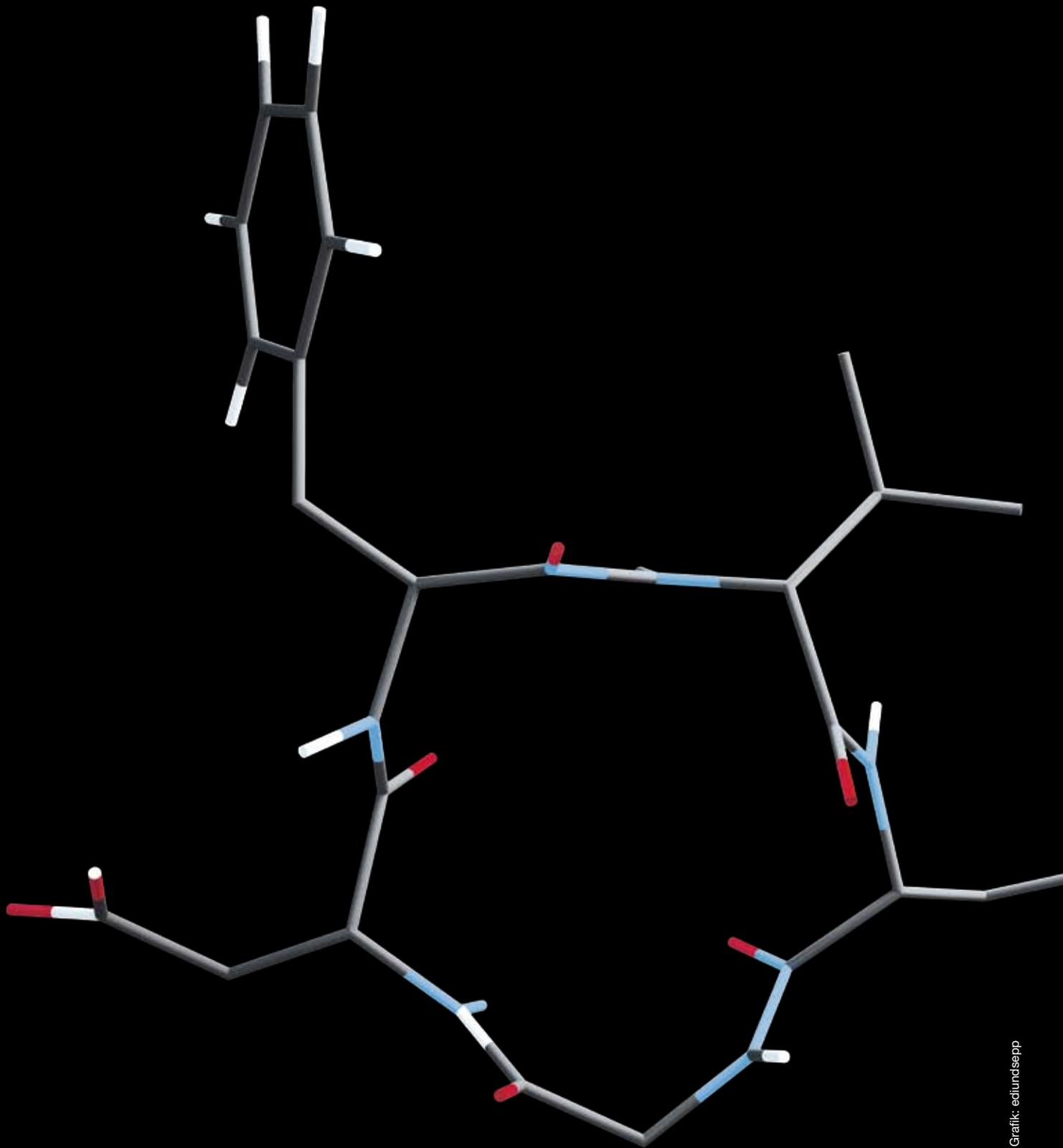


Link

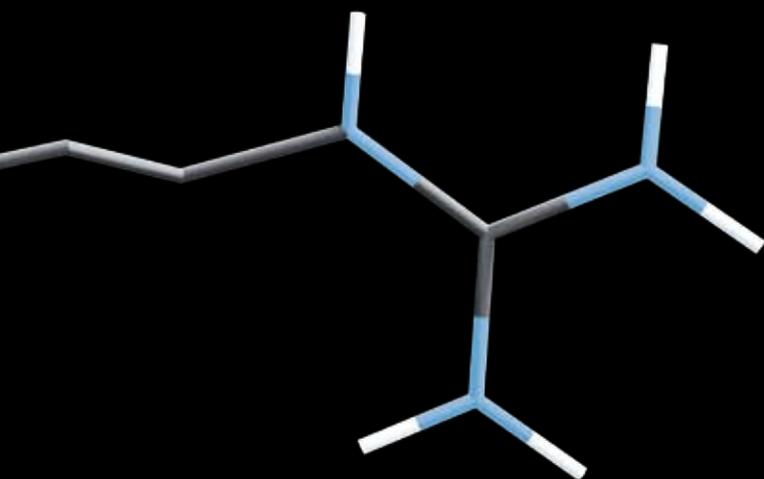
[www.org.chemie.tu-muenchen.de](http://www.org.chemie.tu-muenchen.de)



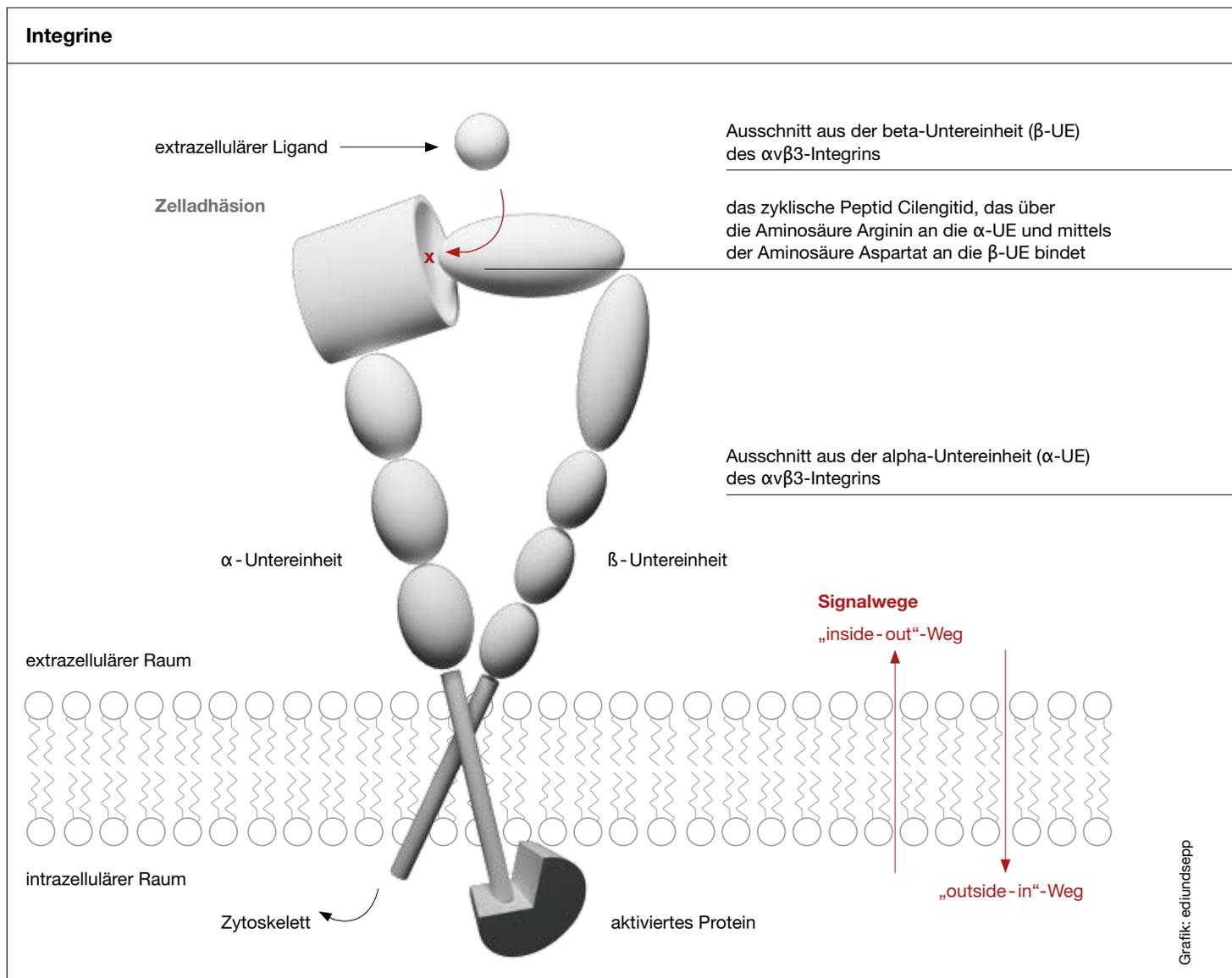
Grafik: eciundsepp

# Peptid-Puzzle

Aufs Äußerste reduziert, lässt sich die Arbeit von Professor Horst Kessler mit zweimal drei Buchstaben beschreiben. RGD und NMR sind die Basis für sein „konformationsbasiertes Design“ von Proteinen und Peptiden. Eines der Ergebnisse: ein in wenigen Jahren marktreifes Medikament gegen Krebs



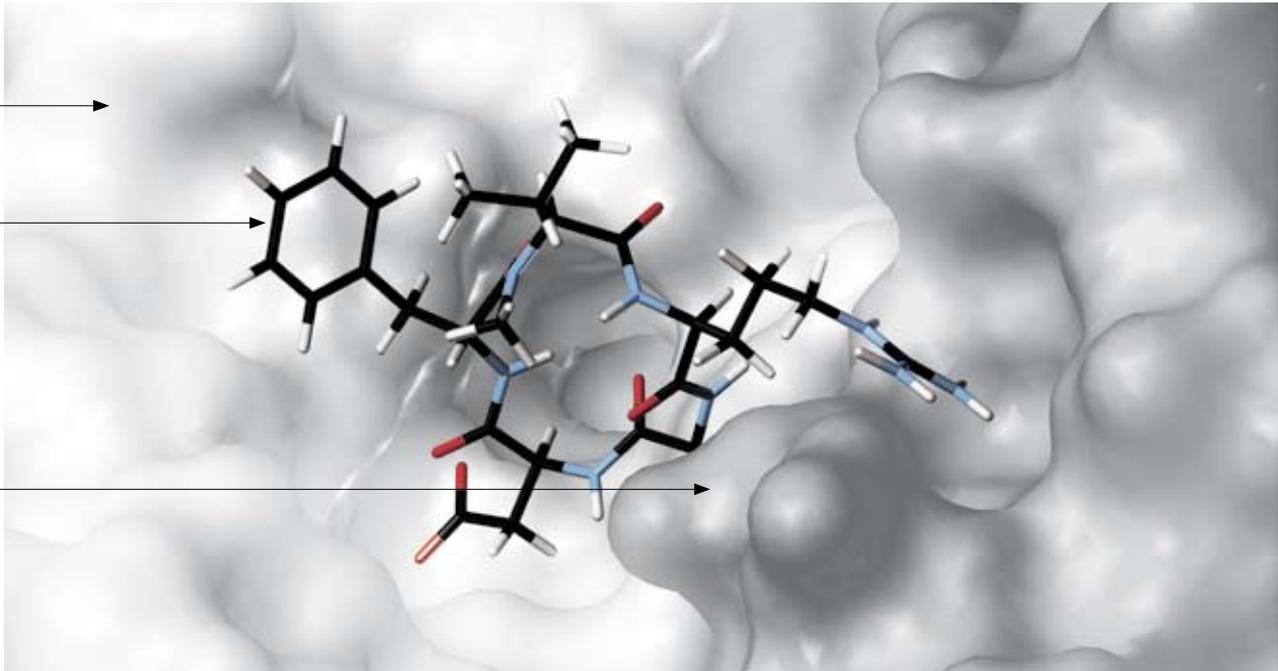
**W**er sich als Wissenschaftler der Grundlagenforschung verschrieben hat, erntet selten praktische Früchte seiner Arbeit. In der Medizin vergehen zwischen der ersten Veröffentlichung über eine potenziell wirksame Substanz und der ersten großen klinischen Studie rund 24 Jahre, haben griechische Wissenschaftler kürzlich ermittelt. Auf dem weiten Weg vom Forschungslabor bis in die Apotheke gerät oft in Vergessenheit, wo und bei wem die Erfolgsgeschichte ihren Anfang nahm. So ist es auch bei Cilengitid, einem Krebspräparat, das etwa 2012 seine Zulassung erhalten dürfte. Eine Sequenz aus drei Aminosäuren, unter Chemikern als RGD bekannt, verleiht ihm seine Wirksamkeit. Diese Sequenz und ebenso Cilengitid tauchen in einer großen Zahl wissenschaftlicher Publikationen und auch im Internetlexikon Wikipedia auf. Den Namen ihres „Vaters“ sucht man darin aber meist vergeblich: den Namen Horst Kessler. ▷



Horst Kessler, seit 20 Jahren Ordinarius für Organische Chemie an der TU München, gehört zu den Wissenschaftlern, die ihre Grundlagenforschung erfolgreich mit der Umsetzung in die Praxis verknüpfen können, wenn auch der wirtschaftliche Erfolg („Trotz meiner Beteiligung an 35 Patenten habe ich da noch kein Geld gesehen.“) wegen der sehr langwierigen Prozedur der Medikamentenentwicklung sehr bescheiden ist. Doch vielleicht ändert sich das ja noch. Denn in den nächsten drei Jahren kann sich der 68-Jährige ohne die Lehrverpflichtungen eines Hochschullehrers ganz der Forschung hingeben: Mit einer Carl-von-Linde-Professur bleibt der „Emeritus of Excellence“ an der TUM, genau gesagt am Institute for Advanced Study (IAS). Einige Mitarbeiter, der Zugriff auf alle notwendigen technischen Ressourcen und zusätzlich eingeworbene Drittmittel erlauben ihm, sich weiterhin mit Molekülen zu beschäfti-

gen, die die RGD-Sequenz enthalten. Wichtigstes Werkzeug dabei ist die NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Kernspinresonanzspektroskopie). Ihre Anwendung vor allem zur Aufklärung von Molekülstrukturen ist ebenfalls eng mit dem Namen Kessler verknüpft. Kessler, 1971 mit 31 Jahren als jüngster Chemieprofessor in Deutschland an die Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt berufen, gilt als Pionier auf dem Gebiet der Strukturaufklärung chemischer Verbindungen mittels NMR. Mit dieser analytischen Methode befasst er sich seit Beginn seiner wissenschaftlichen Laufbahn. 2001 baute er in Garching das Bayerische Zentrum für Kernspinresonanzspektroskopie auf.

Er war einer der Ersten, die diese Methode systematisch zum Nachweis innermolekularer Beweglichkeiten anwendete. Moleküle sind keine starren Gebilde, sondern



Integrine sind aus zwei Untereinheiten zusammengesetzte Moleküle, die in allen tierischen Zellen vorkommen – mit Ausnahme der roten Blutkörperchen. Bei Säugetieren sind 24 Kombinationen aus je einer von 18  $\alpha$ -Untereinheiten und einer von 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt. Als in der Zellmembran verankerte „Transmembranproteine“ verbinden sie das Innere der Zellen, das Zytoskelett, mit Nachbarzellen und mit der extrazellulären Matrix - das sind Stützsubstanzen, an denen sich die Zellen anheften. Integrine ermöglichen die Vermittlung von Signalen in die Zelle hinein und insbesondere auch aus ihr heraus.

Am extrazellulären Teil der Integrine sitzen Bindungsstellen, an denen zum Beispiel das RGD-Merkmal (Sequenz aus den drei

Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure) ankoppeln kann. Diese Sequenz findet sich etwa in extrazellulären Matrixproteinen wie Fibrinogen, Vitronektin und Fibronektin, die bei Blutgerinnung und Wundheilung eine Rolle spielen. Auch an vielen weiteren – positiven wie negativen – Prozessen sind Integrine maßgeblich beteiligt. So sorgen sie im Embryo für ein reguliertes Zellwachstum, erlauben aber auch das Anheften wandernder, von einem Primärtumor abgespaltener Krebszellen an Matrixproteinen. Und auch bei Thrombose und Osteoporose mischen Integrine mit. Diese Vielseitigkeit macht sie zu einem interessanten Ansatzpunkt für die pharmazeutische Forschung: Gezielte Eingriffe an der Bindung zwischen Integrin und ankoppelnden Liganden lassen viel versprechende neue Medikamente erwarten.

Bild: TUM

ändern ihre Gestalt fortwährend durch thermische Bewegungen von Atomen oder Atomgruppen. Diese Bewegungen erfolgen unterschiedlich schnell – je höher die Energiebarriere zwischen zwei oder mehreren Molekülgestalten ist, desto länger dauert die Umwandlung. Erst die NMR-Spektroskopie ermöglichte es, solche Barrieren zu bestimmen.

Kessler wendete die Methode unter anderem auf Peptidbindungen an. Diese Bindungen existieren in zwei Formen, die sich in der räumlichen Anordnung der Atome unterscheiden: trans- und cis-Form. Da Peptide und Proteine solche Bindungen enthalten, hängt ihre Raumstruktur auch von deren cis-trans-Status ab. Kessler war noch Doktorand, als es ihm gelang, die Umwandlung der einen in die andere Form über eine Energiebarriere hinweg experimentell nachzuweisen. ▷



Foto: Stephan Vavra

„Gleich nach der Promotion habe ich über die Anwendung der Methode der hochauflösenden NMR-Spektroskopie zur Bestimmung der innermolekularen Beweglichkeiten ein Highlight-Paper geschrieben“, erinnert er sich. „Damit bin ich bekannt geworden.“ Zu den herausragendsten Ergebnissen seiner Arbeit zählt die Aufklärung der Raumstruktur des Immunsuppressivums Cyclosporin A im Jahr 1985.

### Wirkstoffe gezielt entwickeln

Die Raumstruktur ist ein überaus wichtiger Faktor, bestimmt sie doch auch die Eigenschaften der Moleküle, etwa in Hinsicht auf die biologische Aktivität. Diesen so einflussreichen Parameter mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären, zu verändern und damit für die Entwicklung von Wirkstoffen zu optimieren – das zieht sich wie ein roter Faden durch Kesslers wissenschaftliches Lebenswerk. Sein „konformationsbasiertes Design“ von Proteinen und Peptiden berücksichtigt nicht nur die räumliche Lage der einzelnen Aminosäuren, sondern die Gestalt der ganzen Moleküle. Auf diese Weise lassen sich Wirkstoffe rational und gezielt entwickeln.

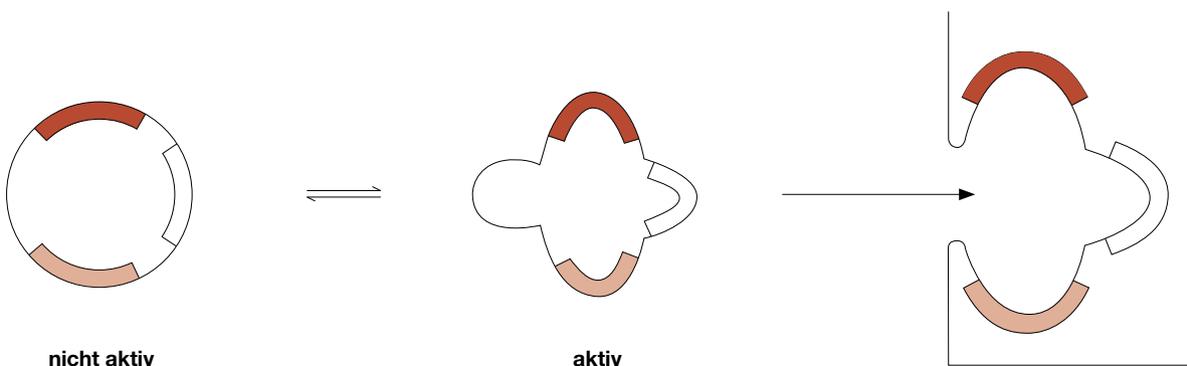
Nachdem Kessler 1989 den Lehrstuhl an der TU München übernommen hatte, wurde die RGD-Sequenz Schwerpunkt seiner Arbeit. RGD ist der Einbuchstaben-code für die Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D). In dieser Reihenfolge kommen die drei Aminosäuren besonders in Proteinen der extrazellulären Matrix vor, etwa im Bindegewebe. RGD ist überall da wichtig, wo es um die Vernetzung von Zellen und um ihre Ansiedlung und Anheftung geht. RGD-tragende Moleküle wie Fibrinogen und Fibronectin spielen bei-

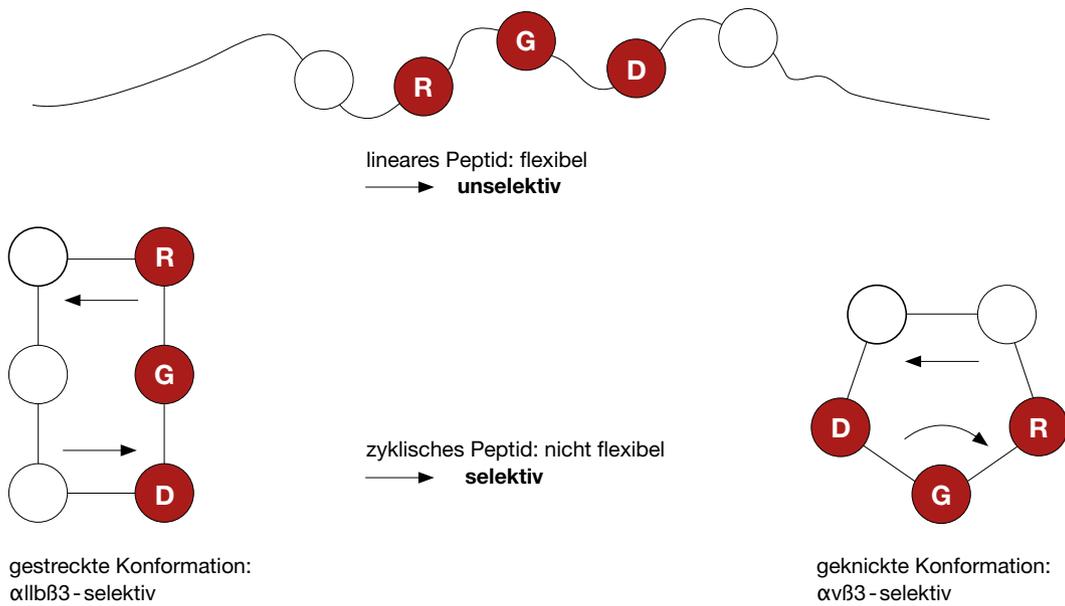
spielsweise bei der Wundheilung eine Rolle. Sie heften sich an bestimmte Rezeptoren in der Zellmembran an, die Integrine (s. Kasten S.24/25). Konkreter Anker ist oft die Sequenz RGD. Sie fungiert als „Ligandenschlüssel“, der in das „Rezeptorschloss“ der Integrine passt. „Das Schlüssel-Schloss-Prinzip ist die Basis biologischer Wirkungen“, erklärt Kessler. „Will man für medizinische Zwecke in eine solche molekulare Erkennung eingreifen, muss man Struktur und Dynamik der Einzelmoleküle und des aus ihnen gebildeten Komplexes kennen. Das ist das wichtige Einsatzgebiet der hochauflösenden NMR-Spektroskopie.“

Anders als beim starren Schlüssel-Schloss-System sind biologische Moleküle allerdings flexibel. Wenn sie nicht auf Anhieb zueinander passen, verformen sie sich entsprechend und gehen dennoch eine Bindung ein. Diese physiologisch sinnvolle Eigenschaft, die es einem Molekül erlaubt, an verschiedene Rezeptoren (unterschiedlich stark) zu binden, ist unter pharmakologischen Gesichtspunkten unerwünscht sollen Wirkstoffe doch möglichst nur an jeweils einen für eine Krankheit ausschlaggebenden Rezeptor binden. Um RGD-Moleküle mit hoher Rezeptorspezifität für die zahlreichen und nur leicht unterschiedlichen Integrine herzustellen, wählten die Wissenschaftler relativ kurze Ketten aus Aminosäuren, die andererseits lang genug sein mussten, um noch Manipulationsmöglichkeiten zu bieten. Diese Ketten schlossen sie dann zum Ring, weil zyklische Peptide viel weniger ihre Gestalt ändern können. Die Ringe sollten möglichst klein sein und bestanden aus fünf oder sechs Aminosäuren (drei davon RGD). Vor allem auf Ringe aus Pentapeptiden fokussierte sich das Interesse.

### Flexible Moleküle in Lösung:

Die Gestalt von Biomolekülen in Lösung ist nicht starr. Hierdurch entsteht ein dynamisches Gleichgewicht verschiedener Raumstrukturen. Nur solche Konformationen, die exakt in die Bindungstasche eines Rezeptor passen, weisen eine hohe Affinität zu diesem auf. Mit Hilfe des strukturbasierten Designs versuchen die TUM-Wissenschaftler, aktive Konformationen zu stabilisieren („einzufrieren“)





**Selektivität peptidischer Integrin - Antagonisten:**

Damit hatten die Wissenschaftler Super-Aktivität und -Selektivität gewonnen. Dieser bereits 1990 gefundene Peptidring aus fünf Aminosäuren erwies sich als besonderer Glücksgriff: Er bildet heute den Kern des Medikaments Cilengitid (in der Abbildung rechts)

Die große Frage war: Wie findet man die richtigen Peptidringe? Das Herzstück der Ringe stand fest: RGD. Die übrigen beiden Positionen wurden mit verschiedenen Aminosäuren besetzt. Prinzipiell können Aminosäuren in zwei Konfigurationen vorliegen: in der natürlichen L-Form und der spiegelbildlichen D-Form. Die Chemiker ersetzten nun die L-Aminosäuren der Peptidringe – immer nur eine – durch die D-Variante und untersuchten die dreidimensionale Struktur der so neu entstandenen Peptide NMR-spektroskopisch. Da die D-Variante in dem Molekürling nicht jede beliebige Position einnehmen kann, zwingt ihr Einfügen die RGD-Sequenz in eine bestimmte räumliche Form. So entstand eine Reihe von RGD-Peptiden aus den gleichen Aminosäuren, aber mit unterschiedlicher Raumstruktur. In den biologischen Tests war ein einziges zyklisches RGD-Peptid gegenüber einem Integrin, dem Integrin αvβ3, tausendfach stärker aktiv als das lineare Peptid. Dieser Peptidring ist zudem auch selektiv: Auf ein auf Blutplättchen vorkommendes Integrin wirkt er nicht aktivierend. Damit hatten die Wissenschaftler Super-Aktivität und -Selektivität gewonnen.

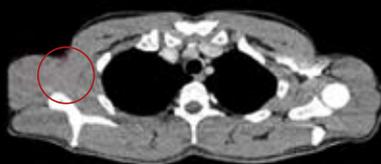
**Basis für ein Tumormedikament**

Dieser bereits 1990 gefundene Peptidring aus fünf Aminosäuren erwies sich als besonderer Glücksgriff. Er bildet heute den Kern des Medikaments Cilengitid (in der Abbildung oben rechts). Später entwickelten die TUM-Forscher gemeinsam mit dem Unternehmen Merck

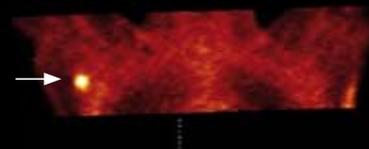
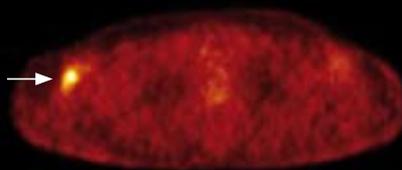
Deutschland dieses Zylopeptid weiter, und 1995 entstand daraus das Medikament Cilengitid. Heute durchläuft Cilengitid die Phase III der Zulassung als Mittel gegen Glioblastome, besonders bösartige Hirntumoren; gegen Prostatakarzinome befindet es sich in Phase II. Cilengitid hemmt die beiden Integrine αvβ3 und αvβ5, mit deren Hilfe sich maligne Tumorzellen festsetzen. Zudem senden Tumorzellen Wachstumsfaktoren aus, die benachbarte Endothelzellen – sie kleiden Blutgefäße wie eine Tapete aus – dazu anregen, auf ihrer Oberfläche Integrine zu exprimieren, sich dann in Richtung Tumor zu bewegen und neue Blutgefäße auszubilden, die den wachsenden Tumor ernähren. Blockiert man die Integrine, sterben die Endothelzellen ab und es entstehen keine neuen Gefäße – die Tumorzellen „verhungern“. Krebszellen, die das entsprechende Integrin auf ihrer Oberfläche tragen, reagieren auch direkt auf das Medikament und gehen zugrunde.

Etwa zehn Jahre später konnten Wissenschaftler der Harvard-Universität in Cambridge, USA, die Struktur des Integrins αvβ3 mit gebundenem Cilengitid bestimmen. Diese eine bekannte Struktur verwenden Kessler und seine Mitstreiter heute, um auf dieser Basis neue, verbesserte Moleküle für dieses Integrin, aber auch für verschiedene andere, verwandte Integrine zu entwickeln. Die im NMR ermittelte Struktur neuer Moleküle versuchen sie in das bekannte Integrin „hinein zu modellieren“. Dabei sehen sie genau, ob der neue ▶

Computer - Tomographie  
(CT)



Positronen - Emissions - Tomografie  
(PET)



CT/PET  
Kombination



Bild: TUM

## Einsatz von radiomarkierten Galacto - RGD - Peptiden zur Bildgebung von Lymphknotenmetastasen

„Schlüssel“ passt oder wie er verändert werden muss. So entstehen schrittweise maßgefertigte Moleküle, die nur ganz bestimmte gewünschte Integrin-Rezeptoren erkennen und nur an diese binden.

In der Folgezeit begann Kessler erfolgreich mit der Entwicklung strukturell abgewandelter zyklischer RGD-Peptide für bildgebende Verfahren. Über ein in den Peptidring eingebautes radioaktives Atom werden die Tumorzellen radioaktiv markiert und können durch Positronen-Emissions-Tomografie sichtbar gemacht werden. Auch lässt sich damit vor einer Behandlung feststellen, ob der Patient überhaupt die für die Therapie mit Cilengitid nötigen Rezeptoren besitzt, ob also die Gabe des Medikaments sinnvoll ist. Da die RGD-Peptide grundsätzlich in die Blutbahn injiziert werden und bei Glioblastompatienten die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr intakt ist, gelangen die Substanzen auch ins Gehirn, so dass sich auch Hirntumoren darstellen lassen. Entscheidend für die Bildgebung war es, den Kontrast zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe zu erhöhen. Das erreichten die Wissenschaftler mit den von ihnen erstmals entwickelten „Zucker-Aminosäuren“: Die Moleküle enthalten einen Zuckerrest, der wie eine Aminosäure behandelt werden kann. Das so hergestellte Galacto-RGD ist leicht zu handhaben und bindet sehr spezifisch an Tumorzellen. Mediziner um Prof. Markus Schwaiger, Ordinarius für Nuklearmedizin der TUM, ha-

ben damit schon bei mehreren hundert Patienten Metastasen lokalisiert.

Unter einem ganz anderen Aspekt lässt sich die „verbindliche“ Eigenart der Pentapeptide in der Chirurgie nutzen: Implantate werden mit geeigneten RGD-Ringen beschichtet, die zwischen dem anorganischen Material des Implantats und dem Körpergewebe vermitteln. Dass die Sache funktioniert, bewies zunächst das Verhalten Knochenbildender Zellen auf Plexiglas: Normalerweise siedeln sich die Zellen auf diesem Material nicht an; ist das Plexiglas aber mit RGD-Peptid beschichtet, bilden sie einen dichten Zellrasen.

Davon könnte die Herzchirurgie profitieren. Die hier häufig verwendeten Stents – kleine röhrenförmige Metallnetze, die geschädigte Blutgefäße offen halten – werden heute zumeist mit einer zytotoxischen Substanz ummantelt. Sie verhindert, dass sich Muskelzellen festsetzen und den Stent verstopfen. Bei RGD-Beschichtung kann man auf solche nicht eben schonenden Substanzen verzichten: Die Peptidringe lassen um die kleinen Netze einen fugenlosen Teppich aus Endothelzellen wachsen. Hier macht man sich also die Fähigkeit der RGD-Sequenz zunutze, Einfluss zu nehmen auf Endothelzellen. Das Verfahren wird derzeit für die Anwendung erprobt und hat Horst Kessler ein weiteres Patent beschert. Es wird wahrscheinlich nicht sein letztes sein.

*Sibylle Kettembeil*