

DISS. ETH NO. 24088

DEVELOPMENT OF A GRK2-INHIBITORY PEPTIDE

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MURIEL GRÄMER

MSc ETH

born on 25.03.1987

citizen of Gommiswald-Dorf SG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ursula Qitterer

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter

2017

1 Summary

G protein-coupled receptor (GPCR) kinases (GRKs) are most prominently known for phosphorylating agonist-occupied receptors resulting in signal attenuation.

GRK2, the most thoroughly investigated GRK isoform, is recognized as a potential drug target for disorders such as heart failure and hypertension. However, efforts to find a GRK2-inhibitor have been futile.

The ubiquitously expressed GRK2 displays a tri-domain structure with the central kinase domain harbouring the enzyme active site, flanked by an amino terminal domain mediating receptor recognition and a carboxyl terminal domain (GRK2CTD) involved in localization to the plasma membrane. More specifically, G $\beta\gamma$ -interaction with GRK2CTD is required for kinase translocation to the plasma membrane towards receptor substrates. Blocking of this interaction with β ARKct, a G $\beta\gamma$ -scavenging peptide derived from the carboxyl terminal domain of GRK2, successfully inhibits GRK2 activity and prevents heart failure development in animal models. Moreover, interfering with G $\beta\gamma$ binding of GRK2 confers subtype-specificity, because membrane localization of other GRK isoforms employs different mechanisms. In a similar manner, compounds specifically interacting with GRK2CTD would be expected to block GRK2 function. Nevertheless, such an approach, to our knowledge, was not investigated to date.

Therefore, in this study, a peptide phage display library screen was used as an approach towards finding of GRK2 domain-specific interaction partners. Specifically, the focus was to identify peptides that interact with GRK2CTD. The peptides' inhibitory features were subsequently characterized in different *in vitro* assays and *in vivo*.

The three GRK2 domains were purified individually from bacterial cultures. In a next step, GRK2CTD was used as bait in a peptide phage display library screen, which yielded the following 7-mer peptide sequences: ASTLIVF, IRYVPQT, HGGVRLY, HYTDFRW, IVSLQTP, and HYIDFRW.

To investigate sequence homology with known proteins, a protein data base search was performed. Peptide sequence IVSLQTP is partially contained in the nuclear-factor of activated T-cells and peptide ASTLIVF shares sequence identity with the WD repeat-containing protein 76 (WDR76). WDR76 is structurally related to G $\beta\gamma$, another WD repeat-containing protein and, as mentioned before, a known GRK2 interaction and activation partner. Based on WDR76, the original peptide sequence (ASTLIVF) was elongated carboxyl (WD1) and amino (WD3) terminally. WD1 and WD3 were used for further experiments.

For WD3, the interaction with GRK2CTD could be confirmed by ELISA technique, whereas WD1 did not significantly interact with GRK2CTD.

To study the effect of WD1 and WD3 on the G β γ -GRK2CTD interaction essential for kinase activity, an inhibition ELISA with recombinant G β 3 purified from bacterial culture and GRK2CTD was established. In this assay, WD3 successfully blocked the G β 3-GRK2CTD protein-protein interaction. In contrast, WD1 did not interfere with the binding of GRK2CTD to G β 3.

In addition to its role in receptor phosphorylation and subsequent desensitization, GRK2 also phosphorylates a number of cytosolic non-receptor substrates.

To investigate, whether WD1 and WD3 influence GRK2 kinase activity, an *in vitro* phosphorylation assay using a soluble substrate of GRK2 was performed. WD3 reduced GRK2-mediated phosphorylation of this non-receptor substrate, whereas WD1 did not display any inhibitory effect.

The impact of WD1 and WD3 on desensitization of the GPCR bradykinin receptor type 2 was assessed *in vitro* in HEK cells. Additionally, another peptide (WD2), which was elongated based on the original peptide sequence both amino and carboxyl terminally, was tested. Only WD3 increased bradykinin-stimulated calcium signalling, indicating reduced GRK2-mediated receptor desensitization.

To further investigate the properties of WD3 *in vivo*, a transgenic mouse model with cardiac-specific expression was established. In a pressure overload model of cardiac dysfunction, WD3 retarded signs of heart failure *in vivo*.

Taken together, modification of a phage display-derived peptide yielded a peptide prototype with GRK2-inhibitory features *in vitro* and *in vivo*. By employing a novel strategy to GRK2-inhibition, it could serve as a lead structure for further development into a candidate drug compound.

2 Zusammenfassung

G-protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) phosphorylieren und regulieren dadurch aktivierte G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), was zu einer Signaldämpfung führt. GRK2, die am besten untersuchte GRK-Isoform, gilt als ein möglicher Angriffspunkt für die Behandlung von Krankheiten wie Herzinsuffizienz und Hypertonie. Trotz grosser Bemühungen zur Entwicklung von Inhibitoren konnte bis heute keine Substanz erfolgreich in der Klinik etabliert werden.

Die ubiquitär exprimierte GRK2 besteht aus drei Domänen mit unterschiedlichen Funktionen: der zentralen Kinasedomäne, welche das aktive Zentrum beherbergt; der aminoterminalen Domäne, welche Rezeptorsubstrate erkennt und bindet; und der carboxylterminalen Domäne (GRK2CTD), durch welche der Transport der Kinase zur Plasmamembran vermittelt wird. Eine Voraussetzung für diesen Schritt sowie die Aktivierung des Enzyms ist die Interaktion mit $G\beta\gamma$. Wird diese durch β ARKct, einem von der GRK2CTD abgeleitetem $G\beta\gamma$ -Scavengerpeptid, gestört, inhibiert dies die Aktivität von GRK2 und vermag das Auftreten von Herzinsuffizienz im Tiermodell zu verhindern. Da die übrigen GRK-Isoformen mittels alternativer Mechanismen zur Plasmamembran gelangen, ermöglicht die gezielte Störung der $G\beta\gamma$ -GRK2CTD-Bindung eine subtypspezifische Inhibierung. Analog dazu wird erwartet, dass Substanzen, welche selektiv mit der GRK2CTD interagieren, die Kinaseaktivität vermindern. Ein solcher Ansatz wurde jedoch nach unserem Wissen bisher noch nicht untersucht.

Zunächst wurden die drei GRK2-Domänen einzeln aus Bakterienkulturen aufgereinigt. In einem nächsten Schritt wurde ein Phagen-Display mit einer Peptidbibliothek durchgeführt. Dabei wurde GRK2CTD als Zielmolekül verwendet. Es wurden die folgenden, jeweils sieben Aminosäuren enthaltenden Sequenzen gefunden: ASTLIVF, IRYVPQT, HGGVRLY, HYTDFRW, IVSLQTP und HYIDFRW.

Mit den gefundenen Peptidsequenzen wurde eine Proteindatenbank durchsucht, um allfällige Homologien mit bekannten Proteinen zu erkennen. Dabei wurde eine teilweise Übereinstimmung der Peptidsequenz IVSLQTP mit NFAT, dem nuclear factor of activated T-cells, gefunden. Des Weiteren ist die Peptidsequenz ASTLIVF auch in WDR76, dem WD repeat-containing protein 76, enthalten. WDR76 weist eine ähnliche Struktur wie $G\beta\gamma$ auf, welches ebenfalls ein WD repeat-containing protein ist. Ausserdem ist $G\beta\gamma$, wie bereits erwähnt, verantwortlich für die Aktivierung von GRK2 und den Transport zur Plasmamembran in Richtung Rezeptorsubstrate. Deshalb wurde das ursprüngliche Peptid basierend auf der Proteinsequenz von WDR76 in Richtung Carboxylterminus (WD1) und Aminoterninus (WD3) verlängert. Die Peptide WD1 und WD3 wurden im Folgenden für weitere Experimente verwendet.

Für WD3 konnte die Interaktion mit der GRK2CTD mittels ELISA bestätigt werden, wo hingegen WD1 nicht signifikant mit der GRK2CTD interagiert.

Daraufhin wurde ein Inhibierungs-ELISA mit aus Bakterienkulturen aufgereinigtem G β 3 sowie GRK2CTD durchgeführt, um den Effekt der beiden Peptide WD1 und WD3 auf die G β γ -GRK2CTD-Interaktion zu untersuchen. Dabei konnte WD3 die G β 3-GRK2CTD Protein-Protein-Interaktion empfindlich stören. Im Gegensatz dazu beeinflusste WD1 die Bindung von GRK2CTD zu G β 3 nicht.

Neben der Phosphorylierung und Desensibilisierung von Rezeptoren kann GRK2 auch eine Reihe von zytosolischen Nichtrezeptorsubstraten phosphorylieren.

Ein solch lösliches Substrat wurde in einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion eingesetzt mit dem Ziel, den Effekt von WD1 und WD3 auf die Kinaseaktivität von GRK2 zu untersuchen. Dabei vermochte WD3 die GRK2-vermittelte Phosphorylierung dieses Nichtrezeptorsubstrates zu verhindern, während WD1 keinen Effekt zeigte.

Der Einfluss von WD1 und WD3 auf die Desensibilisierung eines G-protein-gekoppelten Rezeptors, d.h. des Bradykininrezeptors Typ 2, wurde *in vitro* in HEK-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde ein weiteres Peptid (WD2) getestet, welches basierend auf der ursprünglichen Peptidsequenz in Richtung Amino- und Carboxylterminus verlängert worden war. Ausschliesslich WD3 erhöhte das Bradykinin-stimulierte Kalziumsignal, was auf eine reduzierte GRK2-vermittelte Rezeptordesensibilisierung hinweist.

Um die Eigenschaften von WD3 weiter *in vivo* zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell, welches die WD3-Peptidsequenz spezifisch im Herzen exprimiert, etabliert. WD3 verzögerte im Mausmodell das Auftreten von Herzinsuffizienzzeichen in einer durch chronische Hypertonie erzeugten kardialen Hypertrophie.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit eine modifizierte Version eines von einem Phagen-Display stammenden Peptids vorgestellt. Dieser Peptidprototyp zeigt *in vitro* und *in vivo* GRK2-inhibierende Eigenschaften. Dabei könnte insbesondere die Anwendung einer neuartigen Strategie, um GRK2 zu inhibieren, bedeuten, dass dieser Prototyp als Ausgangsstruktur zur Entwicklung eines Medikaments dienen könnte.