzpeaks beim Scannen der Kapillaren beobachtet wurden.<sup>[389]</sup> Aus diesem Grund wurden für diese Peptide SPR-Studien mittels eines Streptavidin-beschichteten Sensorchip angestrebt.<sup>[137]</sup>

Zu diesem Zweck wurden die Peptide **GPM-1** (als Kontrolle) sowie **GPM-1c**, **GPM-1d** und **15** biotinyliert (Tabelle 18). Im Falle von **GPM-1** und **15** wurden biotinylierte Versionen an der festen Phase synthetisiert, wobei Fmoc-Lys(Biotin)-OH als Aminosäurebaustein eingesetzt und durch einen Ado-Linker (Amino-3,6-dioxaoktansäure) von der übrigen Peptidsequenz getrennt wurde. Dies sollte gewährleisten, dass die Markierung und die vorgesehene Immobilisierung am Streptavidin-Sensorchip keinen Einfluss auf die Peptid-Protein-Interaktionen haben. Die Biotinylierung von **GPM-1c** und **GPM-1d** erfolgte in Lösung an der Lysinseitenkette mit NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin. Auch in diesem Fall sollten die vier PEG-Einheiten die räumliche Trennung des Biotins von der Peptidsequenz gewährleisten. Da **GPM-1c** ein lineares Peptid mit ungeschützten N-Terminus ist, war neben der Reaktion an der Lysinseitenkette auch eine Markierung des N-Terminus möglich. Aus diesem Grund wurden nur 0,5 Äq. NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit zur Bildung des zweifach biotinylierten Produktes zu senken. Das Peptid mit dem korrekten Biotinylierungsmuster wurde in Zusammenarbeit mit Maximilian S. Beck (Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) per Edman-Sequenzierung identifiziert. Die am N-Terminus biotinylierte Variante konnte in diesem Fall nicht per Edman-Abbau im ersten Zyklus abgebaut werden, jedoch das an der Lysinseitenkette biotinylierte Derivat. Alle Peptide wurden analytisch charakterisiert und in ausreichender Menge mit einer HPC-Reinheit von >98% erhalten und für die SPR-basierten Bindungsstudien eingesetzt.<sup>[137]</sup>

Tabelle 18: Analytische Charakterisierung der biotinylierten **GPM-1**-Derivate und des CPP-Peptids **15**.

Peptid	Peptidsequenz	Mw (Mw theor.)	HPLC C18 t <sub>R</sub> (min)
Btn- <b>GPM-1</b>	RWLRYLRYP-O2Oc-K(Biotin)	1821,08 <sup>a</sup> (1820,00)	32,95 <sup>b</sup>
Btn- <b>GPM-1c</b>	F(2Na)RRRRK(PEG <sub>4</sub> -Biotin)RWLRYLRYP	2891,70 <sup>a</sup> (2890,63)	35,93 <sup>b</sup>
Btn- <b>GPM-1d</b>	cyc[RWLRYLRYP]F(2Na)RRRRK(PEG <sub>4</sub> -Biotin)	3107,72 <sup>a</sup> (3106,68)	40,09 <sup>b</sup>
Btn- <b>GPM-15</b>	F(2Na)RRRR-O2Oc-K(Biotin)	1485,85 <sup>a</sup> (1484,83)	28,63 <sup>b</sup>

Alle Peptide wurden als Säureamide synthetisiert. Massenpeaks wurden detektiert als a) [M+H]<sup>+</sup> mit MALDI-MS. Für die analytische RP-HPLC wurde folgender Gradient verwendet: b) 0-60% Eluent B in 60 min. \*Alle Peptide waren >98% HPLC-rein. O2Oc = Ado-Linker. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Für die Peptide **GPM-1** ( $K_D = 170 \pm 50$  nM und  $K_D = 560 \pm 60$  nM), **GPM-1c** ( $K_D = 150 \pm 20$  nM und  $K_D = 270 \pm 130$  nM) und **15** ( $K_D = 530 \pm 70$  nM und  $K_D = 2000 \pm 720$  nM) konnten Dissoziationskonstanten gegenüber Gai1·GDP und Gas·GDP per SPR abgeschätzt werden (Abbildung 31). Der ermittelte  $K_D$ -Wert für **GPM-1** lag im Bereich der MST-abgeleiteten Bindungsaffinitäten ( $K_D = 137 \pm 20$  nM und  $K_D = 630 \pm 90$  nM, Abbildung 26). Für **GPM-1c** wurde eine minimal höhere Bindungsaffinität zu Gai1·GDP und Gas·GDP im Vergleich zu **GPM-1** erhalten. Im Gegensatz dazu, zeigte Peptid **15** in beiden Fällen eine Bindungsaffinität zu Gai1·GDP und Gas·GDP, jedoch war diese deutlich geringer als die von **GPM-1** und **GPM-1c**.

Dies könnte mit der sequentiellen Ähnlichkeit von Peptid **15** und **GPM-1** begründet werden, da beide aus einer hohen Anzahl an Argininen und hydrophoben, aromatischen Aminosäuren bestehen. Die Bestimmung der Bindungsaffinität für **GPM-1d** war auch per SPR nicht möglich, weil nur geringe Änderungen in der relativen „Response“ beobachtet wurden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die rigide Ringstruktur in Kombination mit der Immobilisierung des Peptides dazu geführt hat, dass die Proteinbindung zu gehindert für die Bestimmung der Bindungsaffinität war. An dieser Stelle wurde angenommen, dass eine Bindungsaffinität des Peptides gegenüber  $\text{Gai1}\cdot\text{GDP}$  und  $\text{Gas}\cdot\text{GDP}$  besteht, da für das zyklische **GPM-1b** und das CPP-Konstrukt **GPM-1c**, jeweils eine Affinität gegenüber  $\text{Gai1}\cdot\text{GDP}$  und  $\text{Gas}\cdot\text{GDP}$  beobachtet werden konnte. Das Peptid wurde daher direkt in den funktionellen Studien eingesetzt.<sup>[137]</sup>

Insgesamt zeigten alle **GPM-1**-Derivate eine vergleichbare Bindungsaffinität gegenüber  $\text{Gai1}\cdot\text{GDP}$  mit Dissoziationskonstanten zwischen 137-170 nM und eine niedrigere Bindungsaffinität gegenüber  $\text{Gas}\cdot\text{GDP}$ , mit einem größeren  $K_D$ -Wertebereich zwischen 270-1010 nM. Die sehr ähnlichen Dissoziationskonstanten lassen sich vermutlich durch die hohe sequentielle Ähnlichkeit der Peptide begründen.<sup>[137]</sup>

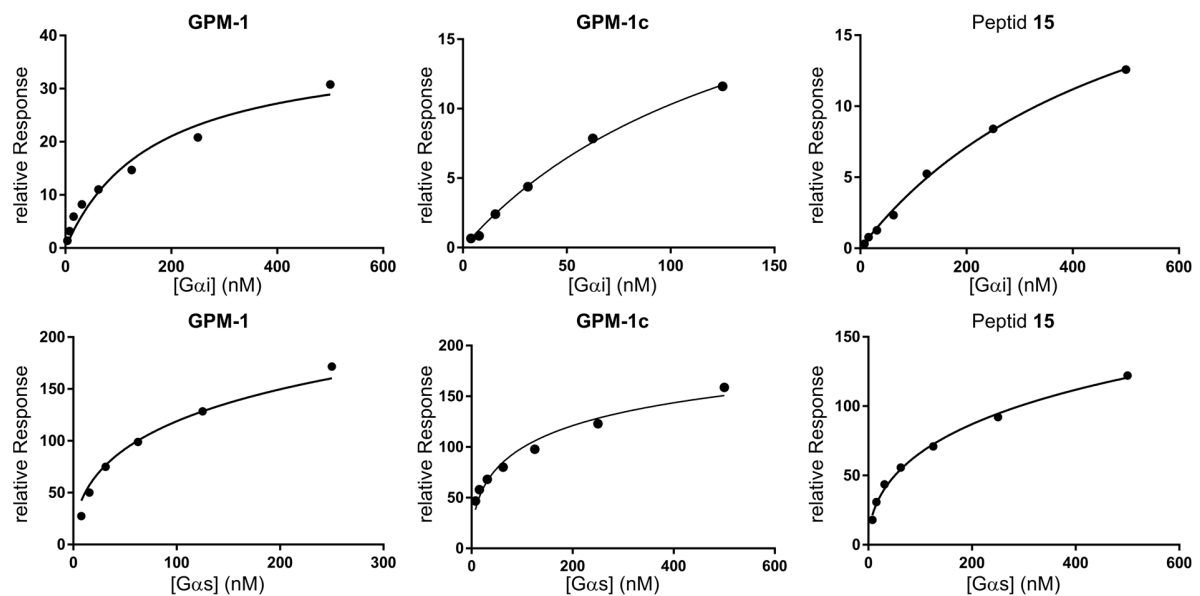


Abbildung 31: SPR-abgeleitete Bindungskurven von immobilisiertem Btn-**GPM-1**, Btn-**GPM-1c**, und Btn-**15** mit  $\text{Gai1}$  und  $\text{Gas}$  als Analyten. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

### 5.1.5 Bioaktivitätsstudien

Es wurden zwei verschiedene funktionelle Analysen der **GMP-1**-Peptidserie durchgeführt, um deren Effekt auf intakte G-Protein-vermittelte Signaltransduktionswege zu analysieren. Der erste Ansatz, der in Kooperation mit Prof. Dr. Hermann Ammer (LMU München) durchgeführt wurde, war ein zellfreier Ansatz mit NG105-18 Membranpräparationen, die inhibitorische ( $\delta$ -Opiodrezeptor) und stimulierende ( $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor) GPCR-Systeme besitzen und auf der Ebene der Adenylatzyklase (AC) zusammenlaufen. Somit konnte das generierte cAMP-Level in einem ELISA nach Horton et al.<sup>[370]</sup> zur Evaluation der Peptideffekte (bei 10  $\mu$ M Peptidkonzentration) verwendet werden. Die Regulation der Gs-Funktion wurde unter basalen, Isoproterenol (Iso, Gs-Rezeptoraktivierung)- und Forskolin (Fsk, direkte AC-Aktivierung)-stimulierten Bedingungen untersucht, während die DADLE ([Tyr-D-Ala<sup>2</sup>-Gly-Phe-D-Leu<sup>5</sup>]Enkephalin)-vermittelte Hemmung der Fsk-stimulierten cAMP-Produktion zur Identifizierung von regulatorischen Effekten auf Gi genutzt wurde (Abbildung 32).<sup>[137]</sup>

Der zweite Ansatz wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Evi Kostenis (Universität Bonn) durchgeführt und stellte ein zellbasiertes Experiment unter Verwendung von HEK293-Zellen mit überexprimiertem SNAP- $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor ( $\beta$ 2AR) dar. Dieser wurde für die konzentrationsabhängige Analyse des Gs-Signalwegs (Iso-Stimulation, FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer)-basierter cAMP-Readout, CIS bio GmbH) herangezogen. Im zellbasierten Ansatz ist die Zellpermeabilität der Peptide für die Modulation der G $\alpha$ -Aktivität entscheidend, wohingegen im zellfreien Ansatz die Zellpermeabilität nicht erforderlich ist. Da Änderungen des cAMP-Spiegels die Summe aller G-Proteinaktivitäten darstellen, erlauben die beiden Ansätze die Identifizierung der regulatorischen Effekte auf die dominanten Signalkaskaden.<sup>[137]</sup>

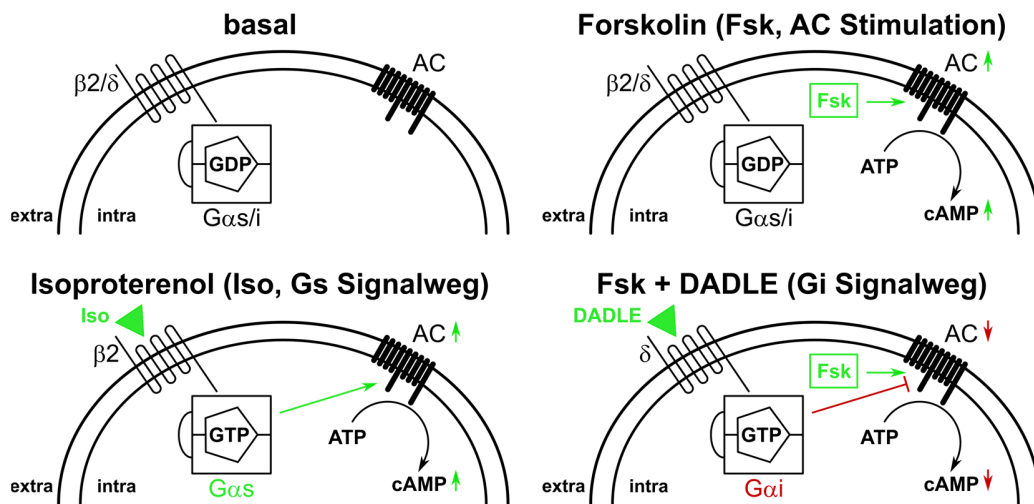


Abbildung 32: Schematische Darstellung der einzelnen Zustände innerhalb der Aktivitätsstudien an NG108-15-Membranpräparationen. Basal: GPCR ( $\beta$ 2 oder  $\delta$ ) für Ligandbindung verfügbar, G $\alpha$ -Aktivität wird unabhängig von den GPCRs gemessen. Isoproterenol (Iso) bindet an den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor und aktiviert den Gs-Signalweg. Aktiviertes Gs stimuliert die AC, was zu einem erhöhten cAMP-Spiegel führt. Forskolin (Fsk) stimuliert die AC und erhöht ebenfalls den cAMP-Spiegel. Fsk+DADLE: Fsk stimuliert die cAMP-Produktion durch direkte Aktivierung der AC. DADLE ([Tyr-D-Ala<sup>2</sup>-Gly-Phe-D-Leu<sup>5</sup>]Enkephalin) bindet an den  $\delta$ -Opiodrezeptor und aktiviert den Gi-Signalweg. Aktiviertes Gi bindet an die AC und hemmt die Fsk-stimulierte cAMP-Produktion. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Die drei identifizierten, Gαi1·GDP-bindenden OBOC-Hits, d.h. die Peptide **2**, **7** und **10**, zeigten keinen Effekt auf die Gi- und Gs-Aktivität. Im Gegensatz dazu konnten funktionelle Effekte von **GPM-1** und dessen Derivaten beobachtet werden. Im ELISA-basierten Ansatz konnte im Allgemeinen eine Reduktion um ~5-16% des Iso-stimulierten Gs-Effekt und ein Sinken um ~5-22% des Fsk-stimulierten AC-Effekts im Vergleich zur Kontrolle (w/o) beobachtet werden (Abbildung 33A). Für **GPM-1** wurde eine Erhöhung der basalen, Iso- und Fsk-stimulierten AC-Aktivität beobachtet, wobei gleichzeitig eine relative, aber geringe, Hemmung (~10%) der Iso-stimulierten AC-Aktivität und somit des Gs-Signalwegs identifiziert werden konnte. Im zellbasierten Experiment wurde insbesondere bei hohen Peptidkonzentrationen eine leichte Reduktion (~20%) der Iso-vermittelten cAMP-Produktion festgestellt (Abbildung 33B). Der aufgetretene Effekt im zellbasierten Ansatz könnte trotz fehlender CPP-Verknüpfung dadurch erklärt werden, dass **GPM-1** aus primär basischen (Nettoladung: +3) und hydrophoben Aminosäuren besteht, eine Eigenschaft die viele CPP-Sequenzen aufweisen (Kapitel 2.1, Tabelle 1).<sup>[62,63]</sup> Es ist daher denkbar, dass **GPM-1** auch zellgängig ist. Der Effekt von **GPM-1** könnte insgesamt als GDI-Aktivität gegenüber Gas gedeutet werden, eine funktionale Aktivität, die bereits für das sequentiell sehr ähnliche KB-752 in Membranpräparationen beschrieben wurde.<sup>[331]</sup> Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass KB-752 innerhalb des zellfreien Experiments einen ähnlichen Effekt wie **GPM-1** auf den Gs-vermittelten Signalweg verursachte (Abbildung 33A). Im Gegensatz zu **GPM-1** wurde für KB-752 kein Einfluss auf die Gs-Aktivität im zellbasierten Ansatz beobachtet, was mit einer fehlenden Zellpenetration begründet werden kann (Abbildung 33B). KB-752 besitzt im Vergleich zu **GPM-1** negativ geladene Aminosäurereste und eine Nettoladung von ±0, was die Zellpenetration dieses Peptides weniger begünstigt als die positive Nettoladung von **GPM-1**. Die **GPM-1 Y5A**-Mutante verursachte keinen Effekt auf den Gs-vermittelten Signalweg im zellfreien Experiment, was die Schlussfolgerung des KB-752-ähnlichen Einfluss von **GPM-1** auf den Gs-Signalweg unterstützt (Abbildung 33A).<sup>[331]</sup> Wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben, ist Phe8 in KB-752 und die entsprechende aromatische Position in Proteinen mit GEM-Aktivität (z.B. Phe168 im GIV-GEM-Peptid) entscheidend für die GEM-Wirkung.<sup>[148,331,388]</sup> Da die äquivalente Mutation Tyr5Ala in **GPM-1** zu einem vergleichbaren Resultat in den funktionellen Studien geführt hat, kann geschlussfolgert werden, dass **GPM-1** wahrscheinlich eine GDI-Wirkung auf Gas vergleichbar zu beschriebenen GEMs besitzt.<sup>[148,331,388]</sup> Für **GPM-1b** wurde weder im zellfreien noch im zellbasierten Ansatz ein Effekt auf Gs beobachtet, obwohl eine höhere Gas-Bindungsaffinität im Vergleich zu **GPM-1** erhalten wurde (Abbildung 33). Möglicherweise kann dies mit der rigideren Struktur begründet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die lineare Version, d.h. Peptid **14**, eine vergleichbare Wirkung wie **GPM-1** im zellbasierten Experiment (Abbildung 33B). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die zyklische Struktur sich negativ auf den funktionellen Effekt von **GPM-1b** ausgewirkt hat. Für Peptid **15** wurde kein Effekt auf Gs im zellbasierten Experiment beobachtet, weshalb das Peptid als inaktiv deklariert wurde (Abbildung 33). Dieses Peptid zeigte im zellfreien Ansatz einen Effekt, welcher denkbarenweise von unspezifischen Wechselwirkungen verursacht worden sein könnte. Die CPP-Konstrukte **GPM-1c** und **GPM-1d** bewirkten insgesamt eine Reduktion der basalen, Iso- und Fsk-stimulierten cAMP-Level, ein Effekt der mit einer Reduktion um ~10% der Iso-stimulierten AC-Aktivität einherging (Abbildung 33). Der letztgenannte Effekt wurde auch für **GPM-1** beobachtet und war im zellbasierten Ansatz zwischen 1 µM und 10 µM verstärkt für **GPM-1c** und **GPM-1d** sichtbar. Zusammenfassend wurde die größte Reduktion der Gs-Stimulation für **GPM-1c** und **GPM-1d** beobachtet, die daher als bessere GDIs im Vergleich zu **GPM-1** betrachtet werden.<sup>[137]</sup>

Den Gi-Signalweg betreffend konnte für **GPM-1**, **GPM-1b**, **GPM-1 Y5A**, KB-752 und Peptid **15** kein Einfluss auf die Fsk-stimulierte AC-Aktivität und die DADLE-vermittelte Inhibition der AC-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 33A). Die Peptide **GPM-1c** und **GPM-1d** zeigten hingegen eine aktivierende Wirkung auf Gi. Die DADLE-vermittelte Inhibition der AC-Aktivität wurde im Falle von **GPM-1c** nahezu aufgehoben, wohingegen **GPM-1d** einen reziproken (~10%) Anstieg der AC-Aktivität zeigte. Diese Effekte könnten als GEF-Aktivität gegenüber Gai interpretiert werden, ein Effekt, der ebenso für KB-752 beschrieben wurde und zu einer erhöhten Gi-Aktivität führt.<sup>[152,331]</sup> Insgesamt deuten die Resultate darauf hin, dass vor allem **GPM-1c** und **GPM-1d** nicht nur an die G $\alpha$ -Untereinheiten binden können, sondern auch deren Funktion regulieren können, nämlich als GEF für Gai und als GDI für Gas. Diese bifunktionale, GEM-ähnliche Wirkung, die für **GPM-1d** stärker ausgeprägt zu sein scheint als für **GPM-1c**, wurde bereits für einige wenige Proteine (Kapitel 2.3.1.4) sowie die beiden Peptide KB-752 und GSP (Kapitel 2.3.3.4) beschrieben.<sup>[126,127,209–212,214,331,333]</sup> Der Grund für die Funktionalität der Peptide liegt vermutlich in ihrer Zellpermeabilität begründet, weshalb sich die Kopplung der CPP-Einheit an die **GPM-1**-Leitstruktur als zielführend herausgestellt hat. Im Vergleich zu **GPM-1c** ist es vorteilhaft, dass **GPM-1d** die zyklische **GPM-1**-Sequenz enthält, die das Peptid strukturell und proteolytisch stabilisiert. Der unterschiedliche Effekt von **GPM-1b** und **GPM-1d** lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass durch die Dap- und Isophthalsäureeinheit der Zyklus für **GPM-1d** geringfügig größer ist als bei **GPM-1b**, bei dem nur einem Lysinrest zusätzlich zur **GPM-1**-Sequenz eingebaut wurde. Dies könnte möglicherweise zu einer leicht höheren Flexibilität und besseren G $\alpha$ -Interaktion von **GPM-1d** im Vergleich zu **GPM-1b** führen.<sup>[137]</sup>

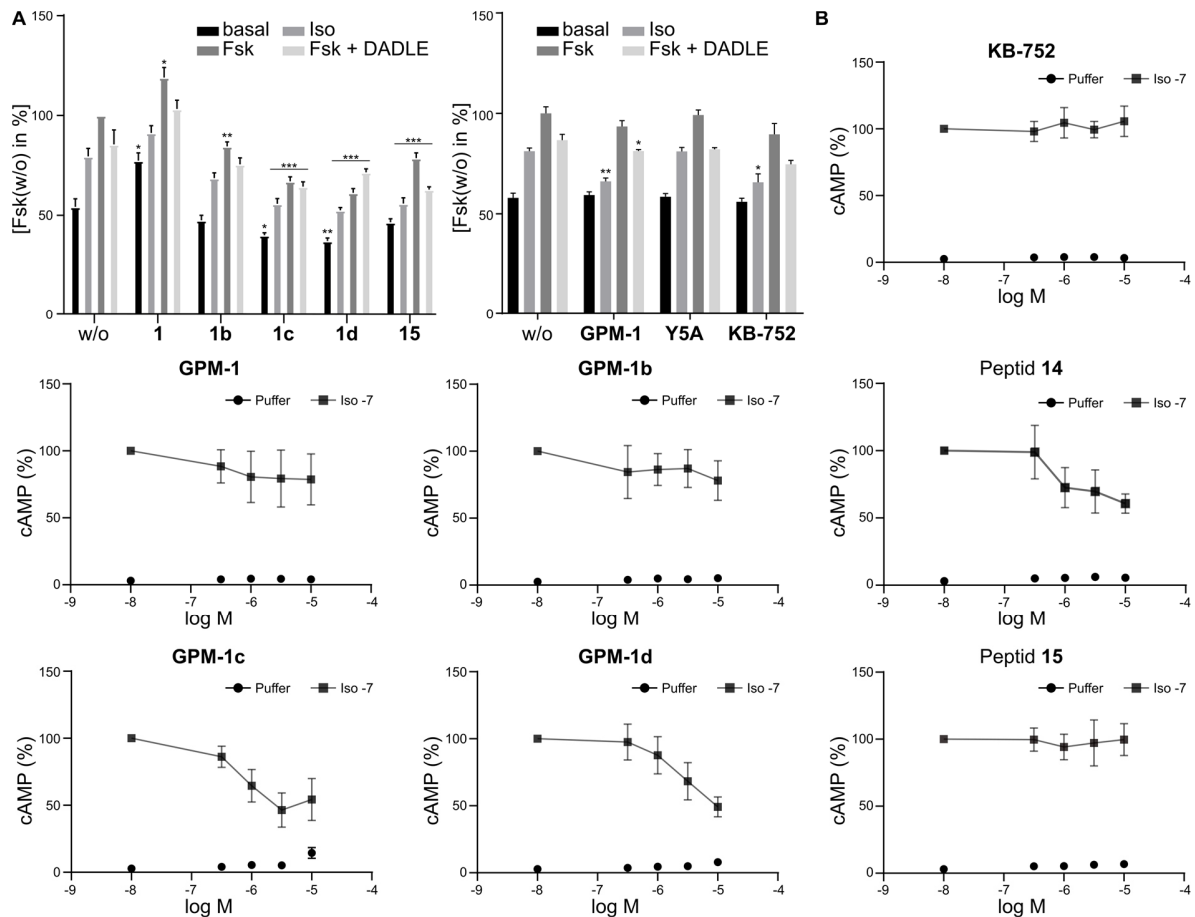


Abbildung 33: Funktionelle Untersuchungen von **GPM-1** und dessen Derivaten. **A**: Relative cAMP-Spiegel von unterschiedlich induzierten NG108-15-Membranpräparationen, die mit/ohne potentielle G-Protein-Modulatoren (**GPM-1**, **GPM-1b-d**, **GPM-1 Y5A**, KB-752 und **15**) in Gegenwart eines Phosphodiesteraseinhibitors inkubiert wurden. Die cAMP-Spiegel wurden auf Fsk der Kontrolle (w/o) normiert. Dargestellt sind die prozentualen Werte von Membranen, die in Abwesenheit (basal) oder in Anwesenheit von Iso, Fsk und Fsk+DADLE inkubiert wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) für n=3 dar. Die statistische Analyse wurde mit dem One-Way ANOVA Test Dunnet korrigiert durchgeführt, mit \*p<0,05, \*\*p<0,01, und \*\*\*p<0,0001 im Vergleich zur Kontrolle (w/o). **B**: Iso-induzierte cAMP-Produktion in HEK293-Zellen. Dargestellt sind die Pufferkontrollen (Punkt) und die Iso-Werte (Quadrat) für **GPM-1**, **GPM-1b-d**, **14**, **15** und KB-752 in % cAMP. Fehlerbalken stellen SD für n=3 dar. Keines der Peptide beeinflusste die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test an HEK293-Zellen bei einer maximalen Konzentration von 10 µM. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte der Peptide nicht durch eine Beeinflussung der Zellvitalität verursacht wurden, wurde ein MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Test durchgeführt. Keines der **GPM-1**-Derivate zeigte bei einer maximalen Konzentration von 10 µM einen Effekt auf die Vitalität von HEK293-Zellen, weshalb die beschriebenen Effekte auf funktionelle Aktivitäten der Peptide zurückgeführt werden konnten.<sup>[137]</sup>

### 5.1.6 Computerbasierte Studien zur Visualisierung der Peptid-Gai1/s-Interaktionen

Um Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der **GPM-1**-Peptidserie zu erhalten, wurden computerbasierte Studien von Dr. Ajay Abisheck Paul George (BioSolveIT GmbH) durchgeführt. Die Interpretation und die Durchführung der Studien erfolgten in enger Zusammenarbeit.

Für die Visualisierung der Peptid-Gai1-Interaktionen wurde zunächst ein Gai1-GDP-Homologiemodell erstellt. Der Großteil dieses Homologiemodells besteht aus der 1. Struktur des Strukturensambles von humanen Gai1-GDP, welches mittels NMR und SAXS aufgeklärt wurde (PDB: 5JS8<sup>[136]</sup>). Da 31 Aminosäuren am N-Terminus dieser Struktur fehlen, wurde der N-Terminus aus der Kristallstruktur einer humanen, GDP-gebundenen G202A-Mutante ergänzt (PDB: 3UMS<sup>[135]</sup>) und die Struktur durch eine 500 ps Simulation nach Krieger et al.<sup>[390]</sup> verfeinert (Struktur in Abbildung 6, Seite 12 dargestellt). Die Struktur mit der geringsten Energie wurde in allen weiteren Studien eingesetzt. Für die Analyse der Peptid-Gas-Interaktionen wurde die Gas-Struktur (Chain I, PDB: 6EG8<sup>[143]</sup>) aus der Struktur des GDP-gebundenen Heterotrimer isoliert. Die 3D-Peptidstrukturen von **GPM-1**, **GPM-1b-d**, **GPM-1 Y5A** und Peptid **15** wurden aus den erstellten FASTA-Dateien mit natürlichen Aminosäuren als Platzhalter für die unnatürlichen Bausteine generiert und anschließend manuell zu den korrekten Strukturen verändert. Danach wurden die Peptidstrukturen einer 100 ns langen „all-atom“ MD-Simulation unterzogen. Die strukturell äquilibrierten Strukturen (Abbildung 34) wurden in einem „Ensemble“ Blind-Docking-Ansatz<sup>[378,379]</sup> an Gai1 und Gas gedockt. Blind-Docking-Protokolle werden üblicherweise verwendet, um nach möglichen Bindungsstellen und Bindungsmodi von Peptidliganden an der Oberfläche der Zielproteine zu suchen. Anhand des „Ensemble Dockings“ wird ein Ensemble von multiplen Konformationen durch frei bewegliche Seitenketten auf einem festen Rückgrat erzeugt.<sup>[137,378,379]</sup>

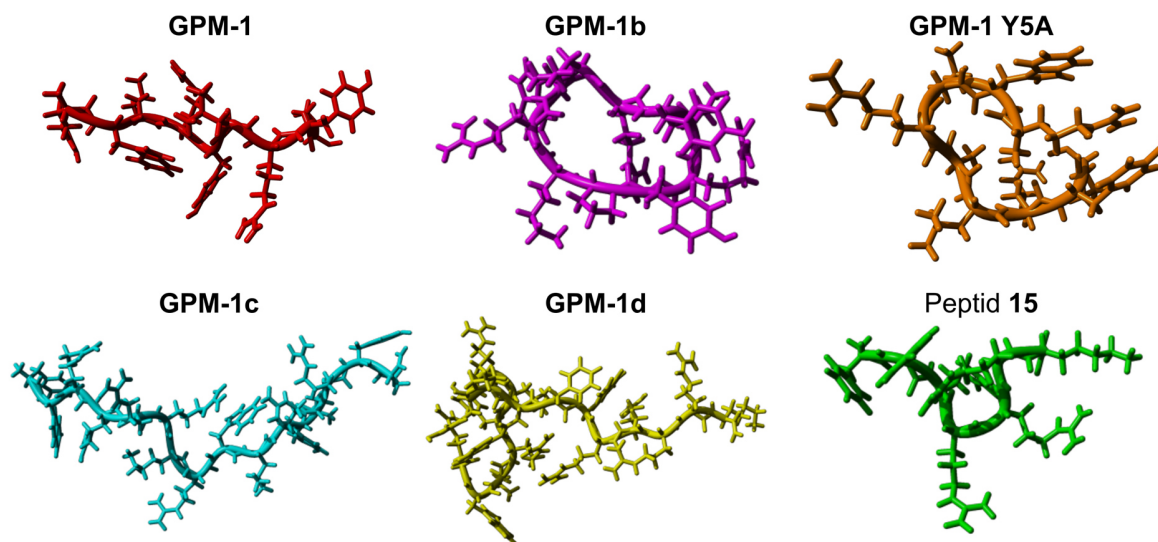


Abbildung 34: Computerbasierte Peptidstrukturen nach 100 ns-MD-Simulation der Peptide **GPM-1** (rot), **GPM-1b** (magenta), **GPM-1 Y5A** (orange), **GPM-1c** (cyan), **GPM-1d** (gelb) und Peptid **15** (grün). Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Für **GPM-1** wurde ähnlich wie für KB-752 und dem GEM-Motiv von GIV eine Bindung an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region von Gai beobachtet (Abbildung 35, Abbildung 36A-C, Seite 88).<sup>[148,152]</sup> Die strukturelle Änderung zwischen dem gebundenen Zustand ( $3,42 \pm 0,98$  Å) und dem freien Peptid



( $3,44 \pm 1,20 \text{ \AA}$ ) war nahezu identisch, was impliziert, dass die Dynamik des Peptides nicht durch die Proteinbindung beeinflusst wurde. In dem gebildeten **GPM-1**-Gai-Komplex wurden hydrophobe Wechselwirkungen der Ringsysteme von Trp2, Tyr5, Tyr8 und Pro9 mit der Gai1-Bindungsstelle beobachtet. Zusätzlich wurde der Komplex durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asn250<sup>G.H3.14</sup> und Trp2, Lys252<sup>G.H3.16</sup> und Arg7 sowie zwischen Arg203<sup>G.H2.4</sup> (Switch II) und Arg4 stabilisiert. Besonders signifikant war die Beobachtung der  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung zwischen Phe210<sup>G.h2b4.1</sup> (Switch II) und Tyr5. Diese entscheidend stabilisierende Interaktion wurde an entsprechender Position auch für GEMs beschrieben und stellte die Grundlage für das Mutationsexperiment mit der **GPM-1 Y5A**-Mutante dar.<sup>[126,148,152,331,388]</sup> Die Interpretation des GEM-ähnlichen Verhaltens von **GPM-1** kann mit der Tatsache bekräftigt werden, dass die Mutante **GPM-1 Y5A** nur eine schwache Bindung an eine andere Gai-Region zeigte (Abbildung 36I, L).<sup>[148,152,331]</sup> Die computerbasiert berechnete Bindungsaffinität mittels der Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA)-Methode<sup>[391]</sup> betrug  $-300,23 \text{ kJ/mol}$  für **GPM-1** und  $-401,87 \text{ kJ/mol}$  für **GPM-1 Y5A** (Tabelle 19, Seite 89). Bei dieser Methode weisen positivere Werte auf eine höhere Bindungsaffinität hin, wobei negative Werte nicht eine fehlende Bindungsaffinität bedeuten.<sup>[391]</sup> Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass Tyr5, analog zu Phe8 in KB-752 und Phe168 im GIV-GEM-Peptid, bedeutend für die Bindung an die Switch II-Region und einhergehend die funktionelle Aktivität ist.<sup>[126,137,148,152,331,388]</sup>

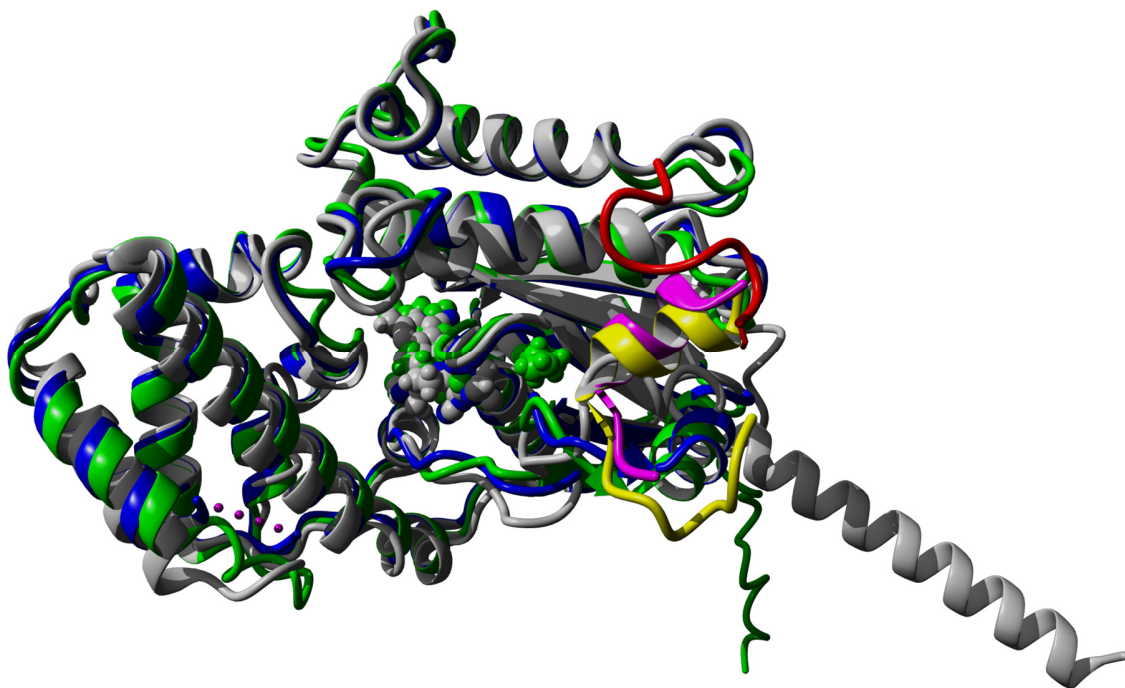


Abbildung 35: Strukturalignment zwischen Gai-Strukturen und gebundenen Modulatoren. Gai1 (blau: PDB: 1Y3A<sup>[152]</sup>, Kette B, grün: PDB: 6MHF<sup>[148]</sup>, grau: Homologiemodell) gebunden an KB-752 (rosa, PDB: 1Y3A<sup>[152]</sup>), das GIV-GEM-Peptid (gelb, PDB: 6MHF<sup>[148]</sup>), und **GPM-1** (rot). Das Rückgratalignment zeigte einen RMSD von  $1,63 \text{ \AA}$  über 285 ausgerichtete Reste mit 99,30% Sequenzidentität. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Des Weiteren wurde im Kontext des GIV-abgeleiteten GEM-Peptids beschrieben, dass die G $\beta$  $\gamma$ -Bindung und die gleichzeitige Bindung von GIV an Gai sich gegenseitig ausschließen.<sup>[148]</sup> Begründet wurde dies unter anderem durch die Interaktionen des GEM-Kernmotiv mit Switch II, einer G $\alpha$ -Kontaktfläche, die auch für das G $\beta$  $\gamma$ -Dimer beschrieben wurde (Kapitel 2.3.1.2).<sup>[142,148]</sup>

Diese Annahme kann auch für **GPM-1** aufgestellt werden, da **GPM-1** Kontakte zu Switch II, wie z.B. zu Phe210<sup>G.h2b4.1</sup>, eingeht. Phe210<sup>G.h2b4.1</sup> ist eines der Reste, die explizit in der Kristallstrukturanalyse des heterotrimeren G-Proteins von Wall et al.<sup>[142]</sup> für die Interaktion mit Gβγ beschrieben wurden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass **GPM-1**, analog zu GEMs, mit dem Gβγ-Dimer um die Gα-Bindung konkurrieren und so die Reassoziierung des Heterotrimeren inhibieren kann.<sup>[137,148]</sup>

Auch die Gai-Bindung von **GPM-1c** erfolgte an Switch II, α3 und β1 und wurde durch hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenketten von Phe1, Nal2, Trp9, Leu10 und Pro16 vermittelt (Abbildung 36D-F). Die Bindung wurde außerdem durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asp246<sup>H.H3.10</sup> und Arg5, Asp310<sup>G.h4b6.9</sup> und Arg8, Asp256<sup>H.h3s5.2</sup> und Tyr15 sowie Lys204<sup>G.H2.5</sup> (Switch II) und 2Nal verstärkt. Die Bindung von **GPM-1c** an Gai1 stabilisierte das Peptid ( $3,21 \pm 0,81$  Å) im Vergleich zu dessen freier Konformation ( $6,23 \pm 1,50$  Å). Die Analyse des **GPM-1d**-Gai1-Komplexes zeigte, dass **GPM-1d** in eine nahezu identische Bindungsregion an Gai1 wie **GPM-1c** bindet (Abbildung 36G, H). Die Bindung wurde wieder über hydrophobe Interaktionen (Trp2) und Wasserstoffbrücken (Asp246<sup>H.h3s5.2</sup>-Arg14, Asn250<sup>G.H3.14</sup>-Arg14, Asn251<sup>G.H3.15</sup>-Arg16, Lys252<sup>G.H3.16</sup>-Arg14, Glu211<sup>G.h2b4.1</sup> (Switch II)-Arg4) sowie π-π-Stapelwechselwirkungen (Tyr8, Isophthalsäure) stabilisiert. Durch die zyklische Grundstruktur ist das Peptid bereits „vororganisiert“, wodurch die Differenz des RMSD (*root-mean square deviation*)-Wertes zwischen gebundenem Peptid ( $2,79 \pm 0,66$  Å) und freiem Peptid ( $3,90 \pm 0,60$  Å) kleiner war. Für **GPM-1c** (67,56 kJ/mol) und **GPM-1d** (30,34 kJ/mol) wurden per MMPBSA-Methode die höchsten Bindungsaffinitäten bestimmt (Tabelle 19, Seite 89). Die geringere Bindungsaffinität von **GPM-1d** gegenüber **GPM-1c** lässt sich vermutlich durch die rigidere Peptidstruktur aufgrund des zyklischen Grundgerüst erklären, welches möglicherweise Peptid-Protein-Interaktionen, die in der linearen Variante möglich sind, einschränken. Dennoch war die berechnete Bindungsaffinität für beide Peptide höher als für **GPM-1**, was im Falle von **GPM-1c** die SPR-basierten Bindungsdaten bestätigt. Dies könnte möglicherweise durch einen positiven Beitrag der CPP-Einheit zur Bindungsaffinität aufgrund der zusätzlichen Interaktionen begründet werden. Da für **GPM-1d** keine Bindungsdaten experimentell erhalten werden konnten, kann als Konsequenz der computerbasierten Analysen zusammen mit der experimentell ermittelten funktionellen Aktivität des Peptides darauf geschlossen werden, dass **GPM-1d** mit einer hohen Bindungsaffinität an Gai1 bindet, wobei die Dissoziationskonstante vermutlich im Bereich von **GPM-1** und **GPM-1c** liegt. Die Inaktivität von **GPM-1b** und Peptid **15** in den Aktivitätsstudien stimmten sehr gut mit den computerbasierten Ergebnissen überein. Beide Peptide bewegten sich bei der Simulation der gedockten Komplexe weg von Gai1, wobei **GPM-1b** nur über langreichende, nicht-bindende Wechselwirkungen in der Nähe des Proteins gehalten wurde (Abbildung 36J, K) und Peptid **15** im ungebundenen Zustand verblieb. Entsprechend wurden für beide Peptide die niedrigsten Bindungsaffinitäten mittels der MMPBSA-Methode bestimmt (**GPM-1b**: -497,82 kJ/mol, Peptid **15**: -512,71 kJ/mol, Tabelle 19, Seite 89).<sup>[137]</sup>

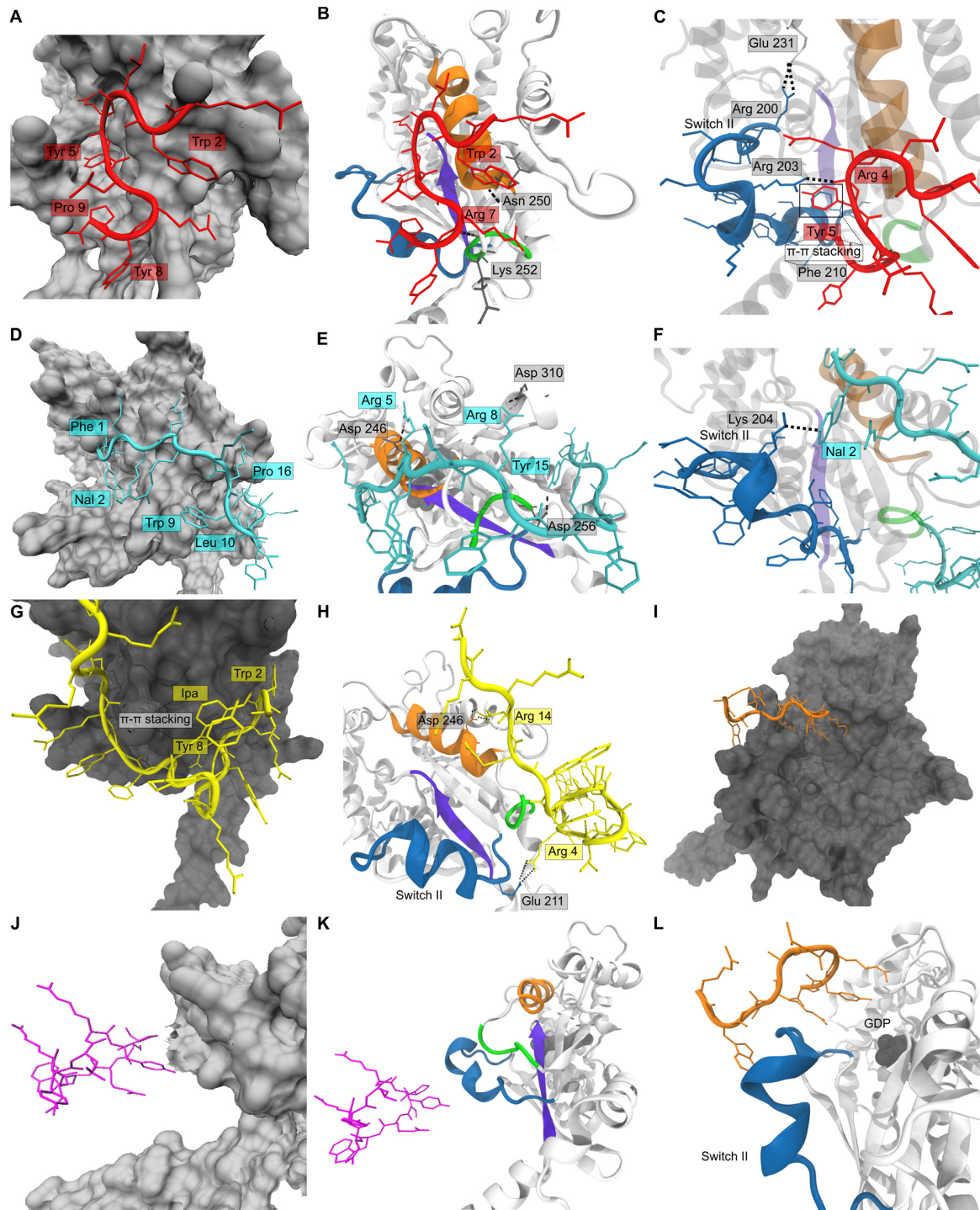


Abbildung 36: Gai-Peptid-Wechselwirkungen. Molekulare Oberfläche von Gai (grau), an die **A** **GPM-1** (rot), **D** **GPM-1c** (cyan), **G** **GPM-1d** (gelb), **I** **GPM-1 Y5A** (orange) und **J** **GPM-1b** (magenta) gebunden sind. Seitenketten, die an hydrophoben Wechselwirkungen mit Gai beteiligt sind, sind markiert. Gai (weiß) mit Switch II (blau),  $\alpha 3$  (orange),  $\beta 1$  (violett) und dem  $\alpha 3$ - $\beta 5$ -Loop (grün), an die **B-C** **GPM-1** (rot), **E-F** **GPM-1c** (cyan), **H** **GPM-1d** (gelb), **L** **GPM-1 Y5A** (orange) und **K** **GPM-1b** (magenta) gebunden sind. H-Brücken sind als schwarze Linien und  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen Tyr5 von **GPM-1** und Phe210<sup>G.h2b4.1</sup> als Quadrat gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Im Hinblick auf die postulierte GEF-Aktivität gegenüber Gai1 wurde mittels Berechnung der Bindungsaffinitäten von GDP zu Gai1 (-306,23 kJ/mol) in Gegenwart der Peptide eine unterstützende Beobachtung gemacht (Tabelle 19). Es wurde als allgemeiner Trend beobachtet, dass die Bindungsaffinität der Peptide zu Gai1 einen antikorrelierenden Effekt auf die Bindungsaffinität von Gai1 zu GDP hat. So wurde für **GPM-1c** und **GPM-1d** eine niedrigere Bindungsaffinität von Gai1 zu GDP im Vergleich zum Peptid-ungebundenen Komplex bestimmt, wohingegen die Bindungsaffinitäten von Gai1 zu GDP von **GPM-1 Y5A**, **GPM-1**, **GPM-1b** und Peptid **15** höher lagen als die Referenz (mit steigender Reihenfolge). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass **GPM-1c** und **GPM-1d** die GDP-Dissoziation begünstigen, was mit der Interpretation der experimentellen Daten korreliert, in der **GPM-1c** und **GPM-1d** als GEF für Gai1 angenommen wurden.<sup>[137]</sup>

Tabelle 19: Mittlere MMPBSA-Bindungsenergien.

Peptid	Mittlere MMPBSA Energie (kJ/mol)		Mittlere MMPBSA Energie (kJ/mol)	
	Peptid-Gai (kJ/mol)	GDP-Gai (kJ/mol)	Peptid-Gas (kJ/mol)	GDP-Gas (kJ/mol)
<b>GPM-1</b>	-300,23	286,27	110,53	166,73
<b>GPM-1b</b>	-497,82	318,34	n.d.	n.d.
<b>GPM-1c</b>	67,56	-436,38	288,24	332,78
<b>GPM-1d</b>	30,34	-433,67	192,74	246,87
<b>GPM-1 Y5A</b>	-401,87	158,65	-413,45	-198,12
<b>15</b>	-512,17	309,67	n.d.	n.d.
<b>N/A</b>	N/A	-306,23	N/A	-248,12

Die Berechnung dient der Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen jedem Peptid und Gai/s sowie der Wechselwirkung zwischen GDP und Gai/s, wenn ein bestimmtes Peptid gebunden ist. Die letzte Zeile zeigt die Bindungsenergie von GDP an Gai/s. Positivere Werte für Bindungsenergien bedeuten eine höhere Bindungsaffinität. n.d.: nicht bestimmt. Tabelle modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Die Dockingexperimente mit Gas wurden nur für die aktiven Peptide **GPM-1**, **GPM-1c** und **GPM-1d** sowie für die inaktive **GPM-1 Y5A**-Mutante durchgeführt (Abbildung 37). Die drei aktiven Peptide zeigten alle eine Gas-Bindung an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region. Durch die Bindung wurden alle drei Peptide stabilisiert (**GPM-1**:  $2,12 \pm 0,64$  Å, **GPM-1c**:  $2,71 \pm 1,11$  Å, **GPM-1d**:  $2,39 \pm 0,46$  Å) im Vergleich zu deren freier Konformation (**GPM-1**:  $3,44 \pm 1,20$  Å, **GPM-1c**:  $6,23 \pm 1,50$  Å, **GPM-1d**:  $3,90 \pm 0,60$  Å). Dieser Effekt war für **GPM-1c** am stärksten ausgeprägt. Die Komplexe wurden vergleichbar mit der Gai-Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken stabilisiert. Für **GPM-1c** konnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nal2 und Lys305<sup>G.HG.12</sup>, Arg5 und Glu262<sup>G.s4h3.13</sup>, Lys7 und Val114<sup>H.hahb.1</sup>, Trp9 und Glu259<sup>G.s4h3.10</sup> sowie Arg11 und Glu259<sup>G.s4h3.10</sup> beobachtet werden. Für **GPM-1d** wurden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arg2 und Asn112<sup>H.HA.28</sup>, Arg4 und Glu259<sup>G.s4h3.10</sup>, Lys17 und Ala48<sup>G.s1h1.1</sup> sowie Arg16 und Val224<sup>G.S3.8</sup> festgestellt. Für **GPM-1** wurden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arg1 und Asn271<sup>G.H3.7</sup>, Arg4 und Glu259<sup>G.s4h3.10</sup>, Tyr5 und Glu101<sup>H.HA.17</sup>, Arg7 und Asn136<sup>H.HB.14</sup>, sowie Tyr8 und Arg201<sup>G.hfs2.2</sup> verzeichnet.<sup>[137]</sup>



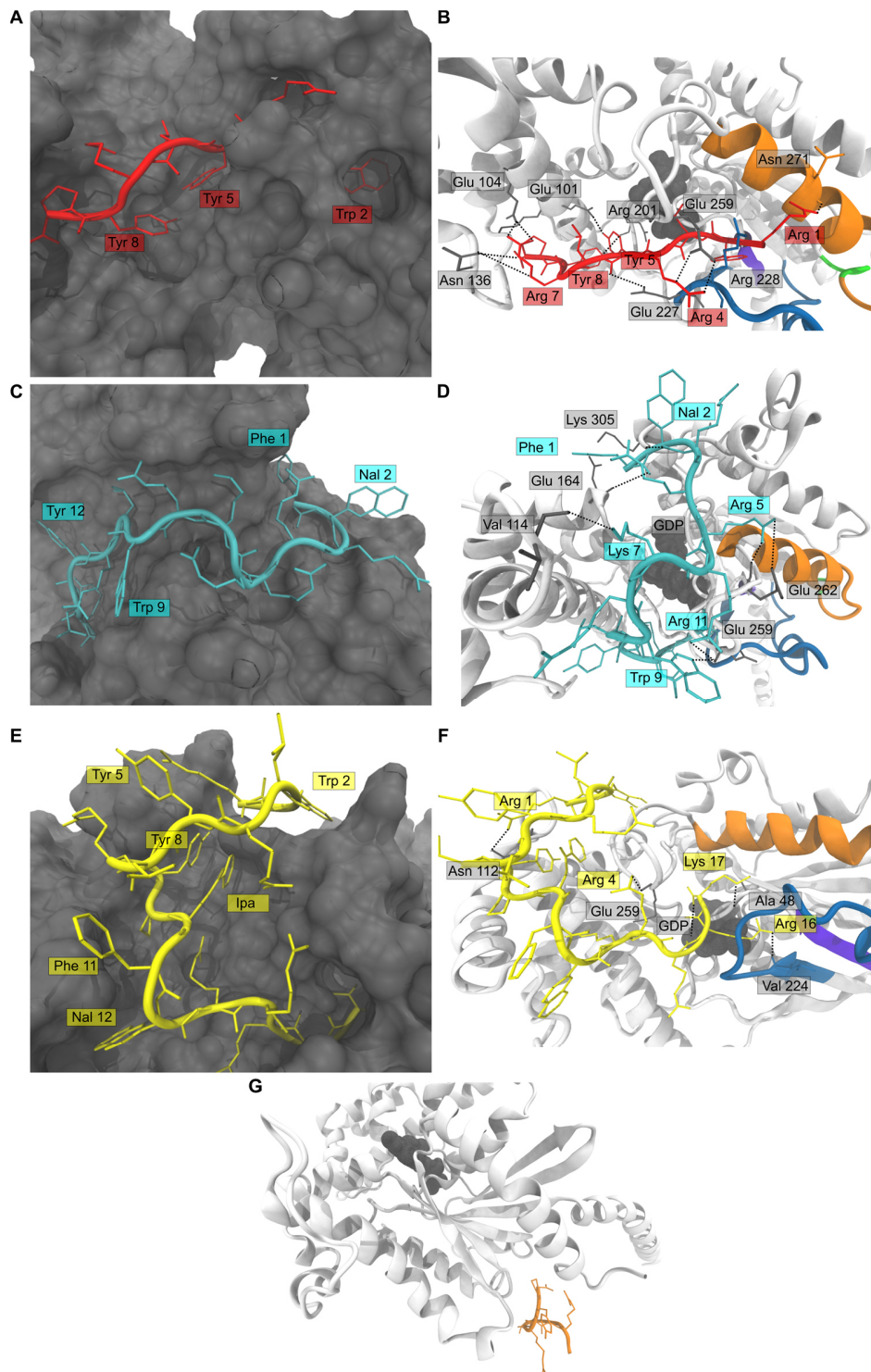


Abbildung 37: Gas-Peptid-Wechselwirkungen. Molekulare Oberfläche von Gas (grau), an die **A** GPM-1 (rot), **C** GPM-1c (cyan), **E** GPM-1d (gelb) gebunden sind. Seitenketten, die an hydrophoben Wechselwirkungen mit Gas beteiligt sind, sind markiert. Gas (weiß) mit Switch II (blau),  $\alpha 3$  (orange),  $\beta 1$  (violett) und dem  $\alpha 3$ - $\beta 5$ -Loop (grün), an die **B** GPM-1 (rot), **D** GPM-1c (cyan) und **F** GPM-1d (gelb) gebunden sind sowie **G** GPM-1 Y5A (orange) nicht mehr gebunden ist. H-Brücken sind als schwarze Linien gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

Die hydrophoben Interaktionen wurden über die Ringstrukturen von Phe1, Nal2, Trp9, Tyr12 und Tyr15 bei **GPM-1c**, Trp2, Phe11 und Nal12 bei **GPM-1d** sowie Trp2, Tyr5 und Tyr8 bei **GPM-1** vermittelt (Abbildung 37B, D, F). Auch hier war Tyr5 von **GPM-1** (entspricht Tyr12 in **GPM-1c** und Tyr5 in **GPM-1d**) wieder in entscheidende Wechselwirkungen mit Gas involviert, was den Fakt erklärt, dass die **GPM-1 Y5A**-Mutante bei der Simulation des gebundenen Komplexes dissoziierte und nicht gebunden vorlag (Abbildung 37G). Da beispielsweise für KB-752 ein Aktivitätsverlust gegenüber Gas bei Mutation von Phe8Ala, aber keine strukturellen Analysen beschrieben wurden, kann an dieser Stelle vermutet werden, dass ein aromatischer Rest in dieser Position wichtig für die Bindung sowie die GDI-Aktivität gegenüber Gas ist.<sup>[133]</sup> Zudem spiegelte das computerbasierte Ergebnis der Gai/s-Dockingexperimente die experimentell erhaltenden Bindungsdaten für **GPM-1 Y5A** wieder. Während eine schwächere Gai-Bindung der Mutante sowohl experimentell als auch computerbasiert beobachtet werden konnte, wurde in beiden Fällen keine Gas-Bindung erhalten.<sup>[137]</sup>

Die Berechnung der Bindungsaffinität von GDP für Gas ergab für die Peptide **GPM-1**, **GPM-1c** und **GPM-1d** einen positiven Effekt (Tabelle 19, Seite 89). Durch die Bindung der Peptide an die Switch II/ $\alpha$ 3-Region wurde das GDP-Molekül direkt überdeckt. Die höhere Bindungsaffinität von GDP zu Gas in Anwesenheit der Peptide weist auf eine GDI-ähnliche Aktivität der Peptide **GPM-1**, **GPM-1c** und **GPM-1d** hin, was die experimentellen Daten unterstützt. Somit wurde durch die computerbasierten Studien sowohl der GEF-Effekt gegenüber Gai als auch der GDI-Effekt gegenüber Gas, insbesondere für **GPM-1c** und **GPM-1d**, untermauert und somit ist eine GEM-ähnliche Wirkung der Peptide naheliegend.<sup>[137]</sup>

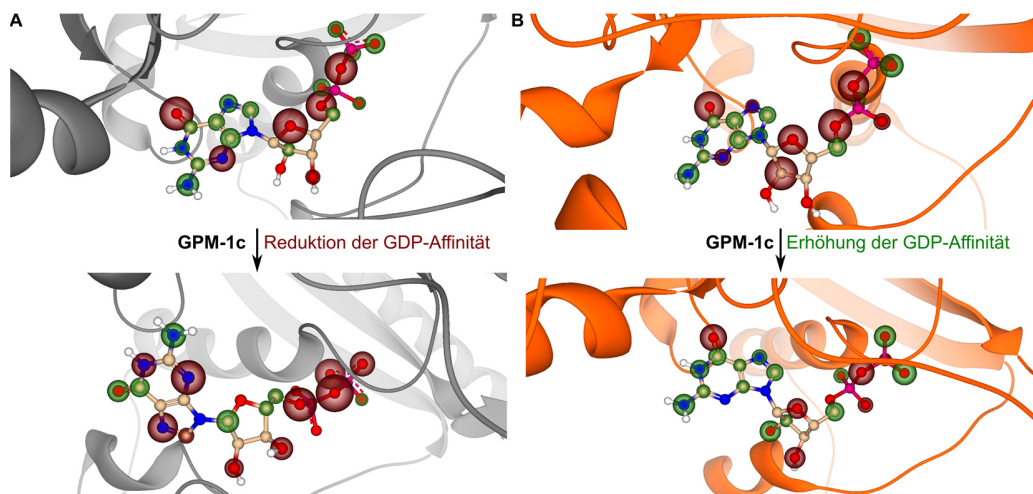


Abbildung 38: Visuelle Bewertung der Änderung der GDP-Bindungsaffinität bei Bindung von **GPM-1c** an Gai und Gas. In **A** ist Gai und in **B** Gas mit GDP (Kugelstabmodell) dargestellt, wobei grüne HYDE Coronas positive Beiträge zu den Bindungsaffinitäten und rote ungünstige Beiträge repräsentieren. Die Größe der Coronas ist proportional zu den zugrundeliegenden HYDE-Energiewerten. In **A** führt die Bindung von **GPM-1c** zur Reduzierung der GDP-Bindungsaffinität (Zunahme rote Coronas), während in **B** das Gegenteil beobachtet wird (Verringerung rote Coronas), was auf eine Verbesserung der GDP-Bindungsaffinität hinweist. Sowohl in **A** als auch in **B** ist oben die Ausgangsstruktur und unten der MD-Snapshot bei 50ns dargestellt. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

In einer weiteren Studie wurden drei Bindungsregionen bei einer computerbasierten Vorhersage von Bindungsstellen für das Gai1-Homologiemodell erhalten. Darunter waren die Nukleotidbindungsstasche, die Switch II/ $\alpha$ 3-Region und eine dritte Region, die partiell von **GPM-1c** und **GPM-1d** adressiert wird. Die zweite Bindungsstelle an der Switch II/ $\alpha$ 3-Region, an die **GPM-**

**1**, **GPM-1c** sowie **GPM-1d** zu einem großen Anteil binden, scheint, wie bereits zuvor vermutet und für niedermolekulare Verbindungen beschrieben, tatsächlich gut adressierbar für Binder zu sein.<sup>[17,306]</sup> Bei einer analogen Vorhersage für Bindungsstellen an Gas wurden ebenfalls drei Regionen ermittelt. Diese Regionen beinhalteten die Nukleotidbindungstasche, die Switch II/ $\alpha$ 3-Region und eine Bindungsoberfläche, an die die **GPM-1 Y5A** Mutante bindet (vor Dissoziation des Komplexes). Die Tatsache, dass die hier identifizierten Peptide an diese Region binden und eine Aktivität zeigen und auch Hilfsproteine an diese Bindungsstelle binden und funktionell die  $\alpha$ -Proteinaktivität beeinflussen, unterstützt die Schlussfolgerung, dass die Switch II/ $\alpha$ 3-Region eine geeignete Region ist, um Modulatoren für die  $\alpha$ -Proteinaktivität zu entwickeln.<sup>[17,137,146,148,149,152]</sup>

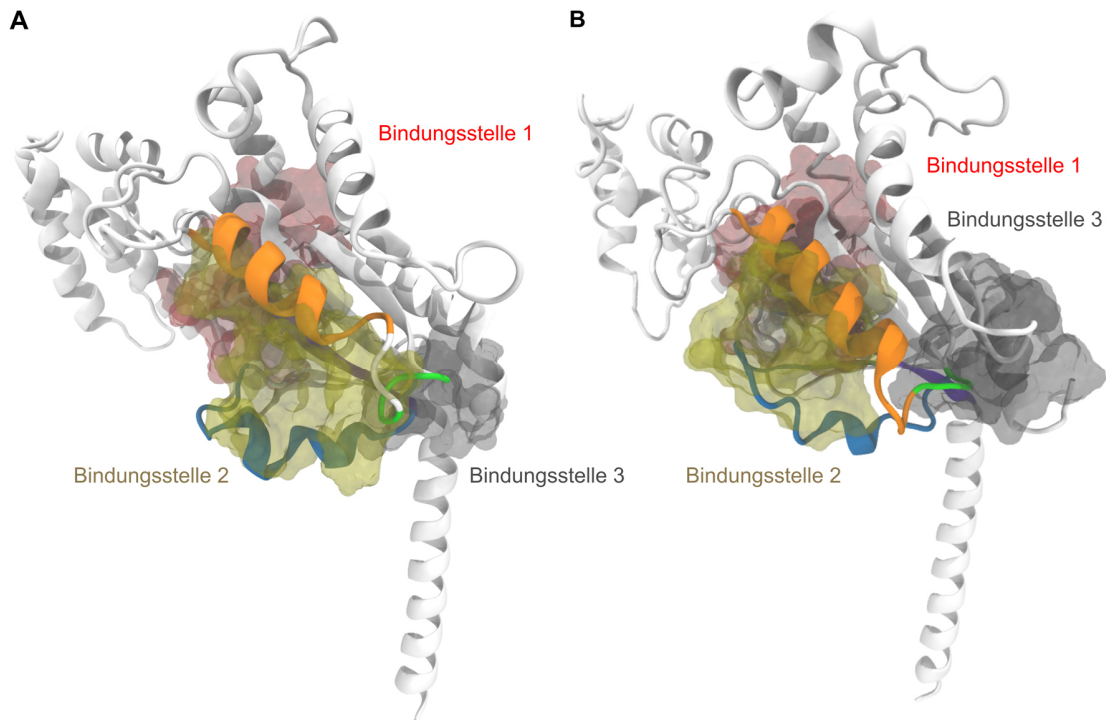


Abbildung 39: Computergestützte vorhergesagte Bindungsstellen auf Gai1 und Gas. Für beide Proteine wurden drei Hauptbindungsstellen durch den DoGSiteScorer<sup>[382]</sup> Algorithmus vorhergesagt. Die GDP-Bindungsstelle ist als Bindungsstelle 1 (rot), die Switch II/ $\alpha$ 3-Region als Bindungsstelle 2 (gelb) und eine dritte Region als Bindungsstelle 3 (grau) dargestellt. In **A** ist Gai1 (Homologiemodell) und in **B** Gas (PDB: 6EG8<sup>[143]</sup>, Kette 1) mit Switch II (blau),  $\alpha$ 3 (orange),  $\beta$ 1 (cyan), und  $\alpha$ 3- $\beta$ 5-Loop (grün) gezeigt. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[137]</sup>

### 5.1.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Entwicklung von  $\alpha$ -Proteinmodulatoren ausgehend von linearen Peptidsequenzen aus einem OBOC-Peptidbibliotheksscreenings gegen Gai1·GDP beschrieben. Bei der Analyse der identifizierten Hits konnte ein allgemein basisch-hydrophober Trend innerhalb der einzelnen Positionen beobachtet werden, sowie das Auftreten von polar-neutralen Aminosäuren an ausgewählten Positionen. Es wurden 13 Hits für die Evaluation des Screeningergebnisses synthetisiert und analytisch charakterisiert. Vier der 13 Peptide zeigten eine hohe Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich gegenüber Gai1, wobei Peptid **1** (**GPM-1**) die höchste Bindungsaffinität gegenüber Gai1·GDP und auch eine Affinität zu Gas·GDP zeigte. **GPM-**

**1** wies zudem eine hohe sequentielle Übereinstimmung zum  $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv auf. Dieses Motiv ist auch in literaturbekannten Peptiden aus Hochdurchsatzscreenings gegen Gai zu finden, die ebenso mit hoher Affinität an Gai/s binden. Zudem wurde eine hohe sequenzielle Ähnlichkeit mit dem GEM-Kernmotiv ( $\Phi T\Phi X[D/E]F\Phi^{[213]}$ ) von GIV und anderen Proteinen mit GEM-Aktivität beobachtet, weshalb **GPM-1** als Leitstruktur für weitere Optimierungsschritte eingesetzt wurde. Mit der Intention die proteolytische Stabilität und die Zellpenetration der Leitstruktur zu verbessern, wurden zyklische Derivate (**GPM-1b**, **GPM-1d**, **GPM-1e**) und CPP-Konstrukte (**GPM-1c**, **GPM-1d**, **GPM-1e**) entworfen, synthetisiert und analytisch charakterisiert.<sup>[137]</sup>

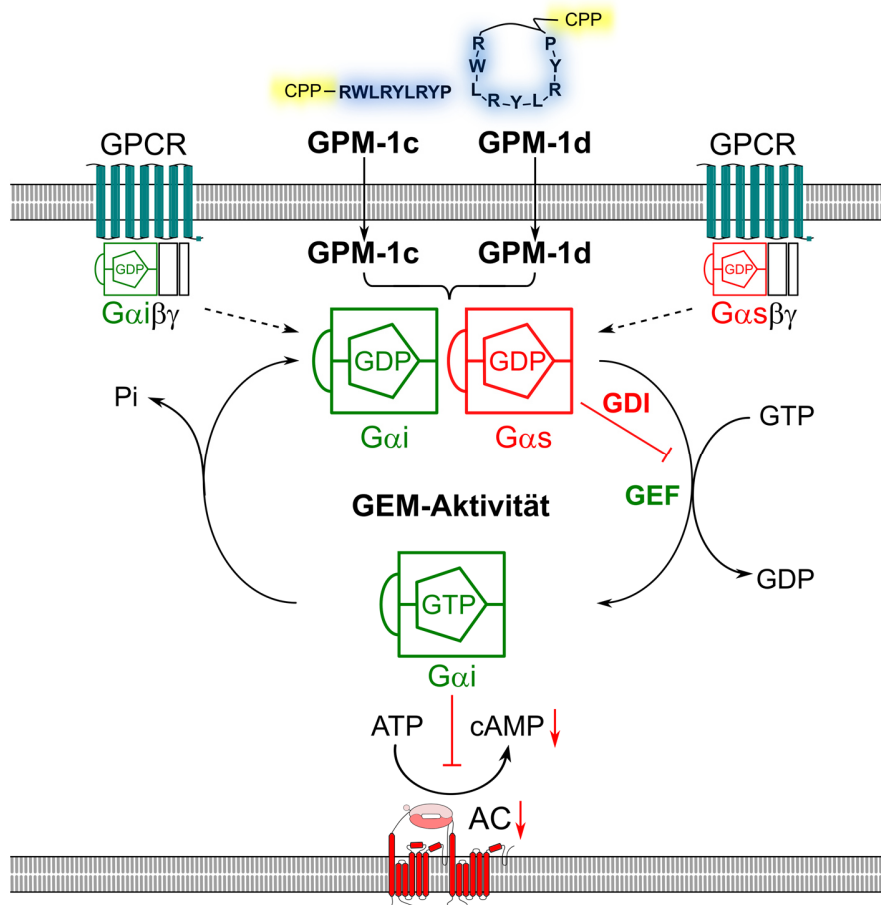


Abbildung 40: Schematische Darstellung der GEM-Aktivität von **GPM-1c** und **GPM-1d**, die in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen. Innerhalb der Zelle können beide Peptide einen GEF-Effekt auf Gai und einen GDI-Effekt auf Gas bewirken und somit insgesamt die cAMP-Produktion reduzieren. Abbildung modifiziert nach Nubbemeyer et al.<sup>[17,137]</sup>

Durch die Peptideffekte in funktionellen Studien wurde angenommen, dass die beiden optimierten Peptide **GPM-1c** und **GPM-1d** eine GEM-ähnliche Aktivität (GEF für Gai und GDI für Gas, Abbildung 40) besitzen.<sup>[127]</sup> Diese GEMs weisen eine entgegengesetzte Wirkung auf Gai und Gas auf, was durch den gegenläufigen Effekt auf die AC schließlich zu einem reduzierten zellulären cAMP-Spiegel führt (Abbildung 40). Da cAMP ein wichtiger sekundärer Botenstoff ist, der nachgeschaltete Signalwege wie den PKA-Weg beeinflussen kann, können solche Signalwege nun durch Interaktion von **GPM-1c** und **GPM-1d** mit Gai/s gezielt beeinflusst werden.<sup>[3]</sup> Die funktionellen Effekte wurden als Ergebnis der erhöhten Zellpermeabilität interpretiert, weshalb



bereits in diesem Ansatz zellpenetrierende Modulatoren der G $\alpha$ -Proteinaktivität entwickelt wurden, die durch ihre nicht-kovalente Bindung an das Zielprotein einen deutlichen Vorteil gegenüber der häufig verwendeten Exotoxine PTX und CTX haben.<sup>[17,137,280,325]</sup>

Eine weitere Erkenntnis ist, dass die Switch II/ $\alpha$ 3-Region nicht nur für niedermolekulare Verbindungen, sondern auch für Peptide gut adressierbar ist.<sup>[17,306]</sup> Die Bindung von Peptiden an diese Region kann einen funktionellen Einfluss auf die G $\alpha$ -Proteinaktivität bewirken, weshalb diese in Zukunft bei der Entwicklung von Modulatoren der G $\alpha$ -Proteinaktivität gezielt adressiert werden kann und zudem die bereits bekannten Binder/Modulatoren als Leitstrukturen weiterentwickelt werden könnten.<sup>[17]</sup> Ebenso besitzen die hier identifizierten Peptide eine ähnliche G $\alpha$ -Bindungsseite wie bekannte Hilfsproteine (z.B. GIV), weshalb diese potentiell intrazellulär die Interaktionen (PPIs) von Hilfsproteinen mit der G $\alpha$ -Untereinheit unterbrechen könnten.<sup>[17,137,148]</sup>

## 5.2 Screening einer OBTC-Peptidbibliothek gegen Gai1 und Gas

### 5.2.1 Identifikation der Gai1/s-assoziierten Sequenzen

Die Ergebnisse des OBOC-Peptidbibliothekscreening waren bereits vielversprechend und demonstrierten, dass Peptide das Potential besitzen als Modulatoren der G $\alpha$ -Proteinaktivität zu agieren. Wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt, sind lineare Peptide proteolytisch instabiler als ihre zyklischen Varianten und können auch eine geringere Zellpermeabilität besitzen.<sup>[41,81]</sup> Aus diesem Grund wurden aus der **GPM-1**-Leitstruktur zyklische Derivate für die Modulatorentwicklung abgeleitet. Die Gefahr bei diesem Ansatz ist, dass durch die strukturelle Änderung der Leitstruktur, sich die Funktion verändert oder verloren geht. Um diesen Aspekt vorzubeugen, können direkt makrozyklische Peptidbibliotheken gescreent werden, wodurch unmittelbar makrozyklische Bindesequenzen identifiziert und anschließend auf ihr Potential als G $\alpha$ -Proteinmodulatoren getestet werden können.<sup>[27,38,59,73]</sup> Die Entwicklung und Synthese von OBTC-Peptidbibliotheken ist sehr komplex und wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dehua Pei geprägt.<sup>[92,93]</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine bityklische OBTC-Peptidbibliothek (Abbildung 24, Seite 51) gegen Gai1 und Gas in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dehua Pei (Ohio State University, Columbus, Ohio, USA) gescreent. Als Peptidbibliothek wurde die OBTC-Peptidbibliothek gewählt, die bereits zur Identifikation von Cyclorasin B3 und B4, zwei Inhibitoren des monomeren G-Proteins KRas, geführt hat.<sup>[92,93,95]</sup> Da monomere G-Proteine strukturell der GTPase-Domäne der G $\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine ähneln, wurde angenommen, dass mittels dieser Peptidbibliothek auch G $\alpha$ -Binder und somit mögliche Modulatoren für die Gai/s-Proteinaktivität identifiziert werden können.<sup>[133]</sup> Die bityklische Peptidbibliothek (~100 pmol Peptid/Harzkugel (50 pmol bityklisches Peptid, 50 pmol lineares Peptid), 2,86·10<sup>6</sup> Harzkugeln/g) besaß in jedem Zyklus 3-5 randomisierte Positionen X (P-5 bis P-1 und P+1 bis P+5) und eine zentrale Position P0 [K/Orn], die für das zyklische Rückgrat zusammen mit dem Trimesinsäurebaustein (formal am N-Terminus) und der Diaminopropansäure (Dap, am C-terminalen Ende) verantwortlich war.<sup>[92,93]</sup> An jeder Harzkugel befand sich das entsprechende bityklische Peptid an der äußeren, räumlich zugänglicheren Sphäre, während das korrespondierende lineare Peptid in der inneren Sphäre als „encoding tag“ für die Sequenzierung per PED-MALDI-MS gebunden war.<sup>[92,347]</sup> Eine strukturelle Besonderheit dieser OBTC-Peptidbibliothek war es, dass diese neben zehn proteinogenen Aminosäuren (Ala, Arg, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Ser, Trp, Tyr) auch vier nicht-proteinogene L-Aminosäuren (L-4-Fluorophenylalanin (Fpa), L-Norleucin (Nle), L-Ornithin (Orn), L-Phenylglycin

(Phg)) und zehn D-Aminosäuren (D-2-Naphthylalanin (D-Nal), D-Ala, D-Asn, D-Glu, D-Leu, D-Lys, D-Phe, D-Pro, D-Thr, D-Val) enthielt.<sup>[92]</sup> Durch die bityklische Struktur wurde eine insgesamt planare Struktur erhalten, wodurch die Oberfläche des Peptids und damit die Kontaktfläche zum  $\alpha$ -Protein maximiert wurde.<sup>[27,59,92]</sup> Die hohe strukturelle Vielfalt innerhalb der randomisierten Positionen ermöglichte das Screenen eines großen strukturellen Raums und somit einer Vielzahl an Bindungsinteraktionen mit dem Zielprotein, welche nur mit dem Einsatz von proteinogenen Aminosäuren nicht möglich gewesen wäre. Neben der (bi-)zyklischen Struktur sollte der Einsatz von nicht-proteinogenen Aminosäuren und D-Aminosäuren ebenfalls zu einer erhöhten proteolytischen Stabilität der Peptide führen.<sup>[38,92]</sup>

Die bityklische Peptidbibliothek wurde zwei Screeningrunden mit biotinylierten  $\alpha$ -Proteinen unterzogen (Abbildung 41A-B). Verwendet wurden inaktives, GDP-gebundenes Gai1 und Gas sowie aktives, GMPPNP-gebundenes (nicht hydrolysierbares GTP-Analogon) Gai1 und Gas. Die Proteine wurden von Dr. Toni Kühl und Sabrina Linden (Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) zur Verfügung gestellt und in Zusammenarbeit biotinyliert.

Die Intention in diesem Screening auch aktivierte  $\alpha$ -Untereinheiten zu verwenden, lag primär an zwei Gründen: 1) Die Strukturen der  $\alpha$ -Untereinheiten unterscheiden sich in den Switch-Regionen innerhalb der beiden Aktivitätszustände.<sup>[133,134]</sup> Da die Switch-Regionen eine bedeutende Rolle für die Interaktion mit dem  $\beta\gamma$ -Dimer, den Effektoren und den Hilfsproteinen spielen (Kapitel 2.3.1.2, 2.3.1.3 und 2.3.1.4), ist die Identifikation von Bindern, die die Switch-Regionen adressieren besonders wünschenswert für die Entwicklung von potentiellen Modulatoren.<sup>[17]</sup> Zudem ermöglicht eine Aktivitätszustands-selektive Adressierung der  $\alpha$ -Untereinheiten gezielt PPIs von bestimmten Signaltransduktionspartnern zu unterbrechen.<sup>[17,337]</sup> 2) Es existieren Krankheitsbilder, in denen beispielsweise die  $\alpha$ -Untereinheit permanent aktiviert vorliegt, z.B. bei Krebs durch Mutationen des „Argininfingers“ (Kapitel 2.2.2 und 2.3.2), der eine Rolle in der GTP-Hydrolyse spielt.<sup>[14,139,169,170]</sup> Um selektiv auf diese Krankheiten reagieren zu können, ist es erforderlich auch die aktiven  $\alpha$ -Untereinheiten näher zu untersuchen und zu adressieren. In Verbindung mit dem erstgenannten Punkt sind somit auch in diesem Kontext Aktivitätszustands-selektive Verbindungen wünschenswert. Mit dem ersten Screeningansatz gegen Gai1·GDP unter Verwendung der OBOC-Bibliothek wurde die zielführende Anwendbarkeit des Verfahrens verifiziert. Durch das Screenen beider Aktivitätszustände mittels der OBTC-Peptidbibliothek können folglich mehr Kandidaten als potentielle  $\alpha$ -Proteinmodulatoren identifiziert werden, da die strukturelle Diversität auch auf der Proteinebene erhöht wurde. In nachgeschalteten Bindungsstudien ist eine Unterscheidung der Hits nach ihrer Aktivitätszustands-selektivität möglich. Dennoch besteht die Chance, dass Regionen von den identifizierten Peptiden adressiert wurden, die sich in beiden Aktivitätszuständen strukturell nicht unterscheiden.

Innerhalb der ersten Screeningrunde wurden ca.  $5,4 \cdot 10^5$  Harzkugeln mit den biotinylierten  $\alpha$ -Proteinen inkubiert und die positiven Hits über magnetische Selektion isoliert (Kapitel 2.4.1). Anschließend wurden die positiven Hits wieder gegen die entsprechenden biotinylierten  $\alpha$ -Proteine gescreent und die erneut positiven Hits mittels des SA-AP-basierten Ansatzes unter dem Mikroskop identifiziert.<sup>[92]</sup> Es wurden 35 harzgebundene Peptide für Gai1·GDP, 36 für Gai1·GMPPNP, 69 für Gas·GDP und 51 für Gas·GMPPNP isoliert, mittels PED-MALDI-MS (Kapitel 2.4.2, Abbildung 41B) auf ihre Sequenz untersucht und 12 Sequenzen für Gai1·GDP, 15 für Gai1·GMPPNP, 16 für Gas·GDP und 17 für Gas·GMPPNP per PED-MALDI-MS aufgeklärt (Anhang). Die identifizierten Hits wurden für die Ableitung von allgemeinen Trends analysiert.

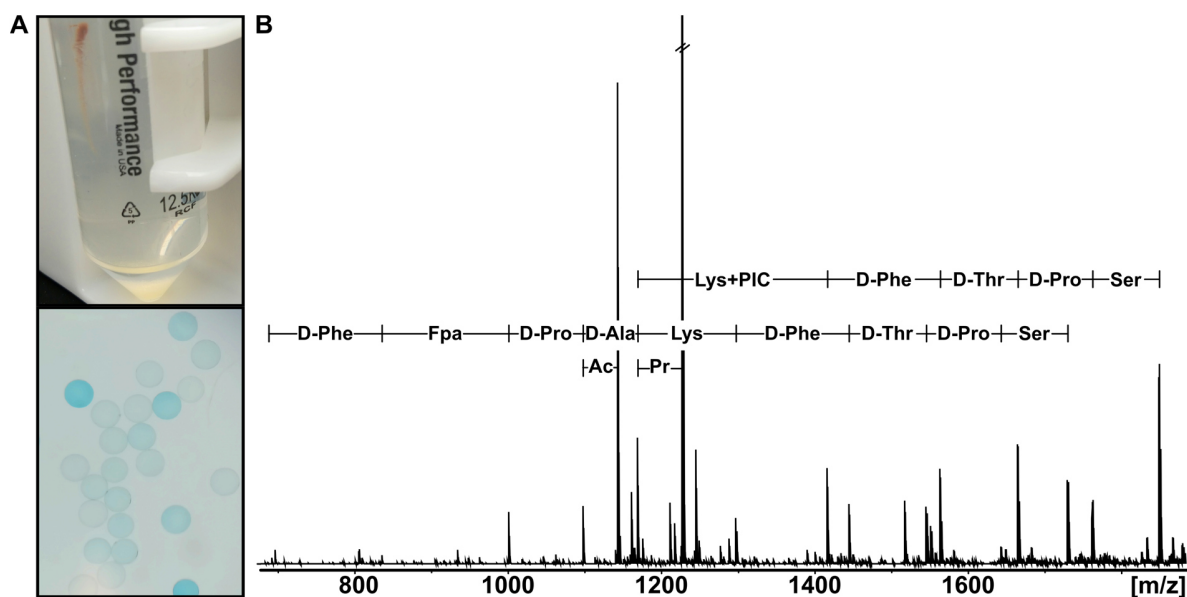


Abbildung 41: Screeningexperiment mit der OBTC-Peptidbibliothek. **A**: oben: magnetische Selektion nach dem OBTC-Screening gegen Gai1·GMPPNP, unten: Identifizierung von Gas·GMPPNP-Bindern innerhalb des SA-AP-basierten Screening-Ansatzes nach Inkubation mit BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat). **B**: Beispiel eines repräsentativen PED-MALDI-MS-Spektrums einer Hit-Sequenz, d.h. Ser-D-Pro-D-Thr-D-Phe-Lys\*-D-Ala-D-Pro-Fpa-D-Phe, \* = zentrale Aminosäure, die in Ringschluss involviert ist.

Für die Analyse der Aminosäureeigenschaften an den einzelnen Positionen und von sich wiederholenden Sequenzmotiven wurden die Positionen P-3 bis P-1 und P+1 bis P+3 näher betrachtet. Der Grund dafür war, dass Peptide mit Aminosäuren an den Positionen P-4 und P+4 nicht häufig beziehungsweise die Positionen P-5 und P+5 gar nicht in den Hits auftraten. Dies legt nahe, dass 6-8 Aminosäureeinheiten für eine hoch-affine  $\alpha$ -Bindung ausreichen, was bereits im Kontext des OBOC-Screenings gezeigt werden konnte. Im Allgemeinen wurden vorwiegend hydrophobe Aminosäuren in beiden Ringsystemen beobachtet, wobei polar-neutrale Aminosäuren ( $\zeta$ ) primär in den Positionen P-3, P-1, P+1 und P+3 auftraten. Die Aminosäuren mit saurem Charakter (Asp, D-Glu) wurden hauptsächlich in den Screeningexperimenten mit aktivem  $\alpha$ -Protein beobachtet, während basische Aminosäuren (z.B. in P-2, P+2, P+3) in allen Screeningversuchen identifiziert werden konnten. Da im Falle von Gai1 nur wenige Hits aus dem Screeningansatz erhalten wurden, war es schwierig, einen Konsens von Gai-Bindern gegenüber Gas-Bindern zu etablieren. Im Fall der Gai-bindenden Peptide schien es, dass diese einen eher hydrophoben Charakter im N-terminalen Ringsystem und einen eher polaren (neutral/basischen oder sauren) Charakter im C-terminalen Ringsystem besitzen. Die Eigenschaften der Gas-bindenden Peptide konnten nicht direkt mit den Ringsystemen korreliert werden, da sowohl hydrophobe Aminosäuren als auch basische und polare Aminosäuren in beiden Ringsystemen aufgetreten waren.

Unter Berücksichtigung der relativen Häufigkeiten und der Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren an den jeweiligen Positionen innerhalb der 12 Hits (Anhang, Tabelle 22) aus dem Gai1·GDP-Screening war es nicht möglich, eine Konsensussequenz sondern nur einen allgemeinen Trend der Aminosäureeigenschaften abzuleiten (Abbildung 42A). Aus diesem Grund wurden ähnliche Sequenzen in Clustern zusammengefasst und je ein Vertreter aus diesen Clustern ausgewählt, der so viele bevorzugte Aminosäuren pro Position wie möglich abdeckte.

Insgesamt wurden 5 Hits für die Synthese und weitere Analyse ausgewählt, die dem Gesamttrend von polaren (P-3, P+1, P+2, P+3), basischen (P-1, P+2) und/oder hydrophoben (alle Positionen) Aminosäureresten am besten entsprachen (Abbildung 42A).

**A**

**Gαi1·GDP**

	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3		
	Φ (50.0)	Φ (50.0)	Φ (41.7)	Orn (58.3)	Φ (50.0)	Φ (33.3)	ζ (41.7)		
	ζ (33.3)	ζ (25.0)	ζ (25.0)	Lys (41.7)	ζ (33.3)	[+] (33.3)	Φ (41.7)		
			[+] (25.0)			ζ (25.0)			
	Φ/ζ	Φ	Φ/[+]	Lys/Orn	Φ/ζ	Φ/[+]/ζ	ζ		

	-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
<b>24</b>			Ile	D-Leu	D-Asn	Orn*	D-Val	D-Nal	Trp		
<b>20</b>			Ser	Gly	Arg	Orn*	D-Nal	D-Lys	Tyr	D-Nal	
<b>25</b>		D-Ala	D-Thr	D-Ala	D-Leu	Orn*	D-Thr	Nle	Fpa		
<b>26</b>			D-Nal	D-Phe	D-Pro	Orn*	D-Pro	D-Lys	D-Pro	Tyr	
<b>27</b>		D-Asn	D-Phe	Ser	D-Pro	Orn*	D-Asn	Arg	Gln	Asp	

**B**

**Gαi1·GMPPNP**

	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3		
	Φ (60.0)	Φ (53.3)	Φ (60.0)	Lys (53.3)	Φ (60.0)	Φ (40.0)	Φ (40.0)		
	Ψ (46.7)	Ψ (40.0)	Ψ (53.3)	Orn (46.7)	[-] (20.0)	Ω (33.3)	ζ (26.7)		
		[+] (33.3)	ζ (20.0)			[-] (26.7)	[-] (20.0)		
		His (26.7)				ζ (26.7)	[+] (20.0)		
	Ψ	Ψ/His	Ψ	Lys/Orn	Ω/[-]	Ω/[-]	Φ/ζ/[+]		

	-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
<b>18</b>			Asp	Ile	Ile	Orn*	Tyr	D-Glu	Nle	D-Phe	
<b>22</b>			D-Val	His	Ile	Lys*	D-Glu	D-Glu	D-Glu		
<b>28</b>		D-Lys	D-Ala	D-Lys	D-Val	Lys*	Fpa	Ala	D-Thr	Tyr	
<b>33</b>			Ile	His	Orn	Lys*	D-Glu	Phg	D-Thr	D-Thr	
<b>29</b>		D-Nal	Ile	D-Phe	D-Val	Orn*	Ala	Arg	D-Phe	D-Ala	

Abbildung 42: Ableitung von Konsensussequenzen aus den OBTC-Peptidbibliotheksscreenings mit Gai1 und ausgewählte Hits. Aminosäurepräferenzen an den verschiedenen Positionen relativ zur zentralen Position P0 Lys/Orn für das Gαi1·GDP- (A) und das Gαi1·GMPPNP- (B) Screeningexperiment. Die relative Häufigkeit der Aminosäureeigenschaften ( $\geq 20\%$ ) sind nach Aasland et al.<sup>[199]</sup> wie folgt angegeben: Φ: hydrophob (Ala, D-Ala, D-Val, Ile, D-Leu, Nle, D-Phe, Phg, D-Nal, Trp, Tyr, Fpa), Ω: aromatisch (D-Phe, Phg, D-Nal, Trp, Tyr, Fpa), Ψ: groß, aliphatisch (D-Val, Ile, D-Leu, Nle), ζ: neutral/polar (D-Asn, Gln, Ser, D-Thr, Tyr, Fpa), [+]: basisch (His, D-Leu, Arg, Orn) und [-]: saurer (Asp, D-Glu). Der abgeleitete Trend ist darunter dargestellt. Die untere Tabelle zeigt die ausgewählten Hit-Sequenzen aus dem Screening-Experiment, die die jeweilige Konsensussequenz repräsentieren.

Im Gegensatz dazu konnte für die 15 Hits (Anhang, Tabelle 23) des Gαi1·GMPPNP-Screenings ein breitgefaster Konsens abgeleitet werden (Abbildung 42B). Im N-terminalen Ringsystem waren hydrophobe/aliphatische Aminosäuren in den Positionen P-3, P-2 und P-1 und His in P-2 häufiger vertreten, während im C-terminalen Ringsystem D-Glu als saure Aminosäure in P+1 bis P+3 auftrat. Weiterhin kamen im C-terminalen Ringsystem auch aromatisch-hydrophobe Aminosäuren (z.B. P+2) und Aminosäuren mit polar-neutralem Charakter (P+3) vor. Um eine möglichst umfassende Analyse des Screening-Ergebnisses zu ermöglichen, wurden wiederum 5 Sequenzen für weitere Untersuchungen ausgewählt (Abbildung 42B).

Die Analyse der 16 Hits (Anhang, Tabelle 24) aus dem Gas·GDP-Screening ergab, dass hydrophob-aliphatische Aminosäuren an allen Positionen außer P+1 vermehrt auftraten (Abbildung 43A). Außerdem wurde festgestellt, dass basische Aminosäuren an den Positionen P-2, P+2 und P+3 gehäuft vorkamen. In Position P+1 wurden bevorzugt Gln und D-Asn identifiziert, die beide eine Säureamidfunktion in der Seitenkette besitzen. Für die Auswertung des Screening-Ergebnisses wurden in diesem Fall 4 Vertreter ausgewählt (Abbildung 43A).

**A** **Gαs·GDP**

		-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3		
		Φ (87.5)	Φ (62.5)	Φ (75.0)	Lys (62.5)	ζ (43.8)	Φ (43.8)	Φ (62.5)		
		Ψ (50.0)	Ψ (50.0)	Ψ (62.5)	Orn (37.5)	[+] (25.0)	ζ (37.5)	Ψ (43.8)		
		Ω (37.5)	[+] (25.0)	D-Val (25.0)		Φ (25.0)		[+] (25.0)		
		Fpa (25.0)						D-Val (25.0)		
		D-Ala (25.0)								
		Φ	Ψ/[+]	Ψ/D-Val	Lys/Orn	ζ	Φ/ζ/[+]	Ψ/[+]		
-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
<b>19</b>		D-Ala	Nle	D-Val	Orn*	Gln	D-Lys	Nle	His	
<b>30</b>		Fpa	D-Lys	D-Val	Orn*	D-Asn	D-Thr	D-Val		
<b>21</b>	Ala	D-Ala	D-Lys	D-Glu	Lys*	Orn	Fpa	D-Val		
<b>23</b>		Fpa	Ile	D-Ala	Lys*	Gly	D-Ala	D-Lys	Ala	

**B** **Gαs·GMPPNP**

		-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3		
		Φ (70.6)	Φ (52.9)	Φ (52.9)	Orn (52.9)	Φ (64.7)	Φ (82.4)	Φ (64.7)		
		Ψ (47.1)	ζ (35.3)	ζ (47.1)	Lys (47.1)	Ψ (52.9)	Ω (47.1)	Ψ (41.2)		
		ζ (23.5)	[+] (23.5)					ζ (29.4)		
		Φ	Φ/ζ/[+]	ζ	Lys/Orn	Ψ	Ω	Φ/ζ		
-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
<b>31</b>		Tyr	D-Lys	Ser	Orn*	D-Leu	Nle	Ser		
<b>32</b>		Ala	Ala	Gln	Orn*	D-Thr	Tyr	Ala	D-Lys	
<b>17</b>		Ala	Tyr	Trp	Lys*	Nle	Trp	Ala		
<b>34</b>		Phg	Ala	Gln	Orn*	Ala	Nle	D-Phe		

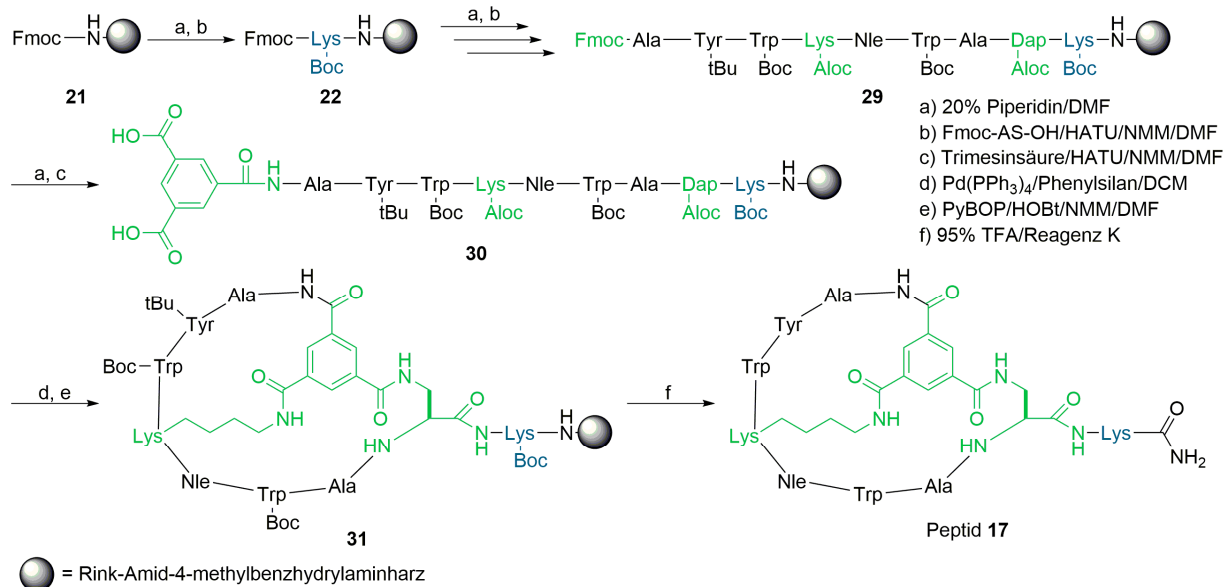
Abbildung 43: Ableitung von Konsensussequenzen aus den OBTC-Peptidbibliotheksscreenings mit Gas und ausgewählte Hits. Aminosäurepräferenzen an den verschiedenen Positionen relativ zur zentralen Position P0 Lys/Orn für das Gas·GDP- (**A**) und das Gas·GMPPNP- (**B**) Screeningexperiment. Die relative Häufigkeit der Aminosäureeigenschaften ( $\geq 20\%$ ) sind nach Aasland et al.<sup>[199]</sup> wie folgt angegeben: Φ: hydrophob (Ala, D-Ala, D-Val, Ile, D-Leu, Nle, D-Phe, Phg, D-Nal, Trp, Tyr, Fpa), Ω: aromatisch (D-Phe, Phg, D-Nal, Trp, Tyr, Fpa), Ψ: groß, aliphatisch (D-Val, Ile, D-Leu, Nle), ζ: neutral/polar (D-Asn, Gln, Ser, D-Thr, Tyr, Fpa), [+]: basisch (His, D-Leu, Arg, Orn) und [-]: saurer (Asp, D-Glu). Der abgeleitete Trend ist darunter dargestellt. Die untere Tabelle zeigt die ausgewählten Hit-Sequenzen aus dem Screening-Experiment, die die jeweilige Konsensussequenz repräsentieren.

Bei der Untersuchung der 17 Hits (Anhang, Tabelle 25) aus den Screenings mit Gas·GMPPNP wurden sowohl aliphatische als auch aromatisch-hydrophobe Aminosäuren in allen Positionen festgestellt (Abbildung 43B). Darüber hinaus wurden polare Aminosäuren wie Ser und Gln in P-2 und Ser in P+3 identifiziert, sowie die saure Aminosäure Asp in P-3 und P+1 und die basische Aminosäure D-Lys in P-2. Nach dem Vergleich der Hits wurden 4 repräsentative Sequenzen ausgewählt, die möglichst viele bevorzugte Aminosäuren pro Position abdeckten (Abbildung 43B).

Ein bemerkenswertes Ergebnis ergab sich beim Vergleich der abgeleiteten Trends mit dem aus dem OBOC-Screening abgeleiteten Konsensus ( $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv und  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -GEM-Konsensus, zusammengefasst:  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega\Phi$ , Kapitel 5.1.3). Obwohl die linearen Peptide aus dem OBOC-Screening strukturell nicht mit den bityklischen Peptiden und der Interaktion dieser mit dem Zielprotein direkt verglichen werden können, lassen sich jedoch allgemeine Übereinstimmungen feststellen, wenn die zentrale Position der OBTC-Hits mit der Position X im  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv gleichgesetzt wird. Beide Screeningexperimente mit Gai1·GDP lieferten somit insgesamt vermehrt basisch-hydrophobe Sequenzen mit polar-neutralen Aminosäuren an definierten Positionen. In den OBTC-Positionen ( $[\Phi/\zeta]-\Phi-[\Phi/[+]]$ -Lys/Orn- $[\Phi/\zeta]-[\Phi/[+]/\zeta]-[\zeta]$ ) P-3, P-1 und P+2 könnten Übereinstimmungen mit dem  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv vermutet werden, allerdings kann daraus nicht geschlossen werden, ob eine ähnliche Bindungsregion adressiert wurde. Insgesamt kann dennoch abgeleitet werden, dass für die Bindung an die  $G\alpha$ -Untereinheit über alle Screeningexperimente hinweg ein sieben Aminosäure-langes Konsensusmotiv ausreichend ist, wie es im Kontext der Proteine mit GEM-Aktivität beschrieben wurde.<sup>[213]</sup>

### 5.2.2 Synthese und Charakterisierung der Peptide

Die Synthese der bityklischen Peptide (Tabelle 20, Seite 101) aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening erfolgte nach Lian et al.<sup>[92,366]</sup> und Trinh et al.<sup>[96]</sup> Die Strategie wird exemplarisch am Beispiel der Hitsequenz **17** in Schema 5 erläutert. Es wurde eine orthogonale Schutzgruppenstrategie verwendet, in der das C-terminale Dap und das zentrale Lys/Orn mit der Aloc-Schutzgruppe geschützt wurden. Dies war notwendig, um nach Synthese der linearen Vorläufer mittels der Fmoc-basierten Schutzgruppenstrategie eine selektive Zyklisierung zwischen der Trimesinsäureeinheit am N-Terminus und den beiden Aminofunktionen des zentralen Lys und Dap zu gewährleisten.<sup>[92]</sup> Für die Kopplung von Fmoc-L-Phenylglycin wurde als Kopplungsreagenz und Base die Kombination von COMU/TMP anstelle von HATU/NMM verwendet, um die Möglichkeit der Racemisierung nach Liang et al.<sup>[367]</sup> zu senken. Für alle Peptide wurde am C-Terminus ein Lysin eingebaut, welches als Anknüpfstelle für Peptidmarkierungen dienen sollte. Im Rahmen dieser Dissertation war dies in erster Linie ein Platzhalter für spätere geplante Synthesen, um die Peptidgrundstruktur für etwaige Markierungen nicht ändern zu müssen. Um das bityklische Grundgerüst zu erhalten, wurde Trimesinsäure am N-Terminus gekoppelt und nach Aloc-Abspaltung erfolgte die Zyklisierung an der festen Phase. Anschließend wurde die Abspaltung der Peptide vom Harz zusammen mit der Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen sowie die semipräparative Reinigung per RP-HPLC und die analytische Charakterisierung der Peptide durchgeführt. Alle Peptide wurden mit einer HPLC-Reinheit von >95% erhalten (Tabelle 20, Seite 101).



Schema 5: Exemplarisches Syntheschema für die OBTC-Hits am Beispiel von Peptid **17**. Nach Synthese des linearen Vorläufers (**29**) am beladungsreduzierten Rinkamid-MBHA-Harz (**21/22**) mittels HATU/NMM, wurde Trimesinsäure mit HATU/NMM gekoppelt (**30**). Anschließend wurden die Aloc-Schutzgruppen mittels Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und Phenylsilan abgespalten und die Zyklisierung am Harz mit PyBOP/HOBt/NMM (**31**) durchgeführt. Darauf folgend wurden das Peptid vom Harz mit 95% TFA und Reagenz K abgespalten und Peptid **17** erhalten. Die verknüpfenden Einheiten Trimesinsäure, das zentrale Lysin und Dap sind in grün dargestellt, das Lysin für mögliche Modifizierungen in blau. AS = Aminosäure.

Insgesamt wurden von allen Peptiden ausschließlich geringe Mengen aufgrund der erhöhten Synthesekosten, bedingt durch die vielen nicht-proteinogenen Aminosäuren, hergestellt (ca. 0,5-3,0 mg). Die Peptide wurden an dieser Stelle unmittelbar in den Aktivitätstestungen eingesetzt, um eine Vorselektion der Peptidsequenzen vorzunehmen. Dies ermöglicht, dass zu einem späteren Zeitpunkt nur ausgewählte, vielversprechende Hits in einem größeren Maßstab synthetisiert werden müssen, und reduziert den Syntheseaufwand und die Synthesekosten enorm. Bei der Durchführung von Bindungsstudien wären zusätzlich folgende Sachverhalte zu berücksichtigen:

1. Möglichkeit: Die Peptide müssten fluoreszenzmarkiert oder biotinyliert werden. Dies ist in Lösung nicht ohne weiteres möglich, da neben dem dafür vorgesehenen Lysin auch andere Lysin- oder Ornithinreste durch die Aminofunktion reagieren können, wodurch Produktgemische entstehen und die Bildung des gewünschten Produktes minimiert wird. Daher ist in diesem Fall eine Markierung an der festen Phase zielführender, gerade wenn viele Aminofunktionen in der Sequenz enthalten sind (erschwert Unterscheidbarkeit und Trennproblem bei Markierung in Lösung). Da der N-Terminus mit bei der Bildung des zyklischen Rückgrats beteiligt ist, müsste die Markierung an einer Aminosäureseitenkette erfolgen. Dies könnte durch orthogonale Schutzgruppenstrategie an dem dafür vorgesehenen Lysin erfolgen oder durch Verwendung eines speziellen Lysinderivats bei der Synthese (z.B. Fmoc-Lys(Biotin)-OH und ggf. Linker). Diese Schritte führen auf der jetzigen Stufe zu einem hohen Syntheseaufwand und hohen Kosten.

2. Möglichkeit: Eine denkbare Alternative wäre es, in den Bindungsstudien die nicht markierten Peptide einzusetzen und entsprechend die Proteine, z.B. für SPR-Analysen, zu immobilisieren. Hierbei ist der Nachteil, dass die Peptide als Analyten in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt werden müssten, welches ebenfalls zum Bedarf größerer Mengen führt.

All diese Gründe sprechen daher für die Vorselektion von vielversprechenden Kandidaten innerhalb des ELISA-basierten, zellfreien Ansatzes, da innerhalb dieses Experiments keine Zellpenetration der Verbindungen notwendig ist. Darüber hinaus wurden die Peptide auch für den zellbasierten Aktivitätstest zur Verfügung gestellt.

Tabelle 20: Analytische Charakterisierung der ausgewählten Hits aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening.

Peptid	Peptidsequenz	Mw (Mw theor.)	HPLC C18 t <sub>R</sub> (min)	HPLC C8 t <sub>R</sub> (min)
24	Ile-D-Leu-D-Asn-Orn*-D-Val-D-Nal-Trp	1324,69 <sup>a</sup> (1323,68)	44,90 <sup>b</sup>	14,88 <sup>c</sup>
20	Ser-Gly-Arg-Orn*-D-Nal-D-Lys-Tyr-D-Nal	1487,79 <sup>a</sup> (1486,71)	36,43 <sup>b</sup>	16,30 <sup>d</sup>
25	D-Ala-D-Thr-D-Ala-D-Leu-Orn*-D-Thr-Nle-Fpa	1237,66 <sup>a</sup> (1236,63)	37,33 <sup>b</sup>	n.d.
26	D-Nal-D-Phe-D-Pro-Orn*-D-Pro-D-Lys-D-Pro-Tyr	1428,75 <sup>a</sup> (1427,70)	38,29 <sup>b</sup>	18,53 <sup>e</sup>
27	D-Asn-D-Phe-Ser-D-Pro-Orn*-D-Asn-Arg-Gln-Asp	1460,71 <sup>a</sup> (1459,66)	22,95 <sup>b</sup>	12,19 <sup>f</sup>
18	Asp-Ile-Ile-Orn*-Tyr-D-Glu-Nle-D-Phe	1395,68 <sup>a</sup> (1394,69)	38,41 <sup>b</sup>	18,32 <sup>e</sup>
22	D-Val-His-Ile-Lys*-D-Glu-D-Glu-D-Glu	1252,64 <sup>a</sup> (1251,59)	26,41 <sup>b</sup>	15,87 <sup>f</sup>
28	D-Lys-D-Ala-D-Lys-D-Val-Lys*-Fpa-Ala-D-Thr-Tyr	1442,78 <sup>a</sup> (1441,75)	28,08 <sup>b</sup>	17,84 <sup>f</sup>
33	Ile-His-Orn-Lys*-D-Glu-Phg-D-Thr-D-Thr	1344,72 <sup>a</sup> (1343,66)	26,00 <sup>b</sup>	15,30 <sup>f</sup>
29	D-Nal-Ile-D-Phe-D-Val-Orn*-Ala-Arg-D-Phe-D-Ala	1503,84 <sup>a</sup> (1502,78)	48,71 <sup>b</sup>	18,43 <sup>c</sup>
19	D-Ala-Nle-D-Val-Orn*-Gln-D-Lys-Nle-His	1291,73 <sup>a</sup> (1290,72)	32,28 <sup>b</sup>	11,92 <sup>e</sup>
30	Fpa-D-Lys-D-Val-Orn*-D-Asn-D-Thr-D-Val	1208,72 <sup>a</sup> (1207,61)	25,05 <sup>b</sup>	14,45 <sup>f</sup>
21	Ala-D-Ala-D-Lys-D-Glu-Lys*-Orn-Fpa-D-Val	1293,74 <sup>a</sup> (1292,67)	30,31 <sup>b</sup>	09,62 <sup>e</sup>
23	Fpa-Ile-D-Ala-Lys*-Gly-D-Ala-D-Lys-Ala	1192,68 <sup>a</sup> (1191,62)	30,97 <sup>b</sup>	10,61 <sup>e</sup>
31	Tyr-D-Lys-Ser-Orn*-D-Leu-Nle-Ser	1193,66 <sup>a</sup> (1192,62)	26,53 <sup>b</sup>	15,99 <sup>f</sup>
32	Ala-Ala-Gln-Orn*-D-Thr-Tyr-Ala-D-Lys	1235,64 <sup>a</sup> (1234,61)	19,32 <sup>b</sup>	07,18 <sup>f</sup>
17	Ala-Tyr-Trp-Lys*-Nle-Trp-Ala	1306,66 <sup>a</sup> (1305,63)	39,39 <sup>b</sup>	19,16 <sup>e</sup>
34	Phg-Ala-Gln-Orn*-Ala-Nle-D-Phe	1165,59 <sup>a</sup> (1164,57)	34,17 <sup>b</sup>	14,74 <sup>e</sup>

Alle Peptide wurden als Säureamide synthetisiert, \*zentrale Aminosäure. Massenpeaks detektiert als a) [M+H]<sup>+</sup> mit MALDI-MS. Für die analytische RP-HPLC wurden folgende Gradienten verwendet: b) 0-60% Eluent B in 60 min; c) 30-60% Eluent B in 30 min; d) 20-50% Eluent B in 30 min e) 20-45% Eluent B in 25 min; f) 10-35% Eluent B in 25 min. \*Alle Peptide waren >95% HPLC-rein, n.d.: nicht bestimmt.

### 5.2.3 Bioaktivitätsstudien

Für die Peptide aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreenings wurde analog zur **GPM-1**-Peptidserie (Kapitel 5.1.5) der zellfreie Ansatz mit den NG105-18 Membranpräparationen in Kooperation mit Prof. Dr. Hermann Ammer (LMU München) durchgeführt. Um zunächst die



Peptide für eine umfangreiche Charakterisierung innerhalb des Aktivitätstest zu priorisieren und vorzuselektieren, wurde ein erster Test im Triplikat für die Zustände basal, Iso, Fsk, Fsk+DADLE (Abbildung 32) für jedes Peptid durchgeführt. Aus den Ergebnissen sollten dann Peptide für die umfangreichere Testung vorgeschlagen werden. Aus zeitlichen Gründen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Ergebnisse für 14 der 18 Peptide erhalten werden. Die Ergebnisse der verbleibenden vier Peptide **17**, **24**, **32** und **34** waren aufgrund eines Messfehlers zum aktuellen Zeitpunkt nicht auswertbar, weshalb der Vortest für diese Peptide in Zukunft wiederholt werden muss. Die beobachteten Peptideeffekte wurden in drei Gruppen eingeteilt, weshalb die Peptide in entsprechender Reihenfolge in Abbildung 44 sortiert sind.

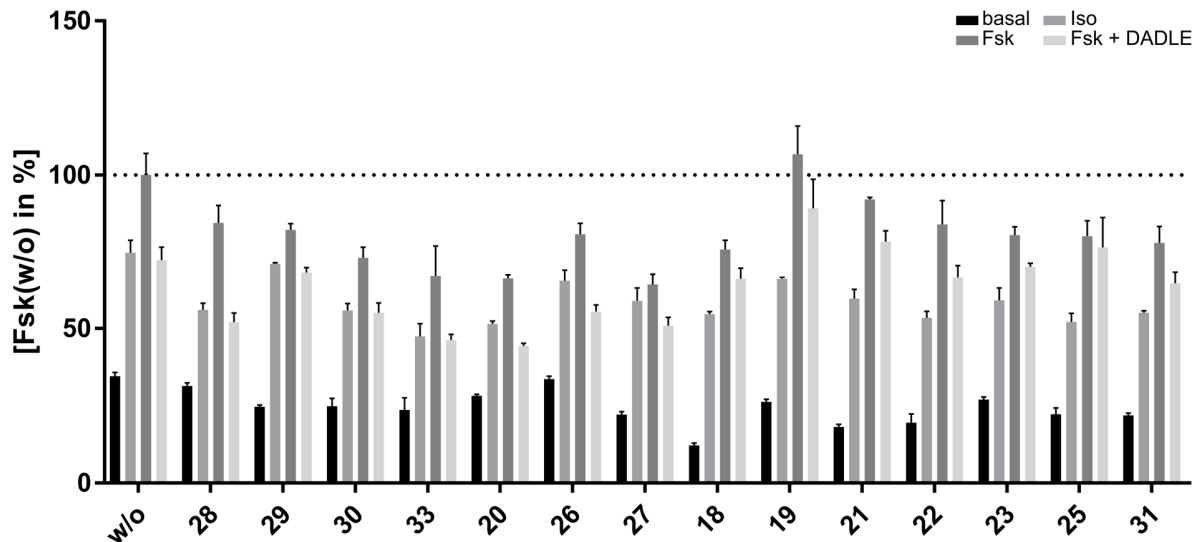


Abbildung 44: Funktionelle Untersuchungen der OBTC-Hits. **A**: Relative cAMP-Spiegel von unterschiedlich induzierten NG108-15-Membranpräparationen, die mit/ohne potentielle G-Protein-Modulatoren in Gegenwart eines Phosphodiesteraseinhibitors inkubiert wurden. Die cAMP-Spiegel wurden auf Fsk der Kontrolle (w/o) normiert. Dargestellt sind die prozentualen Werte von Membranen, die in Abwesenheit (basal) oder in Anwesenheit von Iso, Fsk und Fsk+DADLE inkubiert wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) für n=1 (im Triplikat) dar.

In die erste Gruppe wurden die Peptide **28**, **29**, **30** und **33** eingeteilt. Im Vergleich zur Kontrolle (w/o) wurden keine signifikanten Unterschiede nach Korrektur des basal-Levels beobachtet. Diese Peptide werden daher als weniger interessant eingeschätzt.

Die nächste Gruppe setzt sich aus den Peptiden **20**, **26** und **27** zusammen. Für alle Peptide wurde ein niedrigeres cAMP-Level in den Experimenten basal, Iso, Fsk und Fsk+DADLE erhalten, wobei das cAMP-Level im Experiment mit Iso das cAMP-Level im Experiment mit Fsk+DADLE überstieg. Dies könnte als ein Gs-inhibierender oder Gi-aktivierender Effekt der Peptide interpretiert werden.

Die Peptide **18**, **19**, **21**, **22**, **23**, **25** und **31** wurden einer weiteren Gruppe zugeordnet. Diese Peptide bewirkten eine Senkung der basalen sowie Iso- und Fsk-stimulierten AC-Aktivität. Dies weist möglicherweise auf einen Gs-beeinflussenden Effekt der Peptide hin, was ebenfalls für **GPM-1c** (GDI für Gs) beschrieben wurde (Kapitel 5.1.5). Eine geringere Gs-Aktivität durch Inhibition des Nukleotidaustausch (GDI) oder eine Beschleunigung der GTPase-Aktivität (GAP) wären denkbare Erklärungen dafür. Zudem könnte die im Verhältnis höhere cAMP-Produktion im Experiment mit Fsk+DADLE zusammen mit den niedrigeren cAMP-Levels in den basalen, Iso- und Fsk-Experimenten auf einen Gi-aktivierenden Effekt hinweisen. Ein ähnlicher Effekt auf die

DADLE-vermittelte Inhibition der Fsk-stimulierten AC-Aktivität wurde auch für **GPM-1c** beschrieben und als GEF-Effekt auf Gi und somit als ein Gi-aktivierender Effekt interpretiert (Kapitel 5.1.5). Eine ähnliche Schlussfolgerung, bei der Gi durch die Peptide aktiviert und gleichzeitig Gs inhibiert werden kann, wäre demnach auch hier denkbar.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind die Beobachtungen und die möglichen Interpretationen als vorläufige Ergebnisse zu sehen. Die Wiederholung der Peptidmessungen ist erforderlich, um die einzelnen Effekte auf Gi und Gs zu bestätigen, Ausreißer zu identifizieren und klarer Aussagen über die Peptideffekte treffen zu können. Bei der Wiederholung der Messungen wäre es sinnvoll, die einzelnen Gruppen zusammen zu untersuchen, um zu sehen, ob die Peptide einer Gruppe tatsächlich einen ähnlichen Effekt auf den Gi- und/oder Gs-Signalweg aufweisen. Insgesamt wurden vor allem bei den Peptiden der zwei letztgenannten Gruppen interessante Effekte vermutet, die im Folgenden näher untersucht werden könnten. So sind für die Peptide **20**, **26** und **27** aktivierende Effekte auf den Gi-Signalweg oder inhibierende Effekte auf den Gs-Signalweg vorgeschlagen worden. Für die Peptide **18**, **19**, **21**, **22**, **23**, **25** und **31** könnte eine Kombination von Gi-aktivierenden und Gs-inhibierenden Effekten, wie bereits für **GPM-1c** und **GPM-1d** beschrieben (Kapitel 5.1.5), als mögliche Interpretation angenommen werden. Eine klare Korrelation mit den Screeningexperimenten ist zu diesem Zeitpunkt erschwert, da die Peptideffekte nicht eindeutig einem Signalweg zugeordnet werden können. Dafür wären beispielsweise Experimente mit Knockout-Membranpräparationen denkbar, indem entweder der Gi-, der Gs- oder beide Signalwege abgeschaltet wären. Um zukünftig zu vermeiden, dass Peptide potentiell beide Subfamilien adressieren, wären Screeningexperimente denkbar, in denen die positiven Hits aus beispielsweise einem Screeningexperiment mit Gai1 anschließend gegen Gas gescreent werden. Somit könnten die negativen Hits aus dem zweiten Experiment als potentiell Gai-spezifisch betrachtet werden.

#### 5.2.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Identifikation von bizyklischen Peptiden durch ein OBTC-Peptidbibliotheksscreening gegenüber Gai1 und Gas jeweils im inaktiven und aktiven Zustand beschrieben. Vergleichbar mit den Resultaten des OBOC-Screenings (Kapitel 5.1.1) wurden vor allem basisch-hydrophobe Sequenzen mit polar-neutralen Aminosäuren an spezifischen Positionen identifiziert. Um die entsprechenden Screeningergebnisse analysieren zu können, wurden von jedem Screeningexperiment 4-5 Vertreter ausgewählt, die den jeweiligen Trend der Aminosäureeigenschaften der einzelnen Positionen am besten repräsentierten. Insgesamt wurden die 18 ausgewählten bizyklischen Peptide erfolgreich synthetisiert, analytisch charakterisiert und für die Aktivitätsstudien zur Verfügung gestellt. In ersten Messungen im zellfreien Testsystem wurden für nahezu alle untersuchten Peptide interessante Effekte auf den Gi-, den Gs- oder beide Signalwege gefunden. Diese Effekte müssen zukünftig durch weiterführende Testungen bestätigt und spezifiziert werden. Anschließend wäre die Synthese eines oder mehrerer vielversprechenden/r Hits denkbar, um weitere Studien durchzuführen. Zudem könnten die ausgewählten Peptide analog zu den **GPM-1**-abgeleiteten Peptiden computerbasiert 3D-modelliert werden und anschließend molekulare Dockingexperimente durchgeführt werden. Dies könnte weitere wichtige Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Peptide liefern.

### 5.3 Analyse der G $\alpha$ -Kontaktflächen für die Adressierung durch Modulatoren

Eine wichtige Erkenntnis aus der Analyse der Hits aus den OBOC-Peptidbibliotheksscreenings war, dass die Switch II/ $\alpha$ 3-Region gut zugänglich zu sein scheint (Kapitel 5.1). Der Grund für diese Annahme ist, dass diese Region von den **GPM-1**-abgeleiteten Peptiden, den literaturbekannten Peptiden aus den Hochdurchsatztechniken und Hilfsproteinen wie GEMs adressiert wird.<sup>[17,148,152,333,338]</sup> Um das hohe Potential der Switch II/ $\alpha$ 3-Region als Zielregion für die Entwicklung von Modulatoren der G $\alpha$ -Proteinaktivität hervorzuheben, wurden die G $\alpha$ -Kontaktflächen in der Einleitung der vorliegenden Dissertation und im Rahmen eines Übersichtsartikels<sup>[17]</sup> analysiert. Im Anschluss wurden die bereits literaturbekannten Modulatoren der Gai/s-Proteinaktivität in Zusammenarbeit mit Anna Pepanian (Arbeitskreis Prof. Dr. Diana Imhof) diesen Kontaktflächen zugeordnet.<sup>[17]</sup> Aus dieser Zuordnung wurde das Potential der einzelnen G $\alpha$ -Interaktionsflächen für die Entwicklung von G $\alpha$ -Proteinmodulatoren abgeleitet.

Die G $\alpha$ -G $\beta\gamma$ - (Kapitel 2.3.1.2 und 2.3.3.2) und die G $\alpha$ -Effektor-Kontaktflächen (Kapitel 2.3.1.3 und 2.3.3.3) wurden in diesem Kontext bisher wenig adressiert, welches einerseits durch eine geringere Zugänglichkeit begründet ist und andererseits durch die Tatsache, dass die Kontaktflächen teilweise mit den Kontaktflächen der Hilfsproteine überlagern und daher keine klare Differenzierung möglich ist, erklärt werden kann.<sup>[17]</sup>

Die G $\alpha$ -GPCR-Kontaktfläche (Kapitel 2.3.1.1 und 2.3.3.1) wird hingegen durch PTX, Antikörper (gegen den C-Terminus) und eine Vielzahl an kationisch-amphiphiler Substanzen angesteuert, welches ein Indiz dafür ist, dass vor allem der C- ( $\alpha$ 5) und der N-Terminus (posttranslational modifiziert) gut zugänglich zu sein scheinen.<sup>[17,280,287,290,291]</sup> Allerdings zeigten die für die G $\alpha$ -GPCR-Kontaktfläche bekannten Substanzen auch nicht-G-Protein-spezifische Aktivitäten, was sie für klinische Studien und als Leitstrukturen ungeeignet macht.<sup>[17,289,300]</sup> Insgesamt wurde diese Kontaktfläche als weniger geeignet für die Entwicklung von Modulatoren betrachtet. Grund dafür ist, dass mehrere GPCRs dieselbe G $\alpha$ -Unterfamilie rekrutieren können und demnach für die selektive Modulation eines bestimmten G $\alpha$ -Proteins innerhalb dieser Interaktionsfläche verschiedene Modulatoren erforderlich wären, um eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade effektiv zu beeinflussen. Dies bedeutet, dass möglicherweise nur wenige spezifische GPCR-vermittelte Signalwege gleichzeitig adressiert werden können. Dennoch ist die Adressierung dieser Interaktionsfläche in manchen Fällen attraktiv, um unterschiedlichen Kopplungsselektivitäten eines GPCRs an ein G $\alpha$ -Protein zu untersuchen oder eine spezielle GPCR-G $\alpha$ -Interaktion selektiv zu beeinflussen.<sup>[17]</sup>

Aus dieser umfassenden Analyse ergab sich, dass die G $\alpha$ -Hilfsprotein-Kontaktfläche das aktuell größte Potential für die Entwicklung von Modulatoren für die Gai/s-Proteinaktivität besitzt.<sup>[17]</sup> Dies liegt einerseits darin begründet, dass die Hilfsproteine selber in der Lage sind an die G $\alpha$ -Untereinheit zu binden und dessen Eigenschaften zu modulieren, weshalb diese als Leitstrukturen (im Speziellen deren Motive) verwendet werden können. Andererseits lieferten neben gerichteten Ansätzen, die direkt auf diese Schnittstelle abzielten, auch nicht gerichtete Hochdurchsatztechniken (siehe auch Kapitel 5.1) Verbindungen, die diese Kontaktfläche adressieren konnten.<sup>[17,152,333]</sup> Für diese Verbindungen wurden teilweise Modulareigenschaften beschrieben.<sup>[152,262,263,306,331,333]</sup> Zusammenfassend hat die Analyse dieser Kontaktfläche gezeigt, dass insbesondere die Switch II/ $\alpha$ 3-Region gut exponiert und „druggable“ ist, was bereits von DiGiacomo et al.<sup>[306]</sup> im Kontext von niedermolekularen Verbindungen beschrieben wurde, aber

auch auf die Peptidebene ausgedehnt werden kann, was durch die vorliegende Arbeit untermauert werden kann.<sup>[17]</sup> Die Switch II/ $\alpha$ 3-Region könnte daher zukünftig experimentell auf der Basis von Proteinmotiven oder bereits identifizierten Bindern/Modulatoren oder theoretisch durch gerichtete Docking-Experimente direkt adressiert werden.<sup>[17]</sup> Darüber hinaus zeigen die bekannten peptidischen Modulatoren der Switch II/ $\alpha$ 3-Region, dass Aktivitätszustand-selektive oder Subfamilien-selektive Modulatoren entwickelt werden könnten, weil sich die Konformation der Switch II/ $\alpha$ 3-Region entsprechend unterscheidet.<sup>[17,133,134]</sup> Da die räumliche Anordnung der Switch-Regionen entscheidend für den Aktivitätszustand der  $\alpha$ -Untereinheit ist und daher deren Signaltransduktion signifikant beeinflusst, sind diese Bereiche auch dahingehend ein attraktiver und plausibler Ansatzpunkt.<sup>[17]</sup>

Eine weitere Möglichkeit die  $\alpha$ -Hilfsprotein-Interaktionsfläche zu adressieren ist die Beeinflussung der GTPase-Aktivität. Bei deren Inhibition resultieren permanent aktivierte  $\alpha$ -Untereinheiten, wie es in einigen Krebserkrankungen (Kapitel 2.3.2) auftritt oder von bakteriellen Exotoxinen induziert werden kann (Kapitel 2.3.3.4), wohingegen deren Stimulation, z.B. durch GAPs (Kapitel 2.3.1.4), zu einer beschleunigten Terminierung der Signalweiterleitung führt.<sup>[17]</sup>

Die theoretische Analyse demonstrierte zusammen mit den experimentellen Ergebnissen das hohe Potential der Switch II/ $\alpha$ 3-Region für die zukünftige Modulatorenentwicklung und zeitgleich das immense Potential von Peptiden, die über größere Kontaktflächen im Vergleich zu niedermolekularen Verbindungen mit dem Zielprotein interagieren und somit eine höhere Selektivität aufweisen können.<sup>[17,27,31]</sup>

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Heterotrimere G-Proteine sind an einer Vielzahl physiologischer Signalweiterleitungsprozesse beteiligt und können in dieser Funktion die Entstehung und Progression von Krankheiten wie Krebs beeinflussen.<sup>[14,17,169,170]</sup> Obwohl bereits in über 30% der zugelassenen Arzneimitteln GPCRs und darüber die nachgeschalteten Signalweiterleitungswege adressiert werden, ist es in manchen Fällen vorteilhaft, G-Proteine als Alternative zu GPCRs direkt anzusteuern.<sup>[14–17]</sup> Die  $G\alpha$ -Untereinheit ist in diesem Kontext eine bedeutende pharmakologische Zielstruktur, da sie als molekularer Schalter in der Signalweiterleitung agiert und diverse Interaktionsflächen für Signaltransduktionspartner besitzt.<sup>[17,21,23]</sup> Dennoch ist die Entwicklung von chemischen Werkzeugen für die  $G\alpha$ -Untereinheit aufgrund der intrazellulären Lokalisation anspruchsvoll, weshalb diese häufig als „undruggable“ referiert wird.<sup>[17,20,334]</sup> Neben der Zellpermeabilität ist die Spezifität eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von spezifischen  $G\alpha$ -Proteinmodulatoren, da die  $G\alpha$ -Subfamilien eine hohe strukturelle Homologie aufweisen.<sup>[17,260,334]</sup> Bisher ist es nur für die  $G\alpha_q$ -Subfamilie gelungen zwei natürliche Inhibitoren, FR900359 (FR) und YM-254890 (YM), zu identifizieren.<sup>[264,271,276–278]</sup> Das Potential solcher Modulatoren zeigt sich daran, dass diese für pharmakologische Studien, z.B. im Kontext von Aderhautkrebs, eingesetzt werden, aber auch für die Erforschung der Signalweiterleitungswege im Allgemeinen verwendet werden können.<sup>[264,277,278]</sup>

In Ermangelung an spezifischen Modulatoren für die  $G\alpha_i/s$ -Untereinheit war es das Ziel der vorliegenden Dissertation, Peptide über das Streptavidin-basierte Screening zweier kombinatorischer Peptidbibliotheken gegen  $G\alpha_i1$  und  $G\alpha_s$  zu identifizieren, analytisch zu charakterisieren und deren funktionelle Aktivität gegenüber  $G\alpha_i/s$  zu untersuchen. Die erfolgreiche Identifikation von Inhibitoren für das monomere G-Protein KRas durch das Streptavidin-basierte Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek demonstrierte, dass ein solcher Ansatz ein großes Potential für die Adressierung der  $G\alpha$ -Untereinheit aufgrund der Strukturhomologie von KRas und der GTPase-Domäne der  $G\alpha$ -Untereinheit hat.<sup>[93,95,96]</sup>

Im Speziellen wurden innerhalb des OBOC-Peptidbibliothekansatzes 13 Hits (Peptid **1-13**) identifiziert. Mittels MST-basierten Bindungsstudien wurden vier dieser Hits, genauer **1 (GPM-1)**, **2**, **7** und **10**, als hoch-affine  $G\alpha_i1$ ·GDP-Binder festgestellt, wobei die Peptide **1** und **7** auch eine, gleichwohl geringere, Bindungsaffinität zu  $G\alpha_s$ ·GDP aufwiesen. Peptid **1 (GPM-1)** besaß nicht nur die höchste Bindungsaffinität zu  $G\alpha_i1$ ·GDP, sondern zeigte auch die sequentiell höchste Übereinstimmung mit bereits literaturbekannten,  $G\alpha_i/s$ -bindenden Peptiden aus Hochdurchsatz-techniken. Die hohe Übereinstimmung zum aufgestellten  $\Phi\zeta W\Phi[+/-]\Omega\Phi$ -Motiv legte nahe, dass Peptid **1 (GPM-1)** - wie bereits bekannte Peptide - an die Switch II/ $\alpha 3$ -Region von  $G\alpha_i1$  binden kann und dass dieses Motiv optimal für die  $G\alpha_i1$ -Bindung zu sein scheint.<sup>[17,137,152,153,333,338]</sup> Diese Vermutung wurde mittels eines Konkurrenzexperimentes bekräftigt, welches zeigte, dass Peptid **1 (GPM-1)** das bekannte KB-752 von der  $G\alpha_i1$ -Untereinheit verdrängen konnte.<sup>[137]</sup>

Neben der sequentiellen Ähnlichkeit zu bereits identifizierten peptidischen  $G\alpha_i/s$ -Bindern wurde auch eine hohe Übereinstimmung (postuliertes  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Motiv) zu den GEM-Motiven von Proteinen mit GEM-Aktivität festgestellt.<sup>[127,137,148,156,213]</sup> Dies war ein besonders entscheidendes Ergebnis, da Hilfsproteine mit einer GEM-Aktivität an die  $G\alpha$ -Untereinheit binden und dessen Funktion beeinflussen können.<sup>[148,156]</sup> Dies wurde auf Peptidebene bisher nur für KB-752 und GSP beschrieben.<sup>[331,333]</sup> Da für GEMs die  $\Omega$ -Position aus dem  $\Phi\zeta\Phi X[+/-]\Omega L$ -Motiv als entscheidend für

die Bindung und die GEM-Aktivität beschrieben wurde, wurde eine Mutante des Peptids **1** (**GPM-1**), **GPM-1 Y5A**, synthetisiert.<sup>[148,152,331,388]</sup> Die Mutante zeigte in Bindungsstudien eine halb so hohe Bindungsaffinität zu Gai1 im Vergleich zu Peptid **1** und keine Bindung zu Gas, weshalb vermutet wurde, dass Peptid **1** möglicherweise ähnlich wie GEMs agieren könnte.<sup>[137,148,152,331,388]</sup> Auf dieser Grundlage wurde Peptid **1** als Leitstruktur ausgewählt und im Folgenden als **GPM-1** („G-Proteinmodulator-1“) referiert. Anschließend wurde die Leitstruktur mit der Intention, die proteolytische Stabilität und die Zellpermeabilität zu erhöhen, optimiert. Hierfür wurden makrozyklische Varianten (**GPM-1b**, **GPM-1d**, **GPM-1e**) sowie CPP-Konstrukte (**GPM-1c-e**) abgeleitet, synthetisiert und analytisch charakterisiert. Bis auf **GPM-1e** konnten alle Peptide in ausreichender Menge für die weiteren Studien synthetisiert werden. Mittels MST- und SPR-basierter Bindungsstudien konnte für **GPM-1b** und **GPM-1c** eine Bindung an Gai1/s nachgewiesen werden. Für **GPM-1d** konnte keine Bindungsaffinität bestimmt werden, was möglicherweise durch eine gehinderte Zugänglichkeit des immobilisierten Peptides beim SPR und der ionischen Wechselwirkung mit der Glaswand der Kapillaren beim MST begründet werden kann.<sup>[389]</sup> Die CPP-Sequenz allein (Peptid **15**) zeigte auch eine Bindungsaffinität gegenüber Gai1/s, allerdings war diese deutlich geringer als die von **GPM-1** und davon abgeleiteter Derivate.<sup>[137]</sup>

Die Funktion der Peptide wurde in einem zellfreien und einem zellbasierten Ansatz analysiert. Während die Peptide **2**, **7** und **10** keine Aktivität zeigten, konnten funktionelle Einflüsse für **GPM-1** und dessen Derivate beobachtet werden. Die Effekte von **GPM-1** wurden als GDI-Aktivität gegenüber Gas interpretiert, welches bereits für das sequentiell ähnliche KB-752 in einem zellfreien System beschrieben und in einem Kontrollexperiment bestätigt wurde.<sup>[331]</sup> Dieser Gas-Effekt war für **GPM-1** im Gegensatz zu KB-752 auch im zellbasierten Experiment sichtbar, was möglicherweise durch eine bessere Zellpermeabilität von **GPM-1** begründet werden könnte. **GPM-1 Y5A** zeigte nicht nur eine geringere Affinität für Gai und assoziierte nicht mit Gas, sondern übte auch keine funktionellen Effekte auf Gai/s aus. Ein Aktivitätsverlust wurde bei entsprechender Mutation bereits bei GEMs und KB-752 beschrieben, was nahelegt, dass **GPM-1** einen ähnlichen Effekt besitzt.<sup>[148,152,331,388]</sup> Für das zyklische **GPM-1b** wurde möglicherweise durch die erhöhte Rigidität kein Effekt in beiden Ansätzen beobachtet. Im Vergleich zu **GPM-1** wurde für **GPM-1c** und **GPM-1d** ein stärkerer Effekt auf die Iso-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität in beiden Ansätzen festgestellt, weshalb eine erhöhte GDI-Aktivität gegenüber Gas angenommen wurde. Peptid **15** (CPP) wurde in diesem Zusammenhang als inaktiv deklariert, da der im zellfreien Ansatz auftretende, vermutlich unspezifische Effekt nicht im zellbasierten Experiment reproduziert werden konnte. Im Kontext des Gi-Signalwegs wurden keine Effekte für **GPM-1**, **GPM-1b**, **GPM-1 Y5A**, KB-752 und Peptid **15** beobachtet, wohingegen für **GPM-1c** und **GPM-1d** eine GEF-Aktivität gegenüber Gai angenommen wurde. Zusammenfassend wurde abgeleitet, dass **GPM-1c** und stärker **GPM-1d** wahrscheinlich eine bifunktionale GEM-ähnliche Aktivität besitzen, wie sie bereits für KB-752, GSP und GEM-Proteine beschrieben wurde.<sup>[126,127,213,331,333]</sup> Der verstärkte Effekt gegenüber **GPM-1** wurde vermutlich durch die Konjugation mit der CPP-Sequenz erreicht, die wahrscheinlich die Zellpermeabilität der Peptide entscheidend verbesserte. Somit war der Ansatz der Leitstrukturoptimierung erfolgreich, da sowohl die Zellpermeabilität als auch für das zyklische **GPM-1d** die Stabilität verbessert werden konnten.<sup>[137]</sup>

Die computerbasierten Studien lieferten wichtige Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Peptide mit Gai1/s und untermauerten die experimentell beobachteten Effekte. Es wurde mit Hilfe von Dockingexperimenten bestätigt, dass **GPM-1** und die abgeleiteten Derivate an die Switch

II/ $\alpha$ 3-Region von Gai1 und Gas binden. Dabei wurde für **GPM-1c** die höchste und **GPM-1d** die zweithöchste Bindungsaffinität für Gai1 und Gas ermittelt, da wahrscheinlich die CPP-Einheit die Bindungsaffinität durch zusätzliche Wechselwirkungen mit der  $G\alpha$ -Untereinheit verstärkte. Zusammen mit den funktionellen Studien kann daher davon ausgegangen werden, dass **GPM-1d** an Gai/s binden kann. Für **GPM-1** wurde eine geringere computerbasierte Bindungsaffinität erhalten, was den experimentellen Daten aus den SPR-basierten Bindungsstudien von **GPM-1** und **GPM-1c** entspricht. Die Analyse von **GPM-1 Y5A** demonstrierte, dass das Tyr5 in **GPM-1** wichtige Interaktionen mit der Switch II-Region eingeht und eine Mutation dieser Position zu einer deutlich schwächeren Gai1/s-Bindung führt, ein Effekt, der auch bereits für GEMs beschrieben wurde.<sup>[148,331]</sup> Für **GPM-1b** und **15** konnte gezeigt werden, dass diese Peptide innerhalb der Simulation des gedockten Ligand-Gai1-Komplexes dissoziierten, was die funktionelle Inaktivität der Peptide bekräftigt. Zudem konnte durch die ermittelte Bindungsaffinität von GDP zu Gai/s in Anwesenheit der Peptide die Interpretation der potentiellen GEF-Aktivität von **GPM-1c** und **GPM-1d** gegenüber Gai1 und die GDI-ähnliche Wirkung von **GPM-1**, **GPM-1c** und **GPM-1d** untermauert werden und somit die GEM-ähnliche Aktivität für **GPM-1c** und **GPM-1d** bekräftigen.<sup>[137]</sup>

**GPM-1c** und **GPM-1d** sind somit zwei zellpenetrierende Gai1/s-Modulatoren, die zukünftig als chemische Werkzeuge in der pharmakologischen Forschung und für die Entwicklung weiterer Verbindungen oder potentieller Arzneimittelkandidaten eingesetzt werden können und möglicherweise einen Beitrag dazu liefern, die „Druggability“ der Gai/s-Subfamilie zu ermöglichen.<sup>[18–20,137]</sup> Der Vorteil der beiden Peptide liegt darin, dass diese im Gegensatz zu CTX und PTX nicht-kovalent an das Zielprotein binden und deren Aktivität beeinflussen können.<sup>[17,280,325]</sup> Im Vergleich zu den literaturbekannten Verbindungen wurden die Peptide im zellulären Kontext auf ihre Funktion untersucht und zeigten einen GEM-ähnlichen Effekt.<sup>[331,333]</sup> In ihrer potentiellen GEM-ähnlichen Funktion könnten **GPM-1c** und **GPM-1d** den cAMP-Spiegel reduzieren und die daraus resultierende zelluläre Antwort beeinflussen.<sup>[126,127,331]</sup> Zudem könnten **GPM-1c** und **GPM-1d** pharmakologisch bedeutsam sein, da sie die Gai-GIV-Interaktionsfläche besetzen und somit potentiell die (GIV-vermittelte) Gai-Aktivität beeinflussen können.<sup>[148]</sup> Da GIV u.a. eine Rolle bei der Regulation der Zellmotilität, der Mitose, des Zellüberlebens und des intrazellulären Transports spielt, ist die Störung der Gai-GIV-Kontaktfläche eine attraktive Möglichkeit für die Entwicklung therapeutischer Ansätze gegen verschiedene Krankheiten, die durch  $G\alpha$ - oder GIV-Fehlfunktionen verursacht werden.<sup>[148,213,306]</sup> Darüber hinaus könnten die Peptide die G-Proteinaktivität GPCR-unabhängig beeinflussen, was Einblicke in die G-Proteinvermittelte Signaltransduktion und damit assoziierte Krankheiten erlaubt.<sup>[14,213]</sup> Darüber kann die Notwendigkeit umgangen werden, einzelne GPCRs bei Krankheiten, die von mehreren Rezeptoren gesteuert werden, zu adressieren.<sup>[14,137,213,306]</sup>

Um das hohe Potential der Switch II/ $\alpha$ 3-Region als Zielregion für die Entwicklung von Modulatoren der  $G\alpha$ -Proteinaktivität hervorzuheben, wurden die  $G\alpha$ -Kontaktflächen und die bekannten, daran bindenden Substanzen analysiert. Daraus ergab sich, dass die  $G\alpha$ -Hilfsprotein-Kontaktfläche und insbesondere die Switch II/ $\alpha$ 3-Region gut exponiert und als „druggable“ einzuschätzen ist und daher das aktuell größte Potential für die Entwicklung von Modulatoren für die Gai/s-Proteinaktivität besitzt.<sup>[17,306]</sup> Zusammenfassend hat die Analyse in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass diese Region nicht nur von niedermolekularen Verbindungen, wie von DiGiacomo et al.<sup>[306]</sup> beschrieben, sondern auch von Peptiden adressiert werden kann.<sup>[17]</sup> Die Switch II/ $\alpha$ 3-Region könnte daher zukünftig gezielt experimentell oder computerbasiert für die Entwicklung von

Aktivitätszustand-selektiven oder Subfamilien-selektiven Modulatoren adressiert werden.<sup>[17]</sup> Zudem zeigten die Studien das immense Potential von Peptiden generell, da sie über größere Kontaktflächen im Vergleich zu niedermolekularen Verbindungen mit dem Zielprotein verfügen und somit eine höhere Selektivität aufweisen können.<sup>[17,27,31]</sup>

Dieses Potential und der mögliche Einsatz makrozyklischer Peptide als Modulatoren der G $\alpha$ -Proteinaktivität wurde vor allem im zweiten Teil dieser Arbeit thematisiert und weiter analysiert. Es wurde eine kombinatorische OBTC-Peptidbibliothek<sup>[92]</sup> gegen G $\alpha$ i/s für die Identifizierung von bizyklischen Peptiden als potentielle Modulatoren gescreent. In diesem Ansatz wurde zusätzlich untersucht, ob Determinanten für die Adressierung unterschiedlicher Aktivitätszustände abgeleitet werden können. Ein Vergleich der im Rahmen der Arbeit ermittelten Peptidsequenzen ergab in erster Näherung einen basisch-hydrophoben Trend, wobei saure Aminosäuren häufiger in den Screeningansätzen mit aktiven G $\alpha$ i/s als bei den Experimenten mit inaktiven G $\alpha$ i/s auftraten. Aus den vier durchgeführten Screeningansätzen wurden jeweils 4-5 Vertreter für die Synthese ausgewählt. Die Synthese der bizyklischen Peptide nach Lian et al.<sup>[92]</sup> konnte erfolgreich in den Laboratorien von Prof. Dr. Diana Imhof etabliert werden. Es wurden alle 18 bizyklischen Peptide synthetisiert, analytisch charakterisiert und ausreichende Mengen für die funktionellen Studien im zellfreien und zellbasierten System bereitgestellt. Diese Studien wurden begonnen und müssen zukünftig darüber Auskunft geben, ob eines oder mehrere der identifizierten Peptide eine potentielle Modulation der G $\alpha$ -Aktivität zeigen und weiter analysiert sowie weiterentwickelt werden sollten. In Vortestungen im zellfreien Ansatz konnten bereits für 10 Peptide interessante Effekte auf den G $\alpha$ i-, den G $\alpha$ s- oder auf beide Signalwege ermittelt werden, die zukünftig durch intensivere Aktivitätstestungen näher untersucht und bestätigt werden müssen. Nach dieser Vorselektion der Peptide können dann Synthesen im höheren Maßstab erfolgen und Bindungs-, Stabilitäts- und Toxizitätsstudien durchgeführt werden. Außerdem wären computerbasierte Analysen ratsam, um Einblicke in die zugrundeliegenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten.

Die vorliegende Dissertation liefert substanzielle Beiträge für die Entwicklung von peptidischen Modulatoren der G $\alpha$ i/s-Proteinaktivität und Einblicke in deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Die Analyse der G $\alpha$ -Kontaktflächen bildet außerdem eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von Modulatoren für die G $\alpha$ -Subfamilien in deren verschiedenen Aktivitätszuständen. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen kann die **GPM-1**-Leitstruktur sowie **GPM-1c** und **GPM-1d** für die biomedizinische Anwendung und die pharmakologische Forschung weiterentwickelt werden. Vor allem **GPM-1c** und **GPM-1d** könnten als chemische Werkzeuge in der pharmakologischen Forschung eingesetzt werden und Einblicke in die G-protein-vermittelte Signaltransduktion und damit assoziierte Krankheitsbilder liefern. Mit der vorliegenden Dissertation konnte somit das Potential von Peptiden, intrazelluläre PPIs zu adressieren, bestätigt und zudem gezeigt werden, dass CPP-Konstrukte helfen können, zuvor als „undruggable“ beschriebene Zielstrukturen schließlich „druggable“ zu machen.<sup>[18-20,137]</sup>



## Literaturverzeichnis

- [1] V. Katritch, V. Cherezov, R. C. Stevens, Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, 53, 531.
- [2] D. Hilger, M. Masureel, B. K. Kobilka, Structure and dynamics of GPCR signaling complexes, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, 25, 4.
- [3] V. Syrovatkina, K. O. Alegre, R. Dey, X.-Y. Huang, Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins, *J. Mol. Biol.* **2016**, 428, 3850.
- [4] A. S. Hauser, M. M. Attwood, M. Rask-Andersen, H. B. Schiöth, D. E. Gloriam, Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, 16, 829.
- [5] K. Sriram, P. A. Insel, G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs?, *Mol. Pharmacol.* **2018**, 93, 251.
- [6] P. A. Insel, K. Sriram, M. W. Gorr, S. Z. Wiley, A. Michkov, C. Salmerón, A. M. Chinn, GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets, *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, 40, 378.
- [7] R. Bar-Shavit, M. Maoz, A. Kancharla, J. K. Nag, D. Agranovich, S. Grisaru-Granovsky, B. Uziely, G Protein-Coupled Receptors in Cancer, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 1320.
- [8] R. T. Dorsam, J. S. Gutkind, G-protein-coupled receptors and cancer, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 79.
- [9] M. Zalewska, M. Siara, W. Sajewicz, G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy, *Acta Pol. Pharm.* **2014**, 71, 229.
- [10] D. A. Deshpande, R. B. Penn, Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma, *Cell. Signal.* **2006**, 18, 2105.
- [11] T. Schöneberg, I. Liebscher, Mutations in G Protein-Coupled Receptors: Mechanisms, Pathophysiology and Potential Therapeutic Approaches, *Pharmacol. Rev.* **2021**, 73, 89.
- [12] M. E. Kimple, J. C. Neuman, A. K. Linnemann, P. J. Casey, Inhibitory G proteins and their receptors: emerging therapeutic targets for obesity and diabetes, *Exp. Mol. Med.* **2014**, 46, e102.
- [13] R. Lappano, M. Maggiolini, G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 47.
- [14] J. Li, Y. Ge, J.-X. Huang, K. Strømgaard, X. Zhang, X.-F. Xiong, Heterotrimeric G Proteins as Therapeutic Targets in Drug Discovery, *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 5013.
- [15] A. P. Campbell, A. V. Smrcka, Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, 17, 789.
- [16] A. V. Smrcka, Molecular targeting of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  subunits: a potential approach for cancer therapeutics, *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, 34, 290.
- [17] B. Nubbemeyer, A. Pepanian, A. A. Paul George, D. Imhof, Strategies towards targeting Gai/s proteins: Scanning of protein-protein interaction sites to overcome inaccessibility, *ChemMedChem* **2021**, 10.1002/cmdc.202100039.

- [18] A. L. Hopkins, C. R. Groom, The druggable genome, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727.
- [19] M. Rask-Andersen, S. Masuram, H. B. Schiöth, The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 9.
- [20] C. V. Dang, E. P. Reddy, K. M. Shokat, L. Soucek, Drugging the 'undruggable' cancer targets, *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 502.
- [21] F. A. Baltoumas, M. C. Theodoropoulou, S. J. Hamodrakas, Interactions of the  $\alpha$ -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials, *J. Struct. Biol.* **2013**, *182*, 209.
- [22] I. S. Moreira, Structural features of the G-protein/GPCR interactions, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 16.
- [23] W. M. Oldham, H. E. Hamm, Structural basis of function in heterotrimeric G proteins, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 117.
- [24] S. R. Sprang, Z. Chen, X. Du, Structural Basis of Effector Regulation and Signal Termination in Heterotrimeric G $\alpha$  Proteins, *Adv. Protein Chem.* **2007**, *74*, 1.
- [25] W. M. Oldham, H. E. Hamm, Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60.
- [26] A. C.-L. Lee, J. L. Harris, K. K. Khanna, J.-H. Hong, A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2383.
- [27] P. G. Dougherty, Z. Qian, D. Pei, Macrocycles as protein-protein interaction inhibitors, *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1109.
- [28] M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1102.
- [29] G. Waksman, Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms, *Cell* **1993**, *72*, 779.
- [30] P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, N. P. Pavletich, Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain, *Science* **1996**, *274*, 948.
- [31] A. D. Cunningham, N. Qvit, D. Mochly-Rosen, Peptides and peptidomimetics as regulators of protein-protein interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 59.
- [32] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, Multifaceted roles of disulfide bonds. peptides as therapeutics, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 901.
- [33] K. Fosgerau, T. Hoffmann, Peptide therapeutics: Current status and future directions, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 122.
- [34] J. L. Lau, M. K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2700.
- [35] J. Rafferty, H. Nagaraj, A. P. McCloskey, R. Huwaitat, S. Porter, A. Albadr, G. Lavery, Peptide Therapeutics and the Pharmaceutical Industry: Barriers Encountered Translating from the Laboratory to Patients, *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 4231.

- [36] B. Leader, Q. J. Baca, D. E. Golan, Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 21.
- [37] M. Muttenthaler, G. F. King, D. J. Adams, P. F. Alewood, Trends in peptide drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, 10.1038/s41573-020-00135-8.
- [38] A. Henninot, J. C. Collins, J. M. Nuss, The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future?, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1382.
- [39] D. Goodwin, P. Simerska, I. Toth, Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4451.
- [40] A. Grauer, B. König, Peptidomimetics – A Versatile Route to Biologically Active Compounds, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **2009**, *30*, 5099.
- [41] L. Di, Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties, *AAPS J.* **2015**, *17*, 134.
- [42] L. Diao, B. Meibohm, Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides, *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, *52*, 855.
- [43] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3.
- [44] R. B. Merrifield, Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799.
- [45] R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [46] R. B. Merrifield, J. M. Stewart, Automated peptide synthesis, *Nature* **1965**, *207*, 522.
- [47] R. B. Merrifield, Solid phase synthesis, *Science* **1986**, *232*, 341.
- [48] A. Isidro-Ilobet, M. Alvarez, F. Albericio, Amino acid-protecting groups, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455.
- [49] I. Remy, S. W. Michnick, Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5394.
- [50] S. W. Michnick, Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 610.
- [51] S. S. Sidhu, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, Exploring Protein-Protein Interactions with Phage Display, *Chembiochem* **2003**, *4*, 14.
- [52] G. P. Smith, V. A. Petrenko, Phage Display, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391.
- [53] R. W. Roberts, J. W. Szostak, RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 12297.
- [54] T. T. Takahashi, R. J. Austin, R. W. Roberts, mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 159.
- [55] J. Hanes, A. Plückthun, In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4937.

- [56] C. Zahnd, P. Amstutz, A. Plückthun, Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 269.
- [57] R. Odegrip, D. Coomber, B. Eldridge, R. Hederer, P. A. Kuhlman, C. Ullman, K. FitzGerald, D. McGregor, CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2806.
- [58] A. R. Kunys, W. Lian, D. Pei, Specificity profiling of protein-binding domains using one-bead-one-compound Peptide libraries, *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2012**, *4*, 331.
- [59] C. A. Rhodes, D. Pei, Bicyclic Peptides as Next-Generation Therapeutics, *Chemistry* **2017**, *23*, 12690.
- [60] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [61] A. Klimpel, T. Lützenburg, I. Neundorff, Recent advances of anti-cancer therapies including the use of cell-penetrating peptides, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *47*, 8.
- [62] E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas, P. A. Wender, Fifteen years of cell-penetrating, guanidinium-rich molecular transporters: basic science, research tools, and clinical applications, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2944.
- [63] H. Derakhshankhah, S. Jafari, Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications, *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *108*, 1090.
- [64] L. Peraro, J. A. Kritzer, Emerging Methods and Design Principles for Cell-Penetrant Peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57*, 11868.
- [65] H. A. Rydberg, M. Matson, H. L. Amand, E. K. Esbjörner, B. Nordén, Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5531.
- [66] J. S. Appelbaum, J. R. LaRochelle, B. A. Smith, D. M. Balkin, J. M. Holub, A. Schepartz, Arginine topology controls escape of minimally cationic proteins from early endosomes to the cytoplasm, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 819.
- [67] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010.
- [68] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444.
- [69] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, U. Langel, Cell penetration by transportan, *FASEB J.* **1998**, *12*, 67.
- [70] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836.
- [71] Z. Qian, T. Liu, Y.-Y. Liu, R. Briesewitz, A. M. Barrios, S. M. Jhiang, D. Pei, Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 423.

- [72] Y. Ding, J. P. Ting, J. Liu, S. Al-Azzam, P. Pandya, S. Afshar, Impact of non-proteinogenic amino acids in the discovery and development of peptide therapeutics, *Amino Acids* **2020**, *52*, 1207.
- [73] C. Heinis, G. Winter, Encoded libraries of chemically modified peptides, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 89.
- [74] T. Morioka, N. D. Loik, C. J. Hipolito, Y. Goto, H. Suga, Selection-based discovery of macrocyclic peptides for the next generation therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 34.
- [75] M.-Q. Zhang, B. Wilkinson, Drug discovery beyond the 'rule-of-five', *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 478.
- [76] B. C. Doak, J. Zheng, D. Dobritzsch, J. Kihlberg, How Beyond Rule of 5 Drugs and Clinical Candidates Bind to Their Targets, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2312.
- [77] P. D. Leeson, B. Springthorpe, The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881.
- [78] M. D. Shultz, Two Decades under the Influence of the Rule of Five and the Changing Properties of Approved Oral Drugs, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1701.
- [79] T. Passioura, The Road Ahead for the Development of Macrocyclic Peptide Ligands, *Biochemistry* **2020**, *59*, 139.
- [80] C. Heinis, Drug discovery: tools and rules for macrocycles, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 696.
- [81] F. Giordanetto, J. Kihlberg, Macrocyclic drugs and clinical candidates: what can medicinal chemists learn from their properties?, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 278.
- [82] E. M. Driggers, S. P. Hale, J. Lee, N. K. Terrett, The exploration of macrocycles for drug discovery—an underexploited structural class, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 608.
- [83] J. Mallinson, I. Collins, Macrocycles in new drug discovery, *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1409.
- [84] L. K. Buckton, M. N. Rahimi, S. R. McAlpine, Cyclic Peptides as Drugs for Intracellular Targets: The Next Frontier in Peptide Therapeutic Development, *Chemistry* **2020**, *27*, 1487.
- [85] P. G. Dougherty, A. Sahni, D. Pei, Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10241.
- [86] T. Passioura, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 727.
- [87] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, The future of peptide-based drugs, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136.
- [88] C. J. White, A. K. Yudin, Contemporary strategies for peptide macrocyclization, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509.
- [89] R. Maini, S. Umemoto, H. Suga, Ribosome-mediated synthesis of natural product-like peptides via cell-free translation, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *34*, 44.

- [90] Y. V. G. Schlippe, M. C. T. Hartman, K. Josephson, J. W. Szostak, In vitro selection of highly modified cyclic peptides that act as tight binding inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10469.
- [91] T. Passioura, H. Suga, A RaPID way to discover nonstandard macrocyclic peptide modulators of drug targets, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1931.
- [92] W. Lian, P. Upadhyaya, C. A. Rhodes, Y. Liu, D. Pei, Screening bicyclic peptide libraries for protein-protein interaction inhibitors: discovery of a tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11990.
- [93] P. Upadhyaya, Z. Qian, N. A.A. Habir, D. Pei, Direct Ras inhibitors identified from a structurally rigidified bicyclic peptide library, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 7714.
- [94] Z. Qian, P. G. Dougherty, D. Pei, Targeting intracellular protein-protein interactions with cell-permeable cyclic peptides, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 80.
- [95] P. Upadhyaya, Z. Qian, N. G. Selner, S. R. Clippinger, Z. Wu, R. Briesewitz, D. Pei, Inhibition of Ras signaling by blocking Ras-effector interactions with cyclic peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7602.
- [96] T. B. Trinh, P. Upadhyaya, Z. Qian, D. Pei, Discovery of a Direct Ras Inhibitor by Screening a Combinatorial Library of Cell-Permeable Bicyclic Peptides, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 75.
- [97] W. M. Hewitt, S. S. F. Leung, C. R. Pye, A. R. Ponkey, M. Bednarek, M. P. Jacobson, R. S. Lokey, Cell-permeable cyclic peptides from synthetic libraries inspired by natural products, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 715.
- [98] E. A. Villar, D. Beglov, S. Chennamadhavuni, J. A. Porco, D. Kozakov, S. Vajda, A. Whitty, How proteins bind macrocycles, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 723.
- [99] G. B. Downes, N. Gautam, The G protein subunit gene families, *Genomics* **1999**, *62*, 544.
- [100] C. R. McCudden, M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, F. S. Willard, G-protein signaling: back to the future, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 551.
- [101] N. Wettschureck, S. Offermanns, Mammalian G proteins and their cell type specific functions, *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 1159.
- [102] M. I. Simon, M. P. Strathmann, N. Gautam, Diversity of G proteins in signal transduction, *Science* **1991**, *252*, 802.
- [103] N. Gautam, G. B. Downes, K. Yan, O. Kisselev, The G-protein betagamma complex, *Cell. Signal.* **1998**, *10*, 447.
- [104] G. Milligan, E. Kostenis, Heterotrimeric G-proteins: a short history, *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl 1*, S46-55.
- [105] A. G. Gilman, Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase, *Biosci. Rep.* **1995**, *15*, 65.
- [106] M. Rodbell, Nobel Lecture. Signal transduction: evolution of an idea, *Biosci. Rep.* **1995**, *15*, 117.
- [107] R. J. Lefkowitz, A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6366.

- [108] B. Kobilka, The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 6380.
- [109] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions, *Nature* **1990**, *348*, 125.
- [110] J. Wang, Y. Miao, Recent advances in computational studies of GPCR-G protein interactions, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2019**, *116*, 397.
- [111] C. Draper-Joyce, S. G. B. Furness, Conformational Transitions and the Activation of Heterotrimeric G Proteins by G Protein-Coupled Receptors, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2019**, *2*, 285.
- [112] T. M. Cabrera-Vera, J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni, H. E. Hamm, Insights into G protein structure, function, and regulation, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 765.
- [113] J. D. Violin, A. L. Crombie, D. G. Soergel, M. W. Lark, Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress, *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 308.
- [114] V. V. Gurevich, E. V. Gurevich, GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins, *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 125.
- [115] D. Wooten, A. Christopoulos, M. Marti-Solano, M. M. Babu, P. M. Sexton, Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 638.
- [116] J. B. Blumer, S. M. Lanier, Activators of G protein signaling exhibit broad functionality and define a distinct core signaling triad, *Mol. Pharmacol.* **2014**, *85*, 388.
- [117] D. E. Bosch, T. Zielinski, R. G. Lowery, D. P. Siderovski, Evaluating modulators of "Regulator of G-protein Signaling" (RGS) proteins, *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2012**, *Chapter 2*, Unit2.8.
- [118] B. Sjögren, Regulator of G protein signaling proteins as drug targets: current state and future possibilities, *Adv. Pharmacol.* **2011**, *62*, 315.
- [119] A. J. Kimple, D. E. Bosch, P. M. Giguère, D. P. Siderovski, Regulators of G-protein signaling and their G $\alpha$  substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets, *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 728.
- [120] M. Sato, J. B. Blumer, V. Simon, S. M. Lanier, Accessory proteins for G proteins: partners in signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 151.
- [121] J. B. Blumer, S. S. Oner, S. M. Lanier, Group II activators of G-protein signalling and proteins containing a G-protein regulatory motif, *Acta Physiol.* **2012**, *204*, 202.
- [122] A. Takesono, M. J. Cismowski, C. Ribas, M. Bernard, P. Chung, S. Hazard, E. Duzic, S. M. Lanier, Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33202.
- [123] Y. K. Peterson, M. L. Bernard, H. Ma, S. Hazard, S. G. Graber, S. M. Lanier, Stabilization of the GDP-bound conformation of G $\alpha$  by a peptide derived from the G-protein regulatory motif of AGS3, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33193.

- [124] D. P. Siderovski, M. A. Diversé-Pierluissi, L. de Vries, The GoLoco motif: a Gai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 340.
- [125] G. G. Tall, A. M. Krumin, A. G. Gilman, Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide exchange factor, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8356.
- [126] V. Gupta, D. Bhandari, A. Leyme, N. Aznar, K. K. Midde, I.-C. Lo, J. Ear, I. Niesman, I. López-Sánchez, J. B. Blanco-Canosa, M. von Zastrow, M. Garcia-Marcos, M. G. Farquhar, P. Ghosh, GIV/Girdin activates Gai and inhibits Gas via the same motif, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E5721-30.
- [127] P. Ghosh, P. Rangamani, I. Kufareva, The GAPs, GEFs, GDIs and...now, GEMs: New kids on the heterotrimeric G protein signaling block, *Cell Cycle* **2017**, *16*, 607.
- [128] D. P. Siderovski, F. S. Willard, The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits, *Int. J. Biol. Sci.* **2005**, *1*, 51.
- [129] W. J. Tang, J. H. Hurley, Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 231.
- [130] R. K. Sunahara, R. Taussig, Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling, *Mol. Interv.* **2002**, *2*, 168.
- [131] K. B. Hubbard, J. R. Hepler, Cell signalling diversity of the Gq $\alpha$  family of heterotrimeric G proteins, *Cell. Signal.* **2006**, *18*, 135.
- [132] V. M. Tesmer, T. Kawano, A. Shankaranarayanan, T. Kozasa, J. J. G. Tesmer, Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex, *Science* **2005**, *310*, 1686.
- [133] J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler, The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S, *Nature* **1993**, *366*, 654.
- [134] D. G. Lambright, J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler, Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein, *Nature* **1994**, *369*, 621.
- [135] N. A. Lambert, C. A. Johnston, S. D. Cappell, S. Kuravi, A. J. Kimple, F. S. Willard, D. P. Siderovski, Regulators of G-protein signaling accelerate GPCR signaling kinetics and govern sensitivity solely by accelerating GTPase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 7066.
- [136] D. Goricanec, R. Stehle, P. Egloff, S. Grigoriu, A. Plückthun, G. Wagner, F. Hagn, Conformational dynamics of a G-protein  $\alpha$  subunit is tightly regulated by nucleotide binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E3629-38.
- [137] B. Nubbemeyer, A. A. Paul George, T. Kühl, A. Pepanian, M. S. Beck, R. Maghraby, M. Shetab Boushehri, M. Muehlhaupt, E. M. Pfeil, S. Annala, D. Pei, H. Ammer, D. Imhof, Targeting of Gai/s Proteins by Peptidic Guanine Nucleotide Exchange Modulators **2021**, eingereicht.
- [138] D. E. Coleman, A. M. Berghuis, E. Lee, M. E. Linder, A. G. Gilman, S. R. Sprang, Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis, *Science* **1994**, *265*, 1405.



- [139] J. Sondek, D. G. Lambright, J. P. Noel, H. E. Hamm, P. B. Sigler, GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin  $\alpha$ -GDP-AIF-4, *Nature* **1994**, *372*, 276.
- [140] R. K. Sunahara, J. J. Tesmer, A. G. Gilman, S. R. Sprang, Crystal structure of the adenylyl cyclase activator G $\alpha$ , *Science* **1997**, *278*, 1943.
- [141] D. G. Lambright, J. Sondek, A. Bohm, N. P. Skiba, H. E. Hamm, P. B. Sigler, The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein, *Nature* **1996**, *379*, 311.
- [142] M. A. Wall, D. E. Coleman, E. Lee, J. A. Iñiguez-Lluhi, B. A. Posner, A. G. Gilman, S. R. Sprang, The structure of the G protein heterotrimer Gi  $\alpha$  1  $\beta$  1  $\gamma$  2, *Cell* **1995**, *83*, 1047.
- [143] X. Liu, X. Xu, D. Hilger, P. Aschauer, J. K. S. Tiemann, Y. Du, H. Liu, K. Hirata, X. Sun, R. Guixà-González, J. M. Mathiesen, P. W. Hildebrand, B. K. Kobilka, Structural Insights into the Process of GPCR-G Protein Complex Formation, *Cell* **2019**, *177*, 1243-1251.e12.
- [144] C. J. Draper-Joyce, M. Khoshouei, D. M. Thal, Y.-L. Liang, A. T. N. Nguyen, S. G. B. Furness, H. Venugopal, J.-A. Baltos, J. M. Pnitzko, R. Danev, W. Baumeister, L. T. May, D. Wootten, P. M. Sexton, A. Glukhova, A. Christopoulos, Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor-Gi complex, *Nature* **2018**, *558*, 559.
- [145] K. C. Slep, M. A. Kercher, W. He, C. W. Cowan, T. G. Wensel, P. B. Sigler, Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G protein at 2.0 Å, *Nature* **2001**, *409*, 1071.
- [146] R. J. Kimple, M. E. Kimple, L. Betts, J. Sondek, D. P. Siderovski, Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by G $\alpha$  subunits, *Nature* **2002**, *416*, 878.
- [147] A. B. Seven, D. Hilger, M. M. Papasergi-Scott, L. Zhang, Q. Qu, B. K. Kobilka, G. G. Tall, G. Skiniotis, Structures of G $\alpha$  Proteins in Complex with Their Chaperone Reveal Quality Control Mechanisms, *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3699-3709.e6.
- [148] N. A. Kalogriopoulos, S. D. Rees, T. Ngo, N. J. Kopcho, A. V. Ilatovskiy, N. Sun, E. A. Komives, G. Chang, P. Ghosh, I. Kufareva, Structural basis for GPCR-independent activation of heterotrimeric Gi proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 16394.
- [149] J. J. Tesmer, D. M. Berman, A. G. Gilman, S. R. Sprang, Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i  $\alpha$ 1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis, *Cell* **1997**, *89*, 251.
- [150] S. G. F. Rasmussen, B. T. DeVree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. A. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka, Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature* **2011**, *477*, 549.
- [151] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, S. R. Sprang, Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ .GTP $\gamma$ S, *Science* **1997**, *278*, 1907.
- [152] C. A. Johnston, F. S. Willard, M. R. Jezyk, Z. Fredericks, E. T. Bodor, M. B. Jones, R. Blaesius, V. J. Watts, T. K. Harden, J. Sondek, J. K. Ramer, D. P. Siderovski, Structure

- of Galpha(i1) bound to a GDP-selective peptide provides insight into guanine nucleotide exchange, *Structure* **2005**, *13*, 1069.
- [153] C. A. Johnston, E. S. Lobanova, A. S. Shavkunov, J. Low, J. K. Ramer, R. Blaesius, Z. Fredericks, F. S. Willard, B. Kuhlman, V. Y. Arshavsky, D. P. Siderovski, Minimal determinants for binding activated G alpha from the structure of a G alpha(i1)-peptide dimer, *Biochemistry* **2006**, *45*, 11390.
- [154] S. Rens-Domiano, H. E. Hamm, Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1059.
- [155] T. Flock, C. N. J. Ravarani, D. Sun, A. J. Venkatakrishnan, M. Kayikci, C. G. Tate, D. B. Veprintsev, M. M. Babu, Universal allosteric mechanism for G $\alpha$  activation by GPCRs, *Nature* **2015**, *524*, 173.
- [156] A. I. de Opakua, K. Parag-Sharma, V. DiGiacomo, N. Merino, A. Leyme, A. Marivin, M. Villate, L. T. Nguyen, M. A. de La Cruz-Morcillo, J. B. Blanco-Canosa, S. Ramachandran, G. S. Baillie, R. A. Cerione, F. J. Blanco, M. Garcia-Marcos, Molecular mechanism of G $\alpha$ i activation by non-GPCR proteins with a G $\alpha$ -Binding and Activating motif, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15163.
- [157] D. E. Coleman, S. R. Sprang, Crystal structures of the G protein Gi alpha 1 complexed with GDP and Mg<sup>2+</sup>: a crystallographic titration experiment, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14376.
- [158] M. B. Mixon, E. Lee, D. E. Coleman, A. M. Berghuis, A. G. Gilman, S. R. Sprang, Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis, *Science* **1995**, *270*, 954.
- [159] R. O. Dror, T. J. Mildorf, D. Hilger, A. Manglik, D. W. Borhani, D. H. Arlow, A. Philippsen, N. Villanueva, Z. Yang, M. T. Lerch, W. L. Hubbell, B. K. Kobilka, R. K. Sunahara, D. E. Shaw, Signal Transduction. Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins, *Science* **2015**, *348*, 1361.
- [160] D. Sun, T. Flock, X. Deupi, S. Maeda, M. Matkovic, S. Mendieta, D. Mayer, R. Dawson, G. F. X. Schertler, M. Madan Babu, D. B. Veprintsev, Probing G $\alpha$ i1 protein activation at single-amino acid resolution, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 686.
- [161] X. Sun, K. J. Blumer, G. R. Bowman, Simulation of spontaneous G protein activation reveals a new intermediate driving GDP unbinding, *eLIFE* **2018**, *7*, e38465.
- [162] H. E. Kato, Y. Zhang, H. Hu, C.-M. Suomivuori, F. M. N. Kadji, J. Aoki, K. Krishna Kumar, R. Fonseca, D. Hilger, W. Huang, N. R. Latorraca, A. Inoue, R. O. Dror, B. K. Kobilka, G. Skiniotis, Conformational transitions of a neurotensin receptor 1-Gi1 complex, *Nature* **2019**, *572*, 80.
- [163] A. M. Berghuis, E. Lee, A. S. Raw, A. G. Gilman, S. R. Sprang, Structure of the GDP-Pi complex of Gly203--Ala g $\alpha$ 1: a mimic of the ternary product complex of g $\alpha$ -catalyzed GTP hydrolysis, *Structure* **1996**, *4*, 1277.
- [164] S. Majumdar, S. Ramachandran, R. A. Cerione, New insights into the role of conserved, essential residues in the GTP binding/GTP hydrolytic cycle of large G proteins, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9219.

- [165] S. C. van Keulen, U. Rothlisberger, Exploring the inhibition mechanism of adenylyl cyclase type 5 by n-terminal myristoylated Gai1, *PLOS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005673.
- [166] A. V. Smrcka, I. Fisher, G-protein  $\beta\gamma$  subunits as multi-functional scaffolds and transducers in G-protein-coupled receptor signaling, *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 4447.
- [167] D. E. Clapham, E. J. Neer, G protein beta gamma subunits, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 167.
- [168] J. Sondek, A. Bohm, D. G. Lambright, H. E. Hamm, P. B. Sigler, Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1Å resolution, *Nature* **1996**, *379*, 369.
- [169] M. O'Hayre, J. Vázquez-Prado, I. Kufareva, E. W. Stawiski, T. M. Handel, S. Seshagiri, J. S. Gutkind, The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 412.
- [170] N. Arang, J. S. Gutkind, G Protein-Coupled receptors and heterotrimeric G proteins as cancer drivers, *FEBS Lett.* **2020**, *594*, 4201.
- [171] M. O'Hayre, M. S. Degese, J. S. Gutkind, Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *27*, 126.
- [172] L. Larribère, J. Utikal, Update on GNA Alterations in Cancer: Implications for Uveal Melanoma Treatment, *Cancers* **2020**, *12*, 1524.
- [173] K. L. Laugwitz, A. Allgeier, S. Offermanns, K. Spicher, J. van Sande, J. E. Dumont, G. Schultz, The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 116.
- [174] C. L. Schmid, N. M. Kennedy, N. C. Ross, K. M. Lovell, Z. Yue, J. Morgenweck, M. D. Cameron, T. D. Bannister, L. M. Bohn, Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics, *Cell* **2017**, *171*, 1165-1175.e13.
- [175] T. K. Attwood, J. B. Findlay, Fingerprinting G-protein-coupled receptors, *Protein Eng.* **1994**, *7*, 195.
- [176] L. F. Kolakowski, GCRDb: a G-protein-coupled receptor database, *Recept. Channels* **1994**, *2*, 1.
- [177] H. B. Schiöth, R. Fredriksson, The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective, *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, *142*, 94.
- [178] G.-M. Hu, T.-L. Mai, C.-M. Chen, Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution, *Sci Rep* **2017**, *7*, 15495.
- [179] X. Edward Zhou, K. Melcher, H. Eric Xu, Structural biology of G protein-coupled receptor signaling complexes, *Protein Sci.* **2019**, *28*, 487.
- [180] C.-J. Tsai, J. Marino, R. Adaixo, F. Pamula, J. Muehle, S. Maeda, T. Flock, N. M. Taylor, I. Mohammed, H. Matile, R. J. Dawson, X. Deupi, H. Stahlberg, G. Schertler, Cryo-EM structure of the rhodopsin-Gai- $\beta\gamma$  complex reveals binding of the rhodopsin C-terminal tail to the  $\beta\gamma$  subunit, *eLIFE* **2019**, *8*, e46041.
- [181] A. Glukhova, C. J. Draper-Joyce, R. K. Sunahara, A. Christopoulos, D. Wootten, P. M. Sexton, Rules of Engagement: GPCRs and G Proteins, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2018**, *1*, 73.

- [182] A. Manglik, A. C. Kruse, Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation, *Biochemistry* **2017**, *56*, 5628.
- [183] A. Koehl, H. Hu, S. Maeda, Y. Zhang, Q. Qu, J. M. Paggi, N. R. Latorraca, D. Hilger, R. Dawson, H. Matile, G. F. X. Schertler, S. Granier, W. I. Weis, R. O. Dror, A. Manglik, G. Skiniotis, B. K. Kobilka, Structure of the  $\mu$ -opioid receptor-Gi protein complex, *Nature* **2018**, *558*, 547.
- [184] D. Hilger, K. K. Kumar, H. Hu, M. F. Pedersen, E. S. O'Brien, L. Giehm, C. Jennings, G. Eskici, A. Inoue, M. Lerch, J. M. Mathiesen, G. Skiniotis, B. K. Kobilka, Structural insights into differences in G protein activation by family A and family B GPCRs, *Science* **2020**, *369*, eaba3373.
- [185] X. Ma, Y. Hu, H. Batebi, J. Heng, J. Xu, X. Liu, X. Niu, H. Li, P. W. Hildebrand, C. Jin, B. K. Kobilka, Analysis of  $\beta$ 2AR-Gs and  $\beta$ 2AR-Gi complex formation by NMR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 23096.
- [186] T. Flock, A. S. Hauser, N. Lund, D. E. Gloriam, S. Balaji, M. M. Babu, Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding, *Nature* **2017**, *545*, 317.
- [187] S. M. Lim, Decoding Principles of Selective GPCR-G $\alpha$  Coupling, *Biochemistry* **2020**, *59*, 130.
- [188] A. V. Smrcka, N. Kichik, T. Tarragó, M. Burroughs, M.-S. Park, N. K. Itoga, H. A. Stern, B. M. Willardson, E. Giralt, NMR analysis of G-protein betagamma subunit complexes reveals a dynamic G( $\alpha$ )-Gbetagamma subunit interface and multiple protein recognition modes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 639.
- [189] Y. Lin, A. V. Smrcka, Understanding molecular recognition by G protein  $\beta\gamma$  subunits on the path to pharmacological targeting, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 551.
- [190] M. E. Linder, I. H. Pang, R. J. Duronio, J. I. Gordon, P. C. Sternweis, A. G. Gilman, Lipid modifications of G protein subunits. Myristoylation of Go  $\alpha$  increases its affinity for beta gamma, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4654.
- [191] Z. Chen, W. D. Singer, P. C. Sternweis, S. R. Sprang, Structure of the p115RhoGEF rgRGS domain-G $\alpha$ 13/i1 chimera complex suggests convergent evolution of a GTPase activator, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 191.
- [192] C. Qi, S. Sorrentino, O. Medalia, V. M. Korkhov, The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein, *Science* **2019**, *364*, 389.
- [193] S. C. van Keulen, D. Narzi, U. Rothlisberger, Association of Both Inhibitory and Stimulatory G $\alpha$  Subunits Implies Adenylyl Cyclase 5 Deactivation, *Biochemistry* **2019**, *58*, 4317.
- [194] J. J. Dumas, D. G. Lambright, G $\alpha$  meets its target – shedding light on a key signal transduction event, *Structure* **1998**, *6*, 407.
- [195] C. W. Dessauer, J. J. Tesmer, S. R. Sprang, A. G. Gilman, Identification of a G $\alpha$  binding site on type V adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25831.
- [196] S. C. van Keulen, U. Rothlisberger, Effect of N-Terminal Myristoylation on the Active Conformation of G $\alpha$ 1-GTP, *Biochemistry* **2017**, *56*, 271.

- [197] Y. K. Peterson, S. Hazard, S. G. Graber, S. M. Lanier, Identification of structural features in the G-protein regulatory motif required for regulation of heterotrimeric G-proteins, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6767.
- [198] F. S. Willard, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 925.
- [199] R. Aasland, C. Abrams, C. Ampe, L. J. Ball, M. T. Bedford, G. Cesareni, M. Gimona, J. H. Hurley, T. Jarchau, V. P. Lehto, M. A. Lemmon, R. Linding, B. J. Mayer, M. Nagai, M. Sudol, U. Walter, S. J. Winder, Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 141.
- [200] M. Natochin, K. G. Gasimov, N. O. Artemyev, A GPR-protein interaction surface of Gi(alpha): implications for the mechanism of GDP-release inhibition, *Biochemistry* **2002**, *41*, 258.
- [201] F. S. Willard, Z. Zheng, J. Guo, G. J. Digby, A. J. Kimple, J. M. Conley, C. A. Johnston, D. Bosch, M. D. Willard, V. J. Watts, N. A. Lambert, S. R. Ikeda, Q. Du, D. P. Siderovski, A point mutation to Galphai selectively blocks GoLoco motif binding: direct evidence for Galpha.GoLoco complexes in mitotic spindle dynamics, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36698.
- [202] M. Natochin, K. G. Gasimov, N. O. Artemyev, Inhibition of GDP/GTP exchange on G alpha subunits by proteins containing G-protein regulatory motifs, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5322.
- [203] K. Khafizov, GoLoco motif proteins binding to Galpha(i1): insights from molecular simulations, *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 1491.
- [204] P. Chan, M. Gabay, F. A. Wright, G. G. Tall, Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19932.
- [205] M. M. Papasergi, B. R. Patel, G. G. Tall, The G protein  $\alpha$  chaperone Ric-8 as a potential therapeutic target, *Mol. Pharmacol.* **2015**, *87*, 52.
- [206] G. G. Tall, Ric-8 regulation of heterotrimeric G proteins, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2013**, *33*, 139.
- [207] L. J. McClelland, K. Zhang, T.-C. Mou, J. Johnston, C. Yates-Hansen, S. Li, C. J. Thomas, T. I. Doukov, S. Triest, A. Wohlkonig, G. G. Tall, J. Steyaert, W. Chiu, S. R. Sprang, Structure of the G protein chaperone and guanine nucleotide exchange factor Ric-8A bound to Gai1, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1077.
- [208] D. Srivastava, N. O. Artemyev, Large-scale conformational rearrangement of the  $\alpha 5$ -helix of G $\alpha$  subunits in complex with the guanine nucleotide exchange factor Ric8A, *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 17875.
- [209] A. Marivin, M. Maziarz, J. Zhao, V. DiGiacomo, I. Olmos Calvo, E. A. Mann, J. Ear, J. B. Blanco-Canosa, E. M. Ross, P. Ghosh, M. Garcia-Marcos, DAPLE protein inhibits nucleotide exchange on Gas and G $\alpha$ q via the same motif that activates Gai, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 2270.
- [210] M. Garcia-Marcos, P. S. Kietsunthorn, H. Wang, P. Ghosh, M. G. Farquhar, G Protein binding sites on Calnuc (nucleobindin 1) and NUCB2 (nucleobindin 2) define a new class of G(alpha)i-regulatory motifs, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28138.

- [211] M. Maziarz, S. Broselid, V. DiGiacomo, J.-C. Park, A. Luebbers, L. Garcia-Navarrete, J. B. Blanco-Canosa, G. S. Baillie, M. Garcia-Marcos, A biochemical and genetic discovery pipeline identifies PLC $\delta$ 4b as a nonreceptor activator of heterotrimeric G-proteins, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 16964.
- [212] B. D. Coleman, A. Marivin, K. Parag-Sharma, V. DiGiacomo, S. Kim, J. S. Pepper, J. Casler, L. T. Nguyen, M. R. Koelle, M. Garcia-Marcos, Evolutionary Conservation of a GPCR-Independent Mechanism of Trimeric G Protein Activation, *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 820.
- [213] V. DiGiacomo, A. Marivin, M. Garcia-Marcos, When Heterotrimeric G Proteins Are Not Activated by G Protein-Coupled Receptors: Structural Insights and Evolutionary Conservation, *Biochemistry* **2018**, *57*, 255.
- [214] N. Aznar, K. K. Midde, Y. Dunkel, I. Lopez-Sanchez, Y. Pavlova, A. Marivin, J. Barbazán, F. Murray, U. Nitsche, K.-P. Janssen, K. Willert, A. Goel, M. Abal, M. Garcia-Marcos, P. Ghosh, Daple is a novel non-receptor GEF required for trimeric G protein activation in Wnt signaling, *eLIFE* **2015**, *4*, e07091.
- [215] D. L. Roman, J. R. Traynor, Regulators of G protein signaling (RGS) proteins as drug targets: modulating G-protein-coupled receptor (GPCR) signal transduction, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7433.
- [216] K. C. Slep, M. A. Kercher, T. Wieland, C.-K. Chen, M. I. Simon, P. B. Sigler, Molecular architecture of Galphao and the structural basis for RGS16-mediated deactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 6243.
- [217] S. P. Srinivasa, N. Watson, M. C. Overton, K. J. Blumer, Mechanism of RGS4, a GTPase-activating protein for G protein alpha subunits, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1529.
- [218] A. J. Kimple, M. Soundararajan, S. Q. Hutsell, A. K. Roos, D. J. Urban, V. Setola, B. R. S. Temple, B. L. Roth, S. Knapp, F. S. Willard, D. P. Siderovski, Structural determinants of G-protein alpha subunit selectivity by regulator of G-protein signaling 2 (RGS2), *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19402.
- [219] M. Soundararajan, F. S. Willard, A. J. Kimple, A. P. Turnbull, L. J. Ball, G. A. Schoch, C. Gileadi, O. Y. Fedorov, E. F. Dowler, V. A. Higman, S. Q. Hutsell, M. Sundström, D. A. Doyle, D. P. Siderovski, Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein alpha-subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 6457.
- [220] M. E. Sowa, W. He, T. G. Wensel, O. Lichtarge, A regulator of G protein signaling interaction surface linked to effector specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 1483.
- [221] A. Asli, I. Sadiya, M. Avital-Shacham, M. Kosloff, "Disruptor" residues in the regulator of G protein signaling (RGS) R12 subfamily attenuate the inactivation of G $\alpha$  subunits, *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaan3677.
- [222] S. Usman, M. Khawer, S. Rafique, Z. Naz, K. Saleem, The current status of anti-GPCR drugs against different cancers, *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10*, 517.
- [223] A. Nieto Gutierrez, P. H. McDonald, GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets, *Cell. Signal.* **2018**, *41*, 65.

- [224] L. Gottesman-Katz, R. Latorre, S. Vanner, B. L. Schmidt, N. W. Bunnett, Targeting G protein-coupled receptors for the treatment of chronic pain in the digestive system, *Gut* **2020**, 10.1136/gutjnl-2020-321193.
- [225] V. Wu, H. Yeerna, N. Nohata, J. Chiou, O. Harismendy, F. Raimondi, A. Inoue, R. B. Russell, P. Tamayo, J. S. Gutkind, Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy, *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 11062.
- [226] A. J. Parish, V. Nguyen, A. M. Goodman, K. Murugesan, G. M. Frampton, R. Kurzrock, GNAS, GNAQ, and GNA11 alterations in patients with diverse cancers, *Cancer* **2018**, *124*, 4080.
- [227] C. A. Landis, S. B. Masters, A. Spada, A. M. Pace, H. R. Bourne, L. Vallar, GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours, *Nature* **1989**, *340*, 692.
- [228] K. Watanabe, T. Nakamura, S. Onodera, A. Saito, T. Shibahara, T. Azuma, A novel GNAS-mutated human induced pluripotent stem cell model for understanding GNAS-mutated tumors, *Tumor Biol.* **2020**, *42*, 1010428320962588.
- [229] R. Rao, R. Salloum, M. Xin, Q. R. Lu, The G protein Gas acts as a tumor suppressor in sonic hedgehog signaling-driven tumorigenesis, *Cell Cycle* **2016**, *15*, 1325.
- [230] X. He, L. Zhang, Y. Chen, M. Remke, D. Shih, F. Lu, H. Wang, Y. Deng, Y. Yu, Y. Xia, X. Wu, V. Ramaswamy, T. Hu, F. Wang, W. Zhou, D. K. Burns, S. H. Kim, M. Kool, S. M. Pfister, L. S. Weinstein, S. L. Pomeroy, R. J. Gilbertson, J. B. Rubin, Y. Hou, R. Wechsler-Reya, M. D. Taylor, Q. R. Lu, The G protein  $\alpha$  subunit Gas is a tumor suppressor in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma, *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1035.
- [231] R. Iglesias-Bartolome, D. Torres, R. Marone, X. Feng, D. Martin, M. Simaan, M. Chen, L. S. Weinstein, S. S. Taylor, A. A. Molinolo, J. S. Gutkind, Inactivation of a  $G\alpha(s)$ -PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis, *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 793.
- [232] N. Bhattacharyya, X. Hu, C. Z. Chen, L. A. Mathews Griner, W. Zheng, J. Inglese, C. P. Austin, J. J. Marugan, N. Southall, S. Neumann, J. K. Northup, M. Ferrer, M. T. Collins, A high throughput screening assay system for the identification of small molecule inhibitors of gsp, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90766.
- [233] L. S. Weinstein, A. Shenker, P. V. Gejman, M. J. Merino, E. Friedman, A. M. Spiegel, Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome, *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1688.
- [234] J. Lyons, C. A. Landis, G. Harsh, L. Vallar, K. Gr $\ddot{u}$ newald, H. Feichtinger, Q. Y. Duh, O. H. Clark, E. Kawasaki, H. R. Bourne, Two G protein oncogenes in human endocrine tumors, *Science* **1990**, *249*, 655.
- [235] M. Q. Almeida, C. A. Stratakis, How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues?, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, *336*, 162.
- [236] S. Turan, M. Bastepe, GNAS Spectrum of Disorders, *Curr. Osteoporos. Rep.* **2015**, *13*, 146.

- [237] M. Garcia-Marcos, P. Ghosh, M. G. Farquhar, Molecular basis of a novel oncogenic mutation in GNAO1, *Oncogene* **2011**, *30*, 2691.
- [238] N. Dhanasekaran, S. T. Tsim, J. M. Dermott, D. Onesime, Regulation of cell proliferation by G proteins, *Oncogene* **1998**, *17*, 1383.
- [239] A. M. Pace, Y. H. Wong, H. R. Bourne, A mutant alpha subunit of Gi2 induces neoplastic transformation of Rat-1 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7031.
- [240] I. Tuominen, E. Heliövaara, A. Raitila, M.-R. Rautiainen, M. Mehine, R. Katainen, I. Donner, V. Aittomäki, H. J. Lehtonen, M. Ahlsten, L. Kivipelto, C. Schalin-Jääntti, J. Arola, S. Hautaniemi, A. Karhu, AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective G $\alpha$ i-cAMP signaling, *Oncogene* **2015**, *34*, 1174.
- [241] J. D. Holland, M. Kochetkova, C. Akekawatchai, M. Dottore, A. Lopez, S. R. McColl, Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4117.
- [242] M. I. Palacios-Arreola, K. E. Nava-Castro, J. I. Castro, E. García-Zepeda, J. C. Carrero, J. Morales-Montor, The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets, *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 849720.
- [243] F. Raimondi, A. Inoue, F. M. N. Kadji, N. Shuai, J.-C. Gonzalez, G. Singh, A. A. de La Vega, R. Sotillo, B. Fischer, J. Aoki, J. S. Gutkind, R. B. Russell, Rare, functional, somatic variants in gene families linked to cancer genes: GPCR signaling as a paradigm, *Oncogene* **2019**, *38*, 6491.
- [244] C. L. Marker, R. Luján, H. H. Loh, K. Wickman, Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta-but not kappa-opioids, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 3551.
- [245] E. Bourinet, T. W. Soong, A. Stea, T. P. Snutch, Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 1486.
- [246] D. Rossi, A. Zlotnik, The biology of chemokines and their receptors, *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 217.
- [247] J. Rangel-Moreno, J. Y. To, T. Owen, B. I. Goldman, A. V. Smrcka, J. H. Anolik, Inhibition of G Protein  $\beta\gamma$  Subunit Signaling Abrogates Nephritis in Lupus-Prone Mice, *Arthritis Rheumatol.* **2016**, *68*, 2244.
- [248] B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 34.
- [249] T. Uemura, T. Kawasaki, M. Taniguchi, Y. Moritani, K. Hayashi, T. Saito, J. Takasaki, W. Uchida, K. Miyata, Biological properties of a specific G $\alpha$ q/11 inhibitor, YM-254890, on platelet functions and thrombus formation under high-shear stress, *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 61.
- [250] A. Shenker, P. Goldsmith, C. G. Unson, A. M. Spiegel, The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9309.



- [251] J. Jin, S. P. Kunapuli, Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 8070.
- [252] A. Moers, B. Nieswandt, S. Massberg, N. Wettschureck, S. Grüner, I. Konrad, V. Schulte, B. Aktas, M.-P. Gratacap, M. I. Simon, M. Gawaz, S. Offermanns, G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1418.
- [253] A. P. Ambrosy, G. C. Fonarow, J. Butler, O. Chioncel, S. J. Greene, M. Vaduganathan, S. Nodari, C. S. P. Lam, N. Sato, A. N. Shah, M. Gheorghiade, The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 1123.
- [254] V. L. Roger, Epidemiology of heart failure, *Circ. Res.* **2013**, *113*, 646.
- [255] P. M. L. Janssen, W. Schillinger, J. K. Donahue, O. Zeitz, S. Emami, S. E. Lehnart, J. Weil, T. Eschenhagen, G. Hasenfuss, J. Prestle, Intracellular beta-blockade: overexpression of Galpha(i2) depresses the beta-adrenergic response in intact myocardium, *Cardiovasc. Res.* **2002**, *55*, 300.
- [256] T. Rau, M. Nose, U. Remmers, J. Weil, A. Weissmüller, K. Davia, S. Harding, K. Peppel, W. J. Koch, T. Eschenhagen, Overexpression of wild-type Galpha(i)-2 suppresses beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes, *FASEB J.* **2003**, *17*, 523.
- [257] J. Neumann, H. Scholz, V. Döring, W. Schmitz, L. Meyerinck, P. Kalmár, Increase In Myocardial Gi-Proteins In Heart Failure, *The Lancet* **1988**, *332*, 936.
- [258] M. R. Bristow, R. Ginsburg, W. Minobe, R. S. Cubicciotti, W. S. Sageman, K. Lurie, M. E. Billingham, D. C. Harrison, E. B. Stinson, Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts, *N. Engl. J. Med.* **1982**, *307*, 205.
- [259] D. J. Newman, G. M. Cragg, Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311.
- [260] W. W. Ja, R. W. Roberts, In vitro selection of state-specific peptide modulators of G protein signaling using mRNA display, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9265.
- [261] C. A. Johnston, F. S. Willard, J. K. Ramer, R. Blaesius, C. N. Roques, D. P. Siderovski, State-selective binding peptides for heterotrimeric G-protein subunits: novel tools for investigating G-protein signaling dynamics, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11*, 370.
- [262] G. P. Prévost, M. O. Lonchamp, S. Holbeck, S. Attoub, D. Zaharevitz, M. Alley, J. Wright, M. C. Brezak, H. Coulomb, A. Savola, M. Huchet, S. Chaumeron, Q.-D. Nguyen, P. Forgez, E. Bruyneel, M. Bracke, E. Ferrandis, P. Roubert, D. Demarquay, C. Gespach, P. G. Kasprzyk, Anticancer activity of BIM-46174, a new inhibitor of the heterotrimeric Galpha/Gbetagamma protein complex, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9227.
- [263] K. M. Appleton, K. J. Bigham, C. C. Lindsey, S. Hazard, J. Lirjoni, S. Parnham, M. Hennig, Y. K. Peterson, Development of inhibitors of heterotrimeric G $\alpha$ i subunits, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3423.
- [264] R. Reher, T. Kühn, S. Annala, T. Benkel, D. Kaufmann, B. Nubbemeyer, J. P. Odhiambo, P. Heimer, C. A. Bäuml, S. Kehraus, M. Crüsemann, E. Kostenis, D. Tietze, G. M. König,

- D. Imhof, Deciphering Specificity Determinants for FR900359-Derived Gq  $\alpha$  Inhibitors Based on Computational and Structure-Activity Studies, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1634.
- [265] H. Zhang, A. L. Nielsen, K. Strømgaard, Recent achievements in developing selective Gq inhibitors, *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 135.
- [266] W. W. Ja, A. Adhikari, R. J. Austin, S. R. Sprang, R. W. Roberts, A peptide core motif for binding to heterotrimeric G protein alpha subunits, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32057.
- [267] A. Carlier, L. Fehr, M. Pinto-Carbó, T. Schäberle, R. Reher, S. Dessein, G. König, L. Eberl, The genome analysis of *Candidatus Burkholderia crenata* reveals that secondary metabolism may be a key function of the *Ardisia crenata* leaf nodule symbiosis, *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 2507.
- [268] M. Fujioka, S. Koda, Y. Morimoto, K. Biemann, Structure of FR900359, a cyclic depsipeptide from *Ardisia crenata* Sims, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2820.
- [269] M. Taniguchi, K. Nagai, N. Arao, T. Kawasaki, T. Saito, Y. Moritani, J. Takasaki, K. Hayashi, S. Fujita, K.-i. Suzuki, S.-i. Tsukamoto, YM-254890, a novel platelet aggregation inhibitor produced by *Chromobacterium* sp. QS3666, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 358.
- [270] A. Nishimura, K. Kitano, J. Takasaki, M. Taniguchi, N. Mizuno, K. Tago, T. Hakoshima, H. Itoh, Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 13666.
- [271] X.-F. Xiong, H. Zhang, C. R. Underwood, K. Harpsøe, T. J. Gardella, M. F. Wöldike, M. Mannstadt, D. E. Gloriam, H. Bräuner-Osborne, K. Strømgaard, Total synthesis and structure-activity relationship studies of a series of selective G protein inhibitors, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 1035.
- [272] H. Zhang, X.-F. Xiong, M. W. Boesgaard, C. R. Underwood, H. Bräuner-Osborne, K. Strømgaard, Structure-Activity Relationship Studies of the Cyclic Depsipeptide Natural Product YM-254890, Targeting the Gq Protein, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 830.
- [273] H. Zhang, A. L. Nielsen, M. W. Boesgaard, K. Harpsøe, N. L. Daly, X. F. Xiong, C. R. Underwood, L. M. Haugaard-Kedström, H. Bräuner-Osborne, D. E. Gloriam, K. Strømgaard, Structure-activity relationship and conformational studies of the natural product cyclic depsipeptides YM-254890 and FR900359, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 847.
- [274] H. Kaur, P. W. R. Harris, P. J. Little, M. A. Brimble, Total synthesis of the cyclic depsipeptide YM-280193, a platelet aggregation inhibitor, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 492.
- [275] D. T. Rensing, S. Uppal, K. J. Blumer, K. D. Moeller, Toward the Selective Inhibition of G Proteins: Total Synthesis of a Simplified YM-254890 Analog, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2270.
- [276] M. Matthey, R. Roberts, A. Seidinger, A. Simon, R. Schröder, M. Kuschak, S. Annala, G. M. König, C. E. Müller, I. P. Hall, E. Kostenis, B. K. Fleischmann, D. Wenzel, Targeted inhibition of Gq signaling induces airway relaxation in mouse models of asthma, *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, 1.
- [277] R. Schrage, A.-L. Schmitz, E. Gaffal, S. Annala, S. Kehraus, D. Wenzel, K. M. Büllsbach, T. Bald, A. Inoue, Y. Shinjo, S. Galandrin, N. Shridhar, M. Hesse, M. Grundmann, N. Merten, T. H. Charpentier, M. Martz, A. J. Butcher, T. Slodczyk, S. Armando, M. Effer, Y. Namkung, L. Jenkins, V. Horn, A. Stößel, H. Dargatz, D. Tietze, D. Imhof, C. Galés,

- C. Drewke, C. E. Müller, M. Hölzel, G. Milligan, A. B. Tobin, J. Gomeza, H. G. Dohlman, J. Sondek, T. K. Harden, M. Bouvier, S. A. Laporte, J. Aoki, B. K. Fleischmann, K. Mohr, G. M. König, T. Tüting, E. Kostenis, The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10156.
- [278] S. Annala, X. Feng, N. Shridhar, F. Eryilmaz, J. Patt, J. Yang, E. M. Pfeil, R. D. Cervantes-Villagrana, A. Inoue, F. Häberlein, T. Slodczyk, R. Reher, S. Kehraus, S. Monteleone, R. Schrage, N. Heycke, U. Rick, S. Engel, A. Pfeifer, P. Kolb, G. König, M. Bünemann, T. Tüting, J. Vázquez-Prado, J. S. Gutkind, E. Gaffal, E. Kostenis, Direct targeting of Gαq and Gα11 oncoproteins in cancer cells, *Sci. Signal.* **2019**, *12*, eaau5948.
- [279] P. E. Stein, A. Boodhoo, G. D. Armstrong, S. A. Cockle, M. H. Klein, R. J. Read, The crystal structure of pertussis toxin, *Structure* **1994**, *2*, 45.
- [280] S. Mangmool, H. Kurose, G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX), *Toxins* **2011**, *3*, 884.
- [281] T. Katada, M. Ui, Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 3129.
- [282] M. Mousli, J.-L. Bueb, C. Bronner, B. Rouot, Y. Landry, G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides, *Trends Pharmacol. Sci.* **1990**, *11*, 358.
- [283] M. Mousli, J. L. Bueb, B. Rouot, Y. Landry, C. Bronner, G-proteins as targets for non-immunological histamine releasers, *Agents Actions* **1991**, *33*, 81.
- [284] M. Mousli, C. Bronner, J. Bockaert, B. Rouot, Y. Landry, Interaction of substance P, compound 4880 and mastoparan with the α-subunit C-terminus of G protein, *Immunol. Lett.* **1990**, *25*, 355.
- [285] U. Tomita, A. Inanobe, I. Kobayashi, K. Takahashi, M. Ui, T. Katada, Direct interactions of mastoparan and compound 48/80 with GTP-binding proteins, *J. Biochem.* **1991**, *109*, 184.
- [286] U. Tomita, K. Takahashi, K. Ikenaka, T. Kondo, I. Fujimoto, S. Aimoto, K. Mikoshiba, M. Ui, T. Katada, Direct activation of GTP-binding proteins by venom peptides that contain cationic clusters within their alpha-helical structures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 400.
- [287] T. Higashijima, S. Uzu, T. Nakajima, E. M. Ross, Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins), *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6491.
- [288] N. Fukushima, M. Kohno, T. Kato, S. Kawamoto, K. Okuda, Y. Misu, H. Ueda, Melittin, a metabostatic peptide inhibiting Gs activity, *Peptides* **1998**, *19*, 811.
- [289] M. Moreno, E. Giralt, Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan, *Toxins* **2015**, *7*, 1126.
- [290] T. Higashijima, J. Burnier, E. M. Ross, Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14176.

- [291] R. Weingarten, L. Ransnäs, H. Mueller, L. A. Sklar, G. M. Bokoch, Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the alpha subunit of Gi, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11044.
- [292] M. Sukumar, T. Higashijima, G protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21421.
- [293] T. Higashijima, E. M. Ross, Mapping of the mastoparan-binding site on G proteins. Cross-linking of 125I-Tyr3,Cys11mastoparan to Go, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12655.
- [294] B. M. de Souza, M. P. Dos Santos Cabrera, J. R. Neto, M. S. Palma, Investigating the effect of different positioning of lysine residues along the peptide chain of mastoparans for their secondary structures and biological activities, *Amino Acids* **2011**, *40*, 77.
- [295] C. Oppi, T. Wagner, A. Crisari, B. Camerini, G. P. Tocchini Valentini, Attenuation of GTPase activity of recombinant G(o) alpha by peptides representing sequence permutations of mastoparan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 8268.
- [296] L. N. Irazazabal, W. F. Porto, S. M. Ribeiro, S. Casale, V. Humblot, A. Ladram, O. L. Franco, Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan, *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858*, 2699.
- [297] Y. Ozaki, Y. Matsumoto, Y. Yatomi, M. Higashihara, T. Kariya, S. Kume, Mastoparan, a wasp venom, activates platelets via pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 779.
- [298] C. J. Sample, K. E. Hudak, B. E. Barefoot, M. D. Koci, M. S. Wanyonyi, S. Abraham, H. F. Staats, E. A. Ramsburg, A mastoparan-derived peptide has broad-spectrum antiviral activity against enveloped viruses, *Peptides* **2013**, *48*, 96.
- [299] H. S. Kachel, S. D. Buckingham, D. B. Sattelle, Insect toxins - selective pharmacological tools and drug/chemical leads, *Curr. Opin. Insect Sci.* **2018**, *30*, 93.
- [300] G. Gajski, A.-M. Domijan, B. Žegura, A. Štern, M. Gerić, I. Novak Jovanović, I. Vrhovac, J. Madunić, D. Breljak, M. Filipič, V. Garaj-Vrhovac, Melittin induced cytogenetic damage, oxidative stress and changes in gene expression in human peripheral blood lymphocytes, *Toxicon* **2016**, *110*, 56.
- [301] H. Kusunoki, K. Wakamatsu, K. Sato, T. Miyazawa, T. Kohno, G protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4782.
- [302] M. Freissmuth, S. Boehm, W. Beindl, P. Nickel, A. P. Ijzerman, M. Hohenegger, C. Nanoff, Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors, *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 602.
- [303] W.-C. Chung, J. C. Kermode, Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 191.
- [304] W. Beindl, T. Mitterauer, M. Hohenegger, A. P. Ijzerman, C. Nanoff, M. Freissmuth, Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues, *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 415.

- [305] M. Hohenegger, M. Waldhoer, W. Beindl, B. Böing, A. Kreimeyer, P. Nickel, C. Nanoff, M. Freissmuth, Gsalpha-selective G protein antagonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 346.
- [306] V. DiGiacomo, A. I. de Opakua, M. P. Papakonstantinou, L. T. Nguyen, N. Merino, J. B. Blanco-Canosa, F. J. Blanco, M. Garcia-Marcos, The Gai-GIV binding interface is a druggable protein-protein interaction, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8575.
- [307] B. Yoo, R. Iyengar, Y. Chen, Functional analysis of the interface regions involved in interactions between the central cytoplasmic loop and the C-terminal tail of adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13925.
- [308] C. Merlen, D. Fayol-Messaoudi, S. Fabrega, T. El Hage, A. Servin, F. Authier, Proteolytic activation of internalized cholera toxin within hepatic endosomes by cathepsin D, *FEBS J.* **2005**, *272*, 4385.
- [309] D. Cassel, T. Pfeuffer, Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 2669.
- [310] M. Freissmuth, A. G. Gilman, Mutations of GS alpha designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG187 result in loss of GTPase activity, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21907.
- [311] C. van Dop, M. Tsubokawa, H. R. Bourne, J. Ramachandran, Amino acid sequence of retinal transducin at the site ADP-ribosylated by cholera toxin, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 696.
- [312] J. K. Northup, P. C. Sternweis, M. D. Smigel, L. S. Schleifer, E. M. Ross, A. G. Gilman, Purification of the regulatory component of adenylate cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 6516.
- [313] D. M. Gill, R. Meren, ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 3050.
- [314] D. Cassel, Z. Selinger, Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 3307.
- [315] T. K. Sixma, S. E. Pronk, K. H. Kalk, E. S. Wartna, B. A. van Zanten, B. Witholt, W. G. Hol, Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*, *Nature* **1991**, *351*, 371.
- [316] T. K. Sixma, K. H. Kalk, B. A. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt, W. G. Hol, Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 890.
- [317] L. de Haan, T. R. Hirst, Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review), *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 77.
- [318] R. G. Zhang, D. L. Scott, M. L. Westbrook, S. Nance, B. D. Spangler, G. G. Shipley, E. M. Westbrook, The three-dimensional crystal structure of cholera toxin, *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 563.

- [319] K. Kitadokoro, S. Kamitani, M. Miyazawa, M. Hanajima-Ozawa, A. Fukui, M. Miyake, Y. Horiguchi, Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of *Pasteurella multocida* toxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 5139.
- [320] T. Jank, X. Bogdanović, C. Wirth, E. Haaf, M. Spoerner, K. E. Böhmer, M. Steinemann, J. H. C. Orth, H. R. Kalbitzer, B. Warscheid, C. Hunte, K. Aktories, A bacterial toxin catalyzing tyrosine glycosylation of Rho and deamidation of Gq and Gi proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 1273.
- [321] I. Preuss, D. Hildebrand, J. H. C. Orth, K. Aktories, K. F. Kubatzky, *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways, *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 1174.
- [322] J. H. C. Orth, I. Preuss, I. Fester, A. Schlosser, B. A. Wilson, K. Aktories, *Pasteurella multocida* toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 7179.
- [323] J. H. C. Orth, I. Fester, P. Siegert, M. Weise, U. Lanner, S. Kamitani, T. Tachibana, B. A. Wilson, A. Schlosser, Y. Horiguchi, K. Aktories, Substrate specificity of *Pasteurella multocida* toxin for  $\alpha$  subunits of heterotrimeric G proteins, *FASEB J.* **2013**, *27*, 832.
- [324] B. A. Wilson, M. Ho, Recent insights into *Pasteurella multocida* toxin and other G-protein-modulating bacterial toxins, *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 1185.
- [325] K. Aktories, Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 487.
- [326] C. Favre-Guilmard, H. Zeroual-Hider, C. Soulard, C. Touvay, P.-E. Chabrier, G. Prevost, M. Auguet, The novel inhibitor of the heterotrimeric G-protein complex, BIM-46187, elicits anti-hyperalgesic properties and synergizes with morphine, *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *594*, 70.
- [327] M. A. Ayoub, Small molecules targeting heterotrimeric G proteins, *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *826*, 169.
- [328] A.-L. Schmitz, R. Schrage, E. Gaffal, T. H. Charpentier, J. Wiest, G. Hiltensperger, J. Morschel, S. Hennen, D. Häußler, V. Horn, D. Wenzel, M. Grundmann, K. M. Büllsbach, R. Schröder, H. H. Brewitz, J. Schmidt, J. Gomeza, C. Galés, B. K. Fleischmann, T. Tüting, D. Imhof, D. Tietze, M. Gütschow, U. Holzgrabe, J. Sondek, T. K. Harden, K. Mohr, E. Kostenis, A cell-permeable inhibitor to trap G $\alpha$ q proteins in the empty pocket conformation, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 890.
- [329] G. S. Ma, N. Aznar, N. Kalogriopoulos, K. K. Midde, I. Lopez-Sanchez, E. Sato, Y. Dunkel, R. L. Gallo, P. Ghosh, Therapeutic effects of cell-permeant peptides that activate G proteins downstream of growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E2602-10.
- [330] J. Hessling, M. J. Lohse, K.-N. Klotz, Peptide G protein agonists from a phage display library, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 961.
- [331] C. A. Johnston, J. K. Ramer, R. Blaesius, Z. Fredericks, V. J. Watts, D. P. Siderovski, A bifunctional Galphai/Galphas modulatory peptide that attenuates adenylyl cyclase activity, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5746.

- [332] W. W. Ja, O. Wiser, R. J. Austin, L. Y. Jan, R. W. Roberts, Turning G proteins on and off using peptide ligands, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 570.
- [333] R. J. Austin, W. W. Ja, R. W. Roberts, Evolution of class-specific peptides targeting a hot spot of the Galphas subunit, *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 1406.
- [334] S. W. Millward, S. Fiacco, R. J. Austin, R. W. Roberts, Design of cyclic peptides that bind protein surfaces with antibody-like affinity, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 625.
- [335] S. M. Howell, S. V. Fiacco, T. T. Takahashi, F. Jalali-Yazdi, S. W. Millward, B. Hu, P. Wang, R. W. Roberts, Serum stable natural peptides designed by mRNA display, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6008.
- [336] S. V. Fiacco, L. E. Kelderhouse, A. Hardy, Y. Peleg, B. Hu, A. Ornelas, P. Yang, S. T. Gammon, S. M. Howell, P. Wang, T. T. Takahashi, S. W. Millward, R. W. Roberts, Directed Evolution of Scanning Unnatural-Protease-Resistant (SUPR) Peptides for in Vivo Applications, *Chembiochem* **2016**, *17*, 1643.
- [337] S. A. Dai, Q. Hu, R. Gao, A. Lazar, Z. Zhang, M. von Zastrow, H. Suga, K. M. Shokat, A GTP-state specific cyclic peptide inhibitor of the GTPase Gas, *biorxiv preprint* **2020**, 10.1101/2020.04.25.054080.
- [338] F. S. Willard, D. P. Siderovski, The R6A-1 peptide binds to switch II of Galphai1 but is not a GDP-dissociation inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *339*, 1107.
- [339] S. V. Fiacco, R. W. Roberts, N-Methyl scanning mutagenesis generates protease-resistant G protein ligands with improved affinity and selectivity, *Chembiochem* **2008**, *9*, 2200.
- [340] M. C. Sweeney, A.-S. Wavreille, J. Park, J. P. Butchar, S. Tridandapani, D. Pei, Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains, *Biochemistry* **2005**, *44*, 14932.
- [341] C. M. Dundas, D. Demonte, S. Park, Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9343.
- [342] J. Zemleni, S. S. K. Wijeratne, Y. I. Hassan, Biotin, *Biofactors* **2009**, *35*, 36.
- [343] M. C. Sweeney, D. Pei, An improved method for rapid sequencing of support-bound peptides by partial edman degradation and mass spectrometry, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 218.
- [344] P. Wang, G. Arabaci, D. Pei, Rapid sequencing of library-derived peptides by partial edman degradation and mass spectrometry, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 251.
- [345] D. Imhof, A.-S. Wavreille, A. May, M. Zacharias, S. Tridandapani, D. Pei, Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 Src homology 2 domains. Critical roles of residues beyond the pY+3 position, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20271.
- [346] D. Pei, On-bead library screening made easier, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 3.
- [347] S. H. Joo, Q. Xiao, Y. Ling, B. Gopishetty, D. Pei, High-throughput sequence determination of cyclic peptide library members by partial Edman degradation/mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13000.

- [348] B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. Kent, Protein ladder sequencing, *Science* **1993**, 262, 89.
- [349] A. Thakkar, A.-S. Wavreille, D. Pei, Traceless capping agent for peptide sequencing by partial edman degradation and mass spectrometry, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5935.
- [350] P. EDMAN, Mechanism of the Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides, *Nature* **1956**, 177, 667.
- [351] P. Edman, Chemistry of amino acids and peptides, *Annu. Rev. Biochem.* **1959**, 28, 69.
- [352] T. Kühn, N. Sahoo, M. Nikolajski, B. Schlott, S. H. Heinemann, D. Imhof, Determination of hemin-binding characteristics of proteins by a combinatorial peptide library approach, *ChemBiochem* **2011**, 12, 2846.
- [353] J. H. Jones, Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary, *Journal of Peptide Science* **2006**, 12, 1.
- [354] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [355] E. Krieger, G. Vriend, YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations, *Bioinformatics* **2014**, 30, 2981.
- [356] E. Lee, M. E. Linder, A. G. Gilman, Expression of G-protein alpha subunits in Escherichia coli, *Meth. Enzymol.* **1994**, 237, 146.
- [357] E. McCusker, A. S. Robinson, Refolding of G protein alpha subunits from inclusion bodies expressed in Escherichia coli, *Protein Expr. Purif.* **2008**, 58, 342.
- [358] M. W. Knuth, R.R. Burgess (Eds.), Protein purification: Micro to Macro, produced in E. coli as inclusion bodies. *Purification of proteins in the denaturated state*, UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New York, **1987**.
- [359] R. R. Burgess, Refolding solubilized inclusion body proteins, *Meth. Enzymol.* **2009**, 463, 259.
- [360] T. Suzuki, K. Moriya, K. Nagatoshi, Y. Ota, T. Ezure, E. Ando, S. Tsunasawa, T. Utsumi, Strategy for comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using an insect cell-free protein synthesis system, *Proteomics* **2010**, 10, 1780.
- [361] R. J. Kimple, L. de Vries, H. Tronchère, C. I. Behe, R. A. Morris, M. Gist Farquhar, D. P. Siderovski, RGS12 and RGS14 GoLoco motifs are G alpha(i) interaction sites with guanine nucleotide dissociation inhibitor Activity, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 29275.
- [362] Z. Qian, P. Upadhyaya, D. Pei in *Methods in Molecular Biology* (Ed.: R. Derda), Springer New York, New York, NY, **2015**, pp. 39–53.
- [363] T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang, G. Fang, Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109, 5299.
- [364] T. Kühn, *Dissertation*, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, **2013**.
- [365] S. Eissler, M. Kley, D. Bächle, G. Loidl, T. Meier, D. Samson, Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different wavelengths, *J. Pept. Sci.* **2017**, 23, 757.



- [366] W. Lian, B. Jiang, Z. Qian, D. Pei, Cell-permeable bicyclic peptide inhibitors against intracellular proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9830.
- [367] C. Liang, M. A.M. Behnam, T. R. Sundermann, C. D. Klein, Phenylglycine racemization in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis: Stereochemical stability is achieved by choice of reaction conditions, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2325.
- [368] H. Ammer, R. Schulz, Opioid tolerance/dependence in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells is associated with a reduction in spontaneous stimulatory receptor activity, *FEBS Lett.* **2000**, *485*, 157.
- [369] H. Ammer, R. Schulz, Enhanced stimulatory adenylyl cyclase signaling during opioid dependence is associated with a reduction in palmitoylated Gs alpha, *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 993.
- [370] J. K. Horton, R. C. Martin, S. Kalinka, A. Cushing, J. P. Kitcher, M. J. O'Sullivan, P. M. Baxendale, Enzyme immunoassays for the estimation of adenosine 3',5' cyclic monophosphate and guanosine 3',5' cyclic monophosphate in biological fluids, *J. Immunol. Methods* **1992**, *155*, 31.
- [371] J. Antony, K. Kellershohn, M. Mohr-Andrä, A. Kebig, S. Prilla, M. Muth, E. Heller, T. Disingrini, C. Dallanocce, S. Bertoni, J. Schrobang, C. Tränkle, E. Kostenis, A. Christopoulos, H.-D. Höltje, E. Barocelli, M. de Amici, U. Holzgrabe, K. Mohr, Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity, *FASEB J.* **2009**, *23*, 442.
- [372] W. K. Seemann, D. Wenzel, R. Schrage, J. Etscheid, T. Bödefeld, A. Bartol, M. Warnken, P. Sasse, J. Klöckner, U. Holzgrabe, M. DeAmici, E. Schlicker, K. Racké, E. Kostenis, R. Meyer, B. K. Fleischmann, K. Mohr, Engineered Context-Sensitive Agonism: Tissue-Selective Drug Signaling through a G Protein-Coupled Receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2017**, *360*, 289.
- [373] J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696.
- [374] A. Jakalian, D. B. Jack, C. I. Bayly, Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation, *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1623.
- [375] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157.
- [376] S. Peherstorfer, H. H. Brewitz, A. A. Paul George, A. Wißbrock, J. M. Adam, L. Schmitt, D. Imhof, Insights into mechanism and functional consequences of heme binding to hemolysin-activating lysine acyltransferase HlyC from Escherichia coli, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 1964.
- [377] C. A. Bäuml, A. A. Paul George, T. Schmitz, P. Sommerfeld, M. Pietsch, L. Podsiadlowski, T. Steinmetzer, A. Biswas, D. Imhof, Distinct 3-disulfide-bonded isomers of tridegin differentially inhibit coagulation factor XIIIa: The influence of structural stability on bioactivity, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *201*, 112474.

- [378] E. M. Novoa, L. Ribas de Pouplana, X. Barril, M. Orozco, Ensemble Docking from Homology Models, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2547.
- [379] O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455.
- [380] A. A. Paul George, P. Heimer, E. Leipold, T. Schmitz, D. Kaufmann, D. Tietze, S. H. Heinemann, D. Imhof, Effect of Conformational Diversity on the Bioactivity of  $\mu$ -Conotoxin PIIIA Disulfide Isomers, *Marine Drugs* **2019**, *17*, 390.
- [381] N. Schneider, G. Lange, S. Hindle, R. Klein, M. Rarey, A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 15.
- [382] A. Volkamer, D. Kuhn, T. Grombacher, F. Rippmann, M. Rarey, Combining global and local measures for structure-based druggability predictions, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 360.
- [383] B. Nubbemeyer, *Masterarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, **2017**.
- [384] A. Pepanian, *Masterarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, **2019**.
- [385] M. Taniguchi, K.-i. Suzumura, K. Nagai, T. Kawasaki, T. Saito, J. Takasaki, K.-i. Suzuki, S. Fujita, S.-i. Tsukamoto, Structure of YM-254890, a Novel Gq/11 Inhibitor from Chromobacterium sp. QS3666, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4533.
- [386] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin, Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules, *Science* **1990**, *249*, 404.
- [387] F. Madeira, Y. M. Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan, P. Basutkar, A. R. N. Tivey, S. C. Potter, R. D. Finn, R. Lopez, The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636-W641.
- [388] M. Garcia-Marcos, P. Ghosh, M. G. Farquhar, GIV is a nonreceptor GEF for G alpha i with a unique motif that regulates Akt signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 3178.
- [389] M. Plach, K. Grasser, T. Schubert, MicroScale Thermophoresis as a Tool to Study Protein-peptide Interactions in the Context of Large Eukaryotic Protein Complexes, *BIO-PROTOCOL* **2017**, *7*.
- [390] E. Krieger, T. Darden, S. B. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend, Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space, *Proteins* **2004**, *57*, 678.
- [391] N. Homeyer, H. Gohlke, Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method, *Mol. Inform.* **2012**, *31*, 114.

## Anhang

Tabelle 21: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBOC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GDP, M = Nle.<sup>[137]</sup>

	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4		-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
<b>1</b>	A	T	G	H	Y	K	Q	Y	D	<b>52</b>	W	W	P	G	H	R	F	I	A
<b>2</b>	K	V	R	M	Y	E	E	I	E	<b>53</b>	T	R	P	W	H	H	R	M	A
<b>3</b>	Y	K	K	R	Y	Y	G	G	F	<b>54</b>	F	T	G	N	H	A	L	Q	D
<b>4</b>	I	K	F	P	Y	R	R	M	F	<b>55</b>	Y	D	G	R	H	L	R	P	E
<b>5</b>	D	W	N	R	Y	V	G	F	G	<b>56</b>	G	R	A	F	H	S	Y	P	E
<b>6</b>	N	W	A	H	Y	V	A	I	G	<b>57</b>	N	W	Q	N	H	P	F	A	G
<b>7</b>	A	W	L	S	Y	Y	H	N	G	<b>58</b>	F	K	H	N	H	A	S	F	G
<b>8</b>	P	K	A	T	Y	T	Q	R	G	<b>59</b>	Q	W	K	H	H	W	Y	Q	G
<b>9</b>	R	K	S	W	Y	L	F	A	H	<b>60</b>	G	F	W	R	H	P	Y	R	G
<b>10</b>	P	K	K	T	Y	R	W	A	H	<b>61</b>	M	Y	Y	Y	H	K	V	R	H
<b>11</b>	W	G	R	S	Y	S	H	P	H	<b>62</b>	M	Y	Y	Y	H	K	V	R	H
<b>12</b>	Q	T	A	Y	F	K	Q	Q	H	<b>63</b>	R	A	R	T	H	F	W	I	I
<b>13</b>	A	H	D	T	Y	R	F	G	I	<b>64</b>	Q	R	Y	L	H	L	L	R	I
<b>14</b>	W	P	K	N	Y	R	Q	K	I	<b>65</b>	F	H	Q	W	H	R	T	Q	K
<b>15</b>	W	P	F	A	Y	T	K	N	I	<b>66</b>	M	A	T	Y	H	P	Y	Q	K
<b>16</b>	F	D	P	S	Y	F	R	N	I	<b>67</b>	N	W	Q	A	H	V	V	S	K
<b>17</b>	G	P	Y	G	Y	S	W	R	I	<b>68</b>	E	T	L	H	H	P	V	V	K
<b>18</b>	N	M	M	V	Y	H	R	K	K	<b>69</b>	P	M	M	A	H	M	S	G	L
<b>19</b>	Y	Y	E	K	Y	T	R	T	K	<b>70</b>	M	N	L	Y	H	F	D	H	L
<b>20</b>	D	F	I	A	Y	A	N	W	K	<b>71</b>	R	R	L	V	H	H	R	V	L
<b>21</b>	P	I	A	R	Y	A	R	W	K	<b>72</b>	S	S	M	F	H	I	G	L	N
<b>22</b>	N	W	G	A	Y	L	D	G	L	<b>73</b>	F	K	N	P	H	P	Y	N	N
<b>23</b>	N	W	G	A	Y	L	D	G	L	<b>74</b>	H	K	E	M	H	S	E	I	M
<b>24</b>	P	H	W	M	Y	I	D	I	L	<b>75</b>	R	I	N	W	H	G	G	N	M
<b>25</b>	N	F	I	R	Y	A	H	K	L	<b>76</b>	R	K	W	T	H	D	G	R	M
<b>26</b>	W	F	Q	S	Y	W	G	N	L	<b>77</b>	L	M	D	Y	H	F	R	R	M
<b>27</b>	R	K	A	S	Y	I	H	Q	N	<b>78</b>	Q	R	A	R	H	D	S	F	Q
<b>28</b>	S	W	T	M	Y	P	F	R	N	<b>79</b>	I	R	Q	H	H	K	T	T	Q
<b>29</b>	T	F	D	R	Y	T	A	L	M	<b>80</b>	V	R	V	Y	H	H	N	G	R
<b>30</b>	Q	L	K	A	Y	V	A	S	M	<b>81</b>	S	S	H	V	H	K	F	M	R
<b>31</b>	Q	A	N	H	Y	M	W	Y	M	<b>82</b>	W	P	Y	D	H	R	F	M	R
<b>32</b>	V	L	K	F	Y	E	F	G	P	<b>83</b>	Q	M	F	S	H	M	H	P	R
<b>33</b>	G	E	P	R	Y	F	K	Y	P	<b>84</b>	P	D	R	D	H	H	K	Y	R
<b>34</b>	R	W	L	R	Y	L	R	Y	P	<b>85</b>	K	D	G	L	H	R	V	Y	R
<b>35</b>	S	I	N	Y	Y	F	S	M	Q	<b>86</b>	T	S	R	Y	H	M	H	R	I
<b>36</b>	F	S	R	R	Y	R	S	P	Q	<b>87</b>	W	V	Q	R	H	P	Y	A	V
<b>37</b>	S	Y	M	D	Y	F	H	A	R	<b>88</b>	W	F	Q	A	H	K	F	L	V
<b>38</b>	H	H	Y	N	Y	R	Y	T	R	<b>89</b>	P	M	R	G	H	I	M	Q	V
<b>39</b>	F	A	N	G	Y	R	W	Y	R	<b>90</b>	P	F	R	S	H	V	S	W	V
<b>40</b>	H	F	F	Y	Y	D	Q	Q	S	<b>91</b>	F	L	G	W	H	L	G	N	W
<b>41</b>	Q	I	L	K	Y	Y	N	F	T	<b>92</b>	V	T	I	P	H	W	S	M	W
<b>42</b>	N	W	I	K	Y	L	G	K	T	<b>93</b>	R	Y	H	I	H	E	Y	H	Y
<b>43</b>	D	G	G	G	Y	R	S	K	T	<b>94</b>	I	H	W	T	H	H	H	K	Y
<b>44</b>	W	P	S	H	Y	R	K	Q	T	<b>95</b>	H	E	W	V	H	G	F	L	Y
<b>45</b>	Y	L	K	H	Y	H	S	A	V	<b>96</b>	K	R	R	T	H	A	H	P	Y
<b>46</b>	R	H	D	H	Y	N	A	Y	V	<b>97</b>	K	K	S	K	H	P	W	R	Y
<b>47</b>	N	T	K	Q	Y	S	S	A	Y	<b>98</b>	R	Q	P	Y	C	P	Y	H	W
<b>48</b>	R	P	L	L	Y	H	K	I	Y	<b>99</b>	Y	Y	N	V	C	H	G	I	L
<b>49</b>	Q	D	H	P	Y	A	Q	K	Y	<b>100</b>	D	S	I	G	C	F	N	Q	F
<b>50</b>	N	W	R	N	Y	V	A	L	Y	<b>101</b>	F	Q	Y	Q	C	R	K	H	F
<b>51</b>	R	H	D	D	Y	S	Y	Q	D										

Tabelle 22: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GDP

No.	-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
1			D-Pro	D-Glu	His	Orn*	Fpa	D-Asn	D-Glu	D-Ala	
2			Ser	Gly	Arg	Orn*	D-Nal	D-Lys	Tyr	D-Nal	
3			D-Val	D-Lys	Orn	Orn*	Nle	Nle/Ile	D-Thr		
4			Ile	D-Leu	D-Asn	Orn*	D-Val	D-Nal	Trp		
5			Arg	D-Nal	D-Glu	Lys*	Orn	Trp	D-Val	D-Val	
6			D-Thr	Tyr	Gly	Lys*	Ile	Arg	Ser		
7			Asp	D-Leu	Ser	Lys*	D-Glu	D-Phe	Asp		
8			Orn	His	D-Phe	Lys*	Orn	D-Thr	His		
9		D-Ala	D-Thr	D-Ala	D-Leu	Orn*	D-Thr	Nle	Fpa		
10		D-Thr	Fpa	Ser	Fpa	Lys*	Ser	D-Asn	Gly		
11		D-Asn	D-Phe	Ser	D-Pro	Orn*	D-Asn	Arg	Gln	Asp	
12			D-Nal	D-Phe	D-Pro	Orn*	D-Pro	D-Lys	D-Pro	Tyr	

Tabelle 23: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GMPPNP

No.	-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
1		D-Val	Arg	Ile	D-Thr	Orn*	Fpa	Orn	D-Thr		
2		D-Ala	D-Nal	Gly	D-Ala	Lys*	D-Lys	Asp	D-Phe		
3			Asp	Ile	Ile	Orn*	Tyr	D-Glu	Nle	D-Phe	
4			Ala	Phg	D-Ala	Orn*	D-Glu	D-Nal	Ala		
5			Orn	Gly	D-Leu	Lys*	D-Asn	D-Glu	D-Glu	Arg	
6			D-Val	His	Ile	Lys*	D-Glu	D-Glu	D-Glu		
7			Ala	His	Arg	Lys*	D-Nal	D-Lys	D-Glu		
8			D-Phe	His	Tyr	Lys*	D-Ala	Fpa	Ile	Ala	
9		D-Lys	D-Ala	D-Lys	D-Val	Lys*	Fpa	Ala	D-Thr	Tyr	
10			Ile	His	Orn	Lys*	D-Glu	Phg	D-Thr	D-Thr	
11		Ser	Ser	Nle	D-Val	Orn*	D-Val	D-Thr	Gly		
12			D-Ala	D-Leu	Ser	Orn*	Tyr	D-Thr	Arg		
13		D-Nal	Ile	D-Phe	D-Val	Orn*	Ala	Arg	D-Phe	D-Ala	
14		Tyr	D-Asn	D-Ala	Asp	Lys*	Gly	Fpa	D-Lys		
15			Asp	Ala	Gly	Orn*	Nle	D-Phe	Fpa		

Tabelle 24: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gas·GDP

No.	-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
1			D-Phe	Phg	D-Phe	Lys*	D-Val	Ser	Orn	Nle	
2			Ala	Ala	Nle	Orn*	D-Asn	Ala	D-Nal		
3			Fpa	Trp	D-Thr	Lys*	Tyr	D-Leu	Orn		
4			D-Lys	D-Lys	D-Leu	Orn*	Asp	D-Ala	D-Nal		
5			Fpa	D-Lys	D-Val	Orn*	D-Asn	D-Thr	D-Val		
6			D-Phe	D-Ala	D-Pro	Lys*	Orn	D-Val	D-Val		
7			D-Ala	Nle	D-Val	Orn*	Gln	D-Lys	Nle	His	
8			Fpa	Ile	D-Ala	Lys*	Gly	D-Ala	D-Lys	Ala	
9			D-Leu	Gln	D-Thr	Lys*	Ala	D-Asn	D-Lys		
10			Ala	Arg	Asp	Orn*	D-Val	Orn	Ser	Ser	
11		Ile	D-Lys	Ser	D-Val	Orn*	Gln	Gln	D-Ala		
12			Ile	Nle	D-Val	Lys*	D-Lys	D-Ala	Gly		
13			Fpa	Ala	D-Pro	Lys*	D-Thr	D-Lys	D-Val		
14			D-Ala	Ile	Ile	Lys*	D-Lys	Gln	Phg	Gln	
15			D-Ala	Nle	Fpa	Lys*	Gln	Gly	D-Leu		
16		Ala	D-Ala	D-Lys	D-Glu	Lys*	Orn	Fpa	D-Val		

Tabelle 25: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gas·GMPPNP

No.	-5	-4	-3	-2	-1	Lys/Orn	+1	+2	+3	+4	+5
1			Phg	Ala	Gln	Orn*	Ala	Nle	D-Phe		
2			D-Leu	D-Phe	Ala	Lys*	D-Leu	Ala	Ser		
3			Tyr	D-Lys	Ser	Orn*	D-Leu	Nle	Ser		
4		D-Leu	Gln	Gln	D-Thr	Orn*	Phg	D-Phe	Gln		
5			Ile	D-Phe	Gly	Lys*	Ala	Orn	Ser		
6			D-Phe	Ala	Ser	Orn*	Tyr	Phg	Orn	D-Pro	
7			Ala	Tyr	Trp	Lys*	Nle	Trp	Ala		
8			D-Ala	Ile	Nle	Orn*	Asp	Arg	D-Phe		
9		Ser	D-Pro	D-Thr	D-Phe	Lys*	D-Ala	D-Pro	Fpa	D-Phe	
10			Fpa	Ser	Ser	Lys*	D-Lys	Tyr	D-Pro	D-Asn	
11			D-Ala	Tyr	Tyr	Orn*	Gln	Ile	Ala		
12			Ala	Ala	Gln	Orn*	D-Thr	Tyr	Ala	D-Lys	
13			Asp	D-Lys	Nle	Orn*	D-Ala	Fpa	D-Leu	D-Leu	
14		D-Val	D-Glu	Arg	D-Leu	Lys*	Gly	Tyr	Gly	D-Lys	
15			Ser	D-Lys	D-Val	Lys*	Asp	Phg	D-Nal		
16			Ile	D-Asn	Arg	Lys*	Nle	Nle	D-Ala	Gly	
17			Asp	Ile	Fpa	Orn*	D-Val	Arg	D-Val		

## Abkürzungsverzeichnis

Alle Abkürzungen für Aminosäuren und entsprechende Derivate wurden gemäß den Empfehlungen des *Nomenclature Committee of IUB* (NC-IUB) und des *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) verwendet, wobei die Aminosäuren L-konfiguriert sind, sofern es nicht anders angegeben ist.<sup>[353]</sup>

AC	Adenylatzyklase
AcOH	Essigsäure
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Ado	Amino-3,6-dioxaoctansäure
AGS	Aktivatoren des G-Protein-Signalwegs
Aloc	Allyloxycarbonyl
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AKT	Proteinkinase B
β2AR	β2 adrenerger Rezeptor
BCIP	Dinatrium-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
Btn	Biotin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDC42	Zelldivisionszyklus 52
Cf	5(6)-Carboxyfluorescein
CGN	Common Gα Numbering
clogP	1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
CPP	zellpenetrierendes Peptid
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat
COX2	Cyclooxygenase 2
CTX	Choleratoxin
CXCR4	Chemokinrezeptor 4

---

cycGiBP	<i>cyclic Gai binding peptide</i>
cycPRP	<i>cyclic protease resistant peptide</i>
Da	Dalton
DADLE	[Tyr-D-Ala <sup>2</sup> -Gly-Phe-D-Leu <sup>5</sup> ]Enkephalin
DAG	Diacylglycerin
Dap	Diaminopropansäure
DAPLE	Dishevelled-assoziiierendes Protein mit hoher Frequenz von Leucinen
DCM	Dichlormethan
DEA	Diethylamin
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	extrazellulärer Loop
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
ESI-MS	Elektronensprayionisierungsmassenspektrometrie
et al.	und andere (lateinisch <i>et alii</i> )
EtOH	Ethanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	fötales Rinderserum, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FmocOSU	N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-succinimid

---

Fpa	<i>p</i> -Fluorophenylalanin
FR	FR900359
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
Fsk	Forskolin
FT-ICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
GAFF	<i>General Amber Force Field</i>
GAP	GTPase-beschleunigendes Protein
GBA	<i>Gα-binding and activating</i>
GBAS-1	GBA and SPK containing-1
GDI	Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GEM	Guaninnukleotidautauschmodulator
ggf.	gegebenenfalls
GIRK	<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels</i>
GIV	<i>Gα-interacting, vesicle-associated protein</i>
GMPPNP	Guanyl-5'-(β,γ-imino)triphosphat
GNAI2	Gai2-codierendes Gen
GNAL	Gαolf-codierendes Gen
GNAS	Gαs-codierendes Gen
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPR	G-Protein-regulierendes Motiv
GoLoco	Guanosin-5'-O-(3-thio)-triphosphat
GRK	G-Protein-regulierte Rezeptorkinase
GSP	<i>Gas-binding peptide</i>
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat
GTPγS	Guanosin 5'-O-[γ-thio]triphosphat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	(2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HCCA	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>



---

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLT	Hitzelabiles Enterotoxin
HM	Gai1·GDP-Homologiemodell (erstellt von Dr. A. A. Paul George)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTRF	zeitaufgelöster Förster-Resonanz-Energie-Transfer
HTS	Hochdurchsatzscreening
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICL	intrazellulärer Loop
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,3,5-triphosphat
Ipa	Isophthalsäure
Iso	Isoproterenol
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
LC	Flüssigchromatographie
LC-ESI-MS	Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
linGiBP	<i>linear Gai binding peptide</i>
MAR4/A1	muscarinischer Acetylcholinreceptor M4-Adenosinreceptor A1-Chimera
MALDI-MS	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisierung-Massenspektrometrie
MAPK	Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Signalweg
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MD-	Molekulardynamik-
MDM2	E3 Ubiquitin-Proteinligase Mdm2 ( <i>Mouse double minute 2 homolog</i> )
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MEK	Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Kinase
mGSP	gereiftes ( <i>matured</i> ) GSP
MMPBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie

---

MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
Nal	2-Naphthylalanin
n.b.	nicht bindend
n.d.	nicht bestimmt
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer</i>
NG	Neuroblastoma x glioma
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NHS-Biotin	Biotin- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
NicOSU	Nicotinsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
Nle	Norleucin
NMM	N-Methylmorpholin
Orn	Ornithin
p53	Tumor protein p53 oder Phosphoprotein 53
PAK	p21-aktivierte Kinase
PaTox	<i>Photobacterium azymobioticum</i> Proteintoxin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDE	Phosphodiesterase
PED	partieller Edman-Abbau
PEG	Polyethylenglykol
Ph	Phenyl-
Phg	Phenylglycin
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PITC	Phenylisothiocyanat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin

---

POVRay	<i>Persistence of Vision Raytracer Pty. Ltd.</i>
PPI	Protein-Protein-Interaktion(en)
PTM	posttranslationale Modifikation
PTX	Pertussistoxin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
OBOC	<i>One-bead-one-compound</i>
OBTC	<i>One-bead-two-compound</i>
OtBu	<i>tertiär</i> -butyl
RAC	RAS-related c3 botulinum toxin substrate 1
RAPID	<i>Random nonstandard Peptide Integrated Discovery</i>
Ref	Referenz
RGS	Regulatoren des G-Protein-Signalwegs
Ric	<i>Resistance to inhibitors of cholinesterase 8</i>
RMSD	<i>root-mean square deviation</i>
Ro5	<i>Rule of five</i>
ROCK	<i>Rho-associated coil-coil containing protein kinase</i>
RP-HPLC	Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
SA	Streptavidin
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehungen
SD	Standardabweichung
SDDC	Natriumdimethyldithiocarbamat·XH <sub>2</sub> O
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHIP	Inositolphosphatase
SHP-1/2	Protein-Tyrosin-Phosphatasen 1/2
SLE	systemisches Lupus erythematodes
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
SPS	Flüssigphasenpeptidsynthese
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
SSE	Sekundärstrukturelement
SUPR	<i>scanning unnatural-protease-resistant</i>
Tat	trans-activator of transcription

tBu	<i>tertiär</i> -Butyl
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TM	Transmembrandomäne
TMP	2,4,6-Trimethylpyridin
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
u.a.	unter anderem
UV-VIS	Ultraviolett-sichtbares Licht
v.a.	vor allem
VDDC	<i>voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel</i>
YASARA	<i>Yet Another Scientific Artificial Reality Application</i>
YM	YM-254890
z.B.	zum Beispiel
2Nal	2-Naphthylalanin

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über mögliche Modifikationen innerhalb der Peptidkette. ....	5
Abbildung 2: Chemische Struktur von Cyclosporin A.....	7
Abbildung 3: Beziehungen zwischen den G $\alpha$ -Untereinheiten von Säugetieren (Mensch, Maus). 8	
Abbildung 4: Signaltransduktion eines heterotrimeren G-Proteins. ....	10
Abbildung 5: Ausgewählte Effektor-Signalwege abgeleitet von Lappano et al. <sup>[13]</sup> .....	11
Abbildung 6: Struktur von G $\alpha$ -Proteinen. ....	12
Abbildung 7: G $\alpha$ -Kontakte zu gebundenen Nukleotiden. ....	14
Abbildung 8: Switch-Regionen der G $\alpha$ -Proteine. ....	15
Abbildung 9: Kristallstruktur eines G $\beta\gamma$ -Dimers.....	16
Abbildung 10: Strukturelle Merkmale von G $\alpha$ -Proteinen. ....	18
Abbildung 11: G $\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche. ....	19
Abbildung 12: G $\alpha$ -G $\beta\gamma$ -Interaktionsfläche. ....	20
Abbildung 13: G $\alpha$ -AC-Interaktionsfläche.....	21
Abbildung 14: G $\alpha$ -Hilfsprotein-Interaktionsfläche.....	22
Abbildung 15: Beteiligung der Gai/s-Subfamilien bei verschiedenen Erkrankungen. ....	24
Abbildung 16: Naturstoffe, die an der G $\alpha$ -GPCR-Interaktionsfläche binden. ....	28
Abbildung 17: Chemische Strukturen von Suramin und dessen Analoga NF449 und NF503 ....	29
Abbildung 18: Inhibition der GTPase-Aktivität durch bakterielle Toxine. ....	30
Abbildung 19: Chemische Strukturen der Imidazopyrazin-Derivate BIM-46174 und BIM-46187, von 0990 und 4630, sowie Aurintricarbonsäure und dem Suramin-Derivat NF023 .....	31
Abbildung 20: Chemische Strukturen von mRNA-Display- und RAPID-abgeleiteten Peptiden, die die G $\alpha$ -Hilfsprotein-Interaktionsfläche adressieren. ....	35
Abbildung 21: Schematische Darstellung des SA-basierten Screeningansatzes.. ....	37
Abbildung 22: Schematische Darstellung eines MALDI-MS-Spektrums einer Peptidleiter aus einem partiellen Edman-Abbau (PED). ....	39
Abbildung 23: SDS-PAGE der rekombinant exprimierten und gereinigten Gai1/s-GDP-Proteine. .....	50
Abbildung 24: Verwendete bizyklische Peptidbibliothek von Lian et al. <sup>[92]</sup> und Upadhyaya et al. <sup>[93]</sup> .....	51
Abbildung 25: Ableitung der Konsensussequenz für Gai1-Binder basierend auf dem OBOC- Peptidbibliotheksscreening mit Gai1-GDP. ....	67
Abbildung 26: MST-Ergebnisse und Sequenzalignment der besten Gai1-GDP-Binder. ....	70
Abbildung 27: MST-Ergebnisse von Cf-KB-752 und Konkurrenzexperiment von Peptid <b>1 (GPM- 1)</b> und Cf-KB-752. ....	71
Abbildung 28: MST-Ergebnis von 50 nM Cf- <b>GPM-1 Y5A</b> mit Gai1 und Gas. ....	73
Abbildung 29: Ableitung der <b>GPM-1</b> -Derivate aus der <b>GPM-1</b> -Struktur. ....	74
Abbildung 30: MST-Bindungskurven von 50 nM FITC- <b>GPM-1b</b> und 50 nM Cf- <b>14</b> mit Gai1 und Gas. ....	78
Abbildung 31: SPR-abgeleitete Bindungskurven von immobilisiertem Btn- <b>GPM-1</b> , Btn- <b>GPM-1c</b> , und Btn- <b>15</b> mit Gai1 und Gas als Analyten. ....	80
Abbildung 32: Schematische Darstellung der einzelnen Zustände innerhalb der Aktivitätsstudien an NG108-15-Membranpräparationen. ....	81
Abbildung 33: Funktionelle Untersuchungen von <b>GPM-1</b> und dessen Derivaten. ....	84

---

Abbildung 34: Computerbasierte Peptidstrukturen nach 100 ns-MD-Simulation .....	85
Abbildung 35: Strukturalignment zwischen Gai-Strukturen und gebundenen Modulatoren.....	86
Abbildung 36: Gai-Peptid-Wechselwirkungen.....	88
Abbildung 37: Gas-Peptid-Wechselwirkungen.....	90
Abbildung 38: Visuelle Bewertung der Änderung der GDP-Bindungsaffinität bei Bindung von <b>GPM-1c</b> an Gai und Gas. ....	91
Abbildung 39: Computergestützt vorhergesagte Bindungsstellen auf Gai1 und Gas. ....	92
Abbildung 40: Schematische Darstellung der GEM-Aktivität von <b>GPM-1c</b> und <b>GPM-1d</b> . ....	93
Abbildung 41: Screeningexperiment mit der OBTC-Peptidbibliothek.....	96
Abbildung 42: Ableitung von Konsensussequenzen aus den OBTC-Peptidbibliotheksscreenings mit Gai1 und ausgewählte Hits.. ....	97
Abbildung 43: Ableitung von Konsensussequenzen aus den OBTC-Peptidbibliotheksscreenings mit Gas und ausgewählte Hits. ....	98
Abbildung 44: Funktionelle Untersuchungen der OBTC-Hits.....	102

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prominente zellpenetrierende Peptide (CPPs) und deren Ursprung.....	4
Tabelle 2: Auswahl von Gai/s-Proteinstrukturen aus der Protein Data Bank (PDB).....	13
Tabelle 3: Gai/s-bindende Peptide aus Hochdurchsatzverfahren.....	33
Tabelle 4: Eingesetzte Chemikalien/Reagenzien und Lösungsmittel. ....	41
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Puffer/Lösungen .....	44
Tabelle 6: Allgemeine Ausrüstung und Geräte .....	46
Tabelle 7: Verwendete Gradienten bei der analytischen RP-HPLC.....	47
Tabelle 8: Verhältnisse der Reagenzien beim partiellen Edman-Abbau.....	53
Tabelle 9: Volumina von PITC in Pyridin entsprechend des PITC-NicOSU-Verhältnisses.....	54
Tabelle 10: Aminosäuren in den kombinatorischen Positionen der OBOC-Peptidbibliothek und deren Massen im Peptid mit den entsprechenden codierenden Peaks.....	55
Tabelle 11: Aminosäuren in den kombinatorischen Positionen der OBTC-Peptidbibliothek und deren hochaufgelösten Massen im Peptid mit den entsprechenden codierenden Peaks.....	56
Tabelle 12: Analytische Charakterisierung der ausgewählten Hits und KB-752.....	68
Tabelle 13: Analytische Charakterisierung der 13 Cf-markierten Peptide und Cf-KB-752.....	69
Tabelle 14: Multiples Sequenzalignment der 13 selektierten Hits mittels Clustal Omega O.....	72
Tabelle 15: Multiples Alignment von <b>GPM-1</b> mit KB-752, GSP und den GEM-Motiven der GEM-Proteine, erstellt mit Clustal Omega O.....	73
Tabelle 16: Analytische Charakterisierung der <b>GPM-1</b> -Derivate und des CPP-Peptids <b>15</b> .....	77
Tabelle 17: Analytische Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten <b>GPM-1</b> -Derivate und des CPP-Peptids <b>15</b> .....	78
Tabelle 18: Analytische Charakterisierung der biotinylierten <b>GPM-1</b> -Derivate und des CPP-Peptids <b>15</b> .....	79
Tabelle 19: Mittlere MMPBSA-Bindungsenergien.....	89
Tabelle 20: Analytische Charakterisierung der ausgewählten Hits aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening. ....	101
Tabelle 21: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBOC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GDP.....	136
Tabelle 22: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GDP .....	137
Tabelle 23: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gai1·GMPPNP.....	137
Tabelle 24: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gas·GDP .....	138
Tabelle 25: Identifizierte Hitsequenzen aus dem OBTC-Peptidbibliotheksscreening mit Gas·GMPPNP.....	138

## Schemataverzeichnis

Schema 1: Schematischer Ablauf der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) unter Verwendung der Fmoc-basierten Schutzgruppenstrategie. ....	3
Schema 2: Zyklisierung von ATP ( <b>2</b> ) zu cAMP ( <b>3</b> ) katalysiert durch die Adenylatzyklase (AC). ..	11
Schema 3: Syntheschema für <b>GPM-1b</b> .....	75
Schema 4: Syntheschema für <b>GPM-1d (A)</b> und <b>GPM-1e (B)</b> .. ..	76
Schema 5: Exemplarisches Syntheschema für die OBTC-Hits am Beispiel von Peptid <b>17</b> ..	100



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne allen danken, die mich die letzten Jahre unterstützt, an mich geglaubt und mir die Fertigstellung dieser Promotionsarbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Diana Imhof für das Vertrauen, die enge Betreuung und Unterstützung, die gesammelten Erfahrungen, sowie für die Vergabe des spannenden Forschungsthemas. Zudem möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir Forschungsvorhaben in den Laboratorien von Kooperationspartnern sowie Konferenzzreisen ermöglicht hat.

Herrn Prof. Matthias Geyer (Universität Bonn) danke ich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit sowie die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe SPR- und MST-basierte Bindungsstudien durchzuführen. Seinem Mitarbeiter Dr. Jonas Möcking möchte ich zudem für seine Hilfsbereitschaft danken. Herrn Prof. Dr. Dirk Menche und PD. Dr. Marianne Engeser (beide Universität Bonn) danke ich für Ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission. Außerdem möchte ich PD. Dr. Marianne Engeser danken, dass ich über mehrere Jahre bei ihr in der Abteilung Massenspektrometrie messen durfte. In diesem Zusammenhang möchte ich vor allem auch Frau Christine Sondag für ihre Unterstützung bei Fragestellungen, ihre Erklärungen und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Dehua Pei (Ohio State University, OH, Columbus, USA) danke ich für die Möglichkeit, einen Monat in seiner Gruppe arbeiten und lernen zu dürfen sowie seine fachliche Unterstützung im Kontext der Peptidbibliotheksscreenings und CPP-Sequenzen. Seinen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen Dr. Curran A. Rhodes, Dr. Jin Wen, Dr. Hui Liao, Dr. Ziqing Qian, Ameritendu S. Koley, Ashweta Sahni und Heba Salim danke ich für ihre fachliche Unterstützung und die unvergessliche Zeit in Columbus.

Prof. Dr. Hermann Ammer (LMU München) danke ich für die tolle Kooperation bei der Durchführung des zellfreien Aktivitätstests, die wissenschaftlichen Diskussionen, für eine tolle Woche in München und jede Menge unterhaltsamer Telefonate. Durch ihn und seinen Mitarbeiter Dr. Maximilian Muehlhaupt konnten wir wichtige Erkenntnisse über die funktionelle Aktivität unserer Peptide erhalten. Prof. Dr. Evi Kostenis (Universität Bonn) und ihren Mitarbeiterinnen Dr. Suvi Annala, Eva Marie Pfeil und Ulrike Rick danke ich für die Durchführung des zellbasierten Experiments und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Michael Famulok und PD. Dr. Anton Schmitz (beide Universität Bonn) möchte ich für die Bereitstellung des MST-Messgerätes danken. Dr. Markus Pietsch und Paul Sommerfeld (Universitätsklinikum Köln) danke ich für tolle Kooperation und Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen. Zudem möchte ich PD. Dr. Jan Matthes und Nour Katnahji (Universitätsklinikum Köln) für den angenehmen Start in eine gute Kooperation danken. Dr. Maryam A. Shetab Bousheri (Universität Bonn) danke ich für die Durchführung des MTT-Tests. Bei Dr. Kornelia Hampel (Biaffin GmbH & Co KG) und Dr. Vanya Uzunova (Cytiva Europe GmbH) möchte ich mich für die Unterstützung bei den SPR-Messungen und der Evaluation der Ergebnisse bedanken.

Meine Forschungsvorhaben und Konferenzreisen wurden von verschiedenen Geldgebern unterstützt, bei denen ich mich an dieser Stelle noch einmal besonders bedanken möchte. Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung im Rahmen der Forschergruppe FOR2372 und innerhalb IM 97/14-1. Außerdem möchte ich mich bei der Bonner Universitätsstiftung und ihrer Mitarbeiterin Frau Antonia Streit bedanken, welche mir meinen Forschungsaufenthalt in den USA und einhergehend eine enorme Weiterentwicklung des Projektes ermöglicht haben. Des Weiteren möchte ich mich bei der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) für ein Konferenzreisestipendium bedanken.

Dem Bonner Graduiertenzentrum und der Graduiertenschule BIGS Drugs danke ich für ein tolles Workshopangebot, den wissenschaftlichen Austausch und die willkommene Abwechslung.

Ein besonderer Dank gilt auch Marion Schneider und Dr. Marc Sylvester (beide Universität Bonn) für ihre Unterstützung bei unterschiedlichen massenspektrometrischen Fragestellungen. Besonders Marion möchte ich für die zahlreichen witzigen und lehrreichen Stunden danken. Ich danke Dir, dass ich so vieles von Dir lernen durfte.

Bei Dr. Ajay Abisheck Paul George (BioSolveIT GmbH/Universität Bonn) bedanke ich mich für die Durchführung der computerbasierten Analysen, seiner Unterstützung zu jeder Zeit und seinen wissenschaftlichen Input. Durch ihn und zahlreiche studentische Projekte konnte ich einiges über die bioinformatischen Abläufe lernen. Bei Dr. Toni Kühl bedanke ich mich für seine Unterstützung und seine Einarbeitung in das „G-Proteinprojekt“, sowie die Etablierung der G-Proteinexpression und -reinigung. Bei Anna Pepanian möchte ich mich für die tolle Zeit in unserer G-Gang, ihre Hilfsbereitschaft, die Optimierung der G-Proteinexpression und -reinigung in Zusammenarbeit mit Dr. Toni Kühl und die Bereitstellung von G $\alpha$ -Proteinproben bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Sabrina Linden („Frau Mucki“), die mich tatkräftig über meine gesamte Promotionszeit unterstützt hat und mir durch die Expression und Reinigung der G $\alpha$ -Proteine diese Arbeit erst ermöglicht hat. Zudem möchte ich mich auch bei allen Studierenden bedanken, die als temporäre „G-Gang“-Mitglieder meine Arbeit bereichert und tatkräftig unterstützt haben.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Imhofs, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre. Danke an Ajay, Amelie, Anna, Ben, Charlotte, Francèl, Gulshan, Marie, Max, Milena, Pascal, Rahma, Sabrina, Sam, Simona, Sven, Thomas, Tobias, Toni und Yomnah.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank auch meiner Familie und meinen Freunden für ihren emotionalen Beistand und den bedingungslosen Rückhalt. Ohne euch wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen! Ich danke meinen Eltern, Schwestern, Schwagern, meiner Nichte, meinen Neffen, meinen Großeltern und meiner Patentante sowie der großen Familie meines Freundes für die Ermunterung und willkommenen Ablenkungen. In der letzten Zeit konnte ich mich vor allem auch auf meine „Wendys und ihre Mustangs“, Martha, Sabrina, Tristan und Maja verlassen.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank dem für mich wichtigsten Menschen. Lieber Thomas, ich bin sehr dankbar, dass ich Dich kennenlernen durfte. Ich danke Dir für deine Unterstützung, die gemeinsame Zeit und deine stets fröhliche Art. Ich freue mich schon sehr auf unsere gemeinsame Zukunft. Danke für alles!

## Veröffentlichungen

### Artikel

#### eingereicht:

- 1) **B. Nubbemeyer**, A. A. Paul George, T. Kühl, A. Pepanian, M. S. Beck, R. Maghraby, M. Shetab Boushehri, M. Muehlhaupt, E. M. Pfeil, S. K. Annala, D. Pei, H. Ammer, D. Imhof, Targeting of Gai/s Proteins by Peptidic Guanine Nucleotide Exchange Modulators, eingereicht.

#### veröffentlicht:

- 2) **B. Nubbemeyer**, A. Pepanian, A. A. Paul George, D. Imhof, Strategies Towards Targeting Gai/s Proteins: Scanning of Protein-Protein Interactions Sites to Overcome Inaccessibility, *ChemMedChem* **2021**, doi: 10.1002/cmcd.202100039.
- 3) T. Schmitz, A. A. Paul George, **B. Nubbemeyer**, C. A. Bäuml, T. Steinmetzer, O. Ohlenschläger, A. Biswas, D. Imhof, NMR-Based Structural Characterization of a Two-Disulfide-Bonded Analogue of the FXIIIa Inhibitor Tridegin: New Insights into Structure-Activity Relationships, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 880.
- 4) R. Reher, T. Kühl, S. Annala, T. Benkel, D. Kaufmann, **B. Nubbemeyer**, J. P. Odhiambo, P. Heimer, C. A. Bäuml, S. Kehraus, M. Crüsemann, E. Kostenis, D. Tietze, G. M. König, D. Imhof, Deciphering specificity determinants for FR900359-derived Gαq inhibitors based on computational and structure-activity studies, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1634-1643.
- 5) P. Rabe, J. Rinkel, E. Dolja, T. Schmitz, **B. Nubbemeyer**, T. H. Luu, J. S. Dickschat, Mechanistic investigations on two bacterial diterpene cyclases: Spiroviolene Synthase and Tsukubadiene Synthase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 2776-2779.
- 6) P. Rabe, J. Rinkel, **B. Nubbemeyer**, T. G. Köllner, F. Chen, J. S. Dickschat, Terpene Cyclases from Social Amoebae, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 15420-15423.

### Poster

- 1) **B. Nubbemeyer**, A. Pepanian, A. A. Paul George, T. Kühl, M. S. Beck, R. Maghraby, M. A. Shetab Boushehri, M. Muehlhaupt, E. M. Pfeil, S. K. Annala, D. Pei, H. Ammer, D. Imhof, Targeting of Gai/s Protein by Peptidic Modulators, *Advances in Chemical Biology* **2021**, Online Konferenz.
- 2) **B. Nubbemeyer**, T. Kühl, R. Reher, A. A. Paul George, M. Mahgoub, S. Annala, T. Benkel, D. Kaufmann, S. Kehraus, M. Crüsemann, E. Kostenis, D. Tietze, G. M. König, D. Imhof, Exploring the specific interaction of FR900359 with the Gαq subfamily, *German Peptide Symposium 2019*, Köln, Deutschland.
- 3) R. Reher, T. Kühl, **B. Nubbemeyer**, S. Annala, T. Benkel, D. Kaufmann, S. Kehraus, M. Crüsemann, E. Kostenis, D. Tietze, G. M. König, D. Imhof, Deciphering specificity determinants for FR900359-derived Gαq inhibitors based on computational and structure-activity studies, *European Peptide Symposium 2018*, Dublin, Irland.