

[³H]CGP 61594: the first photoaffinity ligand for a structural analysis and differentiation of the glycine antagonist site of NMDA receptor subtypes

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Michael Honer
Dipl. Natw. ETH Zürich
born February 7th, 1968
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Möhler, examiner
Prof. Dr. A. Beck-Sickinger, co-examiner

Summary

Glutamatergic neurotransmission via NMDA receptors is implicated in the pathophysiology of various CNS disorders (e.g. stroke, Parkinson's disease, schizophrenia). For the treatment of these diseases the glycine binding site of NMDA receptors is of considerable therapeutic interest since glycine site antagonists offer advantages over other types of NMDA receptor antagonists in terms of their side effect profile. Further improvements are expected from the targeting of distinct NMDA receptor subtypes. As a tool for the investigation of the structural determinants of the glycine binding domain and for the identification of a putative subtype-selective interaction, a novel glycine antagonist and photoaffinity ligand was developed, termed [³H]CGP 61594.

The first part of the study provides an extensive characterization of [³H]CGP 61594 binding to crude brain membranes demonstrating that [³H]CGP 61594 interacts selectively and with high affinity with the glycine site of native NMDA receptors.

In the second part of the study, the glycine antagonist binding domain was directly targeted by a photolabeling approach for the first time. As a photoaffinity ligand [³H]CGP 61594 identifies the NR1 subunit of native and recombinant NMDA receptors as the main constituent of the glycine antagonist binding domain.

The third part of the study comprises a detailed analysis of the interaction of [³H]CGP 61594 with various native and recombinant NMDA receptor subtypes. High affinity binding sites for [³H]CGP 61594 are exclusively displayed by NR1/2B receptors whereas the NMDA receptor subtypes NR1/2A, NR1/2C and NR1/2D are clearly distinguished by reduced affinities. Thus, a heterogeneity of the glycine antagonist site among NMDA receptor subtypes is identified for the first time. This finding disproves the previous view that glycine antagonists interact with domains on the NR1 subunit that are insensitive to modulation by adjacent NR2 subunit variants. The subtype-specific interaction of [³H]CGP 61594 might be of great importance for the development of future glycine antagonists of the NMDA receptor since such agents are expected to be neuroprotective but less prone to side effects than presently available NMDA receptor antagonists.

Zusammenfassung

Eine Fehlfunktion in der glutamatergen Neurotransmission via NMDA-Rezeptoren scheint an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen des Zentralnervensystems beteiligt zu sein (z.B. Schlaganfall, Parkinson-Krankheit, Schizophrenie). Als therapeutischer Angriffspunkt von Medikamenten zur Hemmung der erregenden Neurotransmission ist die Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors besonders interessant, da von Glycin-Antagonisten im Vergleich zu anderen NMDA-Rezeptor-Antagonisten weniger Nebenwirkungen erwartet werden. Eine weitere Verbesserung des therapeutischen Indexes dieser Substanzklasse verspricht man sich von Glycin-Antagonisten, die selektiv an einen NMDA-Rezeptor-Subtypen binden. Um die Bindungsdomäne für Glycin-Antagonisten an nativen NMDA-Rezeptoren strukturell näher zu untersuchen und eine mögliche Heterogenität dieser Bindungsstelle in verschiedenen Rezeptor-Subtypen zu identifizieren, wurde ein Glycin-Antagonist ($[^3\text{H}]\text{CGP 61594}$) entwickelt, der gleichzeitig als Photoaffinitätsligand verwendet werden kann.

Der erste Teil der Studie beinhaltet eine ausführliche Untersuchung der Bindungsparameter von $[^3\text{H}]\text{CGP 61594}$ an NMDA-Rezeptoren aus Rattenhirnmembranen. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Ligand mit hoher Affinität und Spezifität mit der Glycin-Bindungsstelle nativer NMDA-Rezeptoren interagiert.

Der zweite Teil der Studie beschreibt die kovalente, radioaktive Markierung der Glycin-Bindungsdomäne des NMDA-Rezeptors durch Photoaktivierung von $[^3\text{H}]\text{CGP 61594}$. Mittels dieses experimentellen Ansatzes konnte erstmals die NR1-Untereinheit nativer NMDA-Rezeptoren als Hauptbestandteil der Glycin-Bindungsdomäne identifiziert werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Interaktion dieses neuen Liganden mit verschiedenen Subtypen nativer und rekombinanter NMDA-Rezeptoren im Detail analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass nur der Rezeptor-Subtyp NR1/2B eine hohe Affinität für CGP 61594 besitzt, während die Subtypen NR1/2A, NR1/2C und NR1/2D eine deutlich geringere Affinität aufweisen. Somit konnte zum ersten Mal eine Heterogenität der Bindungsstelle für Glycin-Antagonisten in verschiedenen NMDA-Rezeptor-Subtypen identifiziert werden. Der Nachweis der selektiven Bindung eines Glycin-Antagonisten an einen NMDA-Rezeptor-Subtyp könnte für die zukünftige Medikamentenentwicklung

von Bedeutung sein. Von Glycin-Antagonisten mit selektiver Wirkung an NR1/2B Rezeptoren kann ein neuroprotektiver Effekt bei geringeren Nebenwirkungen erwartet werden.