Synthese und Charakterisierung von peptidischen Liganden des zellulären, humanen Prionproteins: Inhibition der Aggregation des Prionproteins

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

## **Birgit Claasen**

aus Hamburg



Hamburg, 2005

Universität Hamburg

La originalidad es la vuelta a los orígenes (Antoni Gaudí)

- 1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C. Betzel

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Oktober 2005 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Dr. h c. mult. W. Francke, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und für die anregende Zeit in seiner Gruppe.

## INHALTSVERZEICHNIS

| <u>ABK</u> | BKÜRZUNGSVERZEICHNIS   |           |  |
|------------|--|-----------|--|
| 1          | EINLEITUNG   | 1         |  |
|            |  |           |  |
| 1.1        | Transmissible Spongiforme Enzephalopathien                           | 1         |  |
|            | 1.1.1 Der Krankheitserreger und seine Replikation                    | 2         |  |
|            | 1.1.2 Struktur und Stabilität des Prionproteins                      | 5         |  |
|            | 1.1.3 Glycosyllerung des Phonproteins                                | 0<br>10   |  |
|            | 1.1.5 Therapieansätze  | 11        |  |
| 1.2        | Wirkstoffe   | 12        |  |
|            | 1.2.1 Peptide als Wirkstoffe und Leitstrukturen                      | 12        |  |
|            | 1.2.2 Fluorierte Wirkstoffe  | 12        |  |
| •          | METHODEN   |           |  |
| <u> </u>   | METHODEN   | 14        |  |
| 2.1        | NMR Screening  | 14        |  |
|            | 2.1.1 STD NMR  | 16        |  |
|            | 2.1.2 Fluor-NMR Screening  | 19        |  |
| 2.2        | Konformationsanalyse von Peptiden                                    | 23        |  |
| 2.3        | Oberflächenplasmonenresonanz   | 27        |  |
| 2.4        | Dynamische Lichtstreuung   | 30        |  |
| 2.5        | Peptid- und Glycopeptidsynthese                                      | 31        |  |
|            | 2.5.1 Festphasenpeptidsynthese                                       | 31        |  |
|            | 2.5.2 Synthese von N-Typ-Glycopeptiden                               | 33        |  |
| 3          | PROBLEMSTELLUNG  | 34        |  |
|            |  |           |  |
| 4          | ERGEBNISSE UND DISKUSSION  | <u>35</u> |  |
| 4.1        | Peptidbibliothek   |           |  |
| 4.2        | Screening der Bibliothek durch SPR-Messungen                         | 36        |  |
|            | 4.2.1 Kinetik der Bindungsreaktion                                   | 44        |  |
|            | 4.2.2 Fluorderivate  | 45        |  |
| 4.3        | STD-Messungen mit dem Prionprotein                                   |           |  |
| 4.4        | SPR-Studien der Sequenzen Y149-Q160 und R156-P158 mit PrP-Fragmenten |           |  |

| 4.5  | <ul> <li>Einfluss der Glycosylierung auf die Struktur und die Bindungsaffinität des<br/>Peptidfragments T192-T201</li> <li>4.5.1 SPR-Messungen von 31 und 32 mit rhPrP(23-231)</li> <li>4.5.2 Konformationsanalyse des Referenzpeptids 31 und des Glycopeptids 32</li> <li>4.5.3 Untersuchung zur Aggregation des Prionproteins</li> </ul> | 59<br>61<br>2 63<br>82          |  |
|------|--|---------------------------------|--|
| 4.6  | <ul> <li>Fluor-NMR-Experimente</li> <li>4.6.1 Das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment</li> <li>4.6.2 Weitere Testsysteme</li> <li>4.6.3 Schlussbetrachtungen zum <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment</li> <li>4.6.4 NMR Messungen mit rhPrP<sup>C</sup> und fluorierten Peptiden</li> </ul>                              | 86<br>86<br>97<br>99<br>100     |  |
| 4.7  | Ausblick   | 101                             |  |
| 5    | ZUSAMMENFASSUNG  | 102                             |  |
| 6    | SUMMARY  | 105                             |  |
| 7    | EXPERIMENTELLER TEIL   | 108                             |  |
| 7.1  | Chemikalien  | 108                             |  |
| 7.2  | Verwendete Geräte und Software   | 110                             |  |
| 7.3  | Allgemeine Arbeitsvorschriften   |                                 |  |
| 7.4  | <ul> <li>Peptidsynthesen</li> <li>7.4.1 Automatisierte Peptidsynthesen</li> <li>7.4.2 Synthesen am Syntheseroboter Advanced ChemTech MOS 469 Ω.</li> <li>7.4.3 Synthesen am Peptidsynthesizer Pioneer Peptide Synthesis System</li> </ul>  |                                 |  |
| 7.5  | SPR-Experimente  | 122                             |  |
| 7.6  | <ul> <li>Aggregationsassays</li> <li>7.6.1 DLS-Messungen</li> <li>7.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration</li> </ul>   |                                 |  |
| 7.7  | NMR-Experimente<br>7.7.1 STD-Experimente mit dem Prionprotein  | 126<br>126                      |  |
| 7.8  | <ul> <li>Konformationsanalyse</li> <li>7.8.1 NOESY-Spektren und Berechungen der NOE-Aufbaukurven</li> <li>7.8.2 Berechnung der φ-Winkel</li> <li>7.8.3 DG-Rechnungen</li> <li>7.8.4 Constrained MD-Simulation</li> </ul>   | 128<br>128<br>128<br>129<br>129 |  |
| 7.9  | Toxikologie und Handhabung der Chemikalien   | 131                             |  |
| 7.10 | 0 Charakterisierung der Peptide  |                                 |  |

| 8         | ANHANG  | 141 |
|-----------|---|-----|
| 8.1       | Syntheseprotokolle des Robotors Advanced ChemTech MOS 469 $arOmega$   | 141 |
| 8.2       | NMR Pulsprogramme   | 143 |
|           | 8.2.1 Verwendete, bestehende Pulsprogramme                            | 143 |
|           | 8.2.2 Im Verlauf der Arbeit geschriebene oder variierte Pulsprogramme | 147 |
| <u>9</u>  | LITERATURVERZEICHNIS  | 157 |
| <u>10</u> | DANKSAGUNGEN  | 166 |
| <u>11</u> | LEBENSLAUF  | 167 |

# **A**BKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| AAV    | Allgemeine Arbeitsvorschrift                                 |
|--------|--|
| Ac     | Acetyl   |
| Boc    | tert-Butyloxycarbonyl  |
| BSE    | bovine spongiform encephalopathy                             |
| BSA    | bovine serum albumin   |
| CJK    | Creutzfeldt-Jakob-Krankheit                                  |
| COSY   | correlation spectroscopy                                     |
| cpd    | composite pulse decoupling                                   |
| CSA    | chemical shift anisotropie                                   |
| CV     | column volume  |
| DCM    | Dichlormethan  |
| DIPEA  | N,N-Diisopropylethylamin                                     |
| DLS    | dynamic light scattering                                     |
| DMF    | N,N-Dimethylformamid   |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid   |
| EDC    | N-(3-Dimethylaminopropyl)- $N$ -ethylcarbodiimidhydrochlorid |
| ELISA  | enzyme linked immunosorbent assay                            |
| eq     | Äquivalent   |
| ESI    | electrospray ionisation                                      |
| FFI    | fatal familia insomnia                                       |
| FID    | free induction decay   |
| Fmoc   | Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl                                  |
| GalOMe | Methyl-D-galactosid  |
| Glc    | D-Glucose  |
| GlcNAc | N-Acetyl-D-glucosamin  |
| GSS    | Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom                       |
| HATU   | O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-     |
|        | hexafluorophosphat   |
| HBTU   | O-(Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyluronium-         |
|        | hexafluorophosphat   |
| HEPES  | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)          |

| HPLC               | high performance liquid chromatography                          |  |  |
|--------------------|---|--|--|
| HTS                | high throughput screening                                       |  |  |
| $IC_{50}$          | Inhibitorkonzentration, die zu 50% verminderter Aktivität führt |  |  |
| $k_b$              | Boltzmannkonstante  |  |  |
| K <sub>D</sub>     | Dissoziationskonstante  |  |  |
| $k_{ m off}$       | Dissoziationsrate   |  |  |
| k <sub>on</sub>    | Assoziationsrate  |  |  |
| MW                 | molecular weight  |  |  |
| MALDI-TOF          | matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight    |  |  |
| MeCN               | Acetonitril   |  |  |
| MS                 | Massenspektrometrie   |  |  |
| NHS                | N-Hydroxysuccinimid   |  |  |
| NMR                | nuclear magnetic resonance                                      |  |  |
| NOESY              | nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy        |  |  |
| tBu                | tert-Butoxy   |  |  |
| PAL                | Peptidamid-Linker   |  |  |
| Pbf                | 2,2,5,7,8-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl               |  |  |
| PEG                | Polyethylenglycol   |  |  |
| ppm                | parts per million   |  |  |
| PrP                | Prionprotein  |  |  |
| PrP <sup>c</sup>   | zelluläres Prionprotein   |  |  |
| PrP <sup>Sc</sup>  | pathogenes Prionprotein   |  |  |
| RCA <sub>120</sub> | ricinus communis agglutinin                                     |  |  |
| rmsd               | root mean square deviation                                      |  |  |
| RP                 | reversed phase  |  |  |
| SAR                | structure activity relationship                                 |  |  |
| SPR                | surface plasmon resonance                                       |  |  |
| STD                | saturation transfer difference                                  |  |  |
| $T_1, T_2$         | Longitudinale-, transversale Relaxationszeit                    |  |  |
| TBTU               | O-(Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyluronium-            |  |  |
|                    | tetrafluoroborat  |  |  |
| TFA                | Trifluoressigsäure  |  |  |
| TIPS               | Triisopropylsilan   |  |  |
| TOCSY              | total correlated spectroscopy                                   |  |  |
|                    |   |  |  |

| Tris      | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                  |
|-----------|---|
| trNOE     | transferred nuclear Overhauser effect             |
| TROSY     | transverse relaxation optimized spectroscopy      |
| Trt       | Trityl  |
| TSE       | transmissible spongiform encephalopathy           |
| WATERGATE | water suppression by gradient tailored excitation |
| γ         | Gyromagnetisches Verhältnis                       |
| ρ         | Direkte dipolare Relaxationsrate                  |
| σ         | Kreuzrelaxationsrate                              |

| Tabelle 1: Aminosäuren und deren Seitenkettenschutzgrupper |
|--|
|--|

| Aminosäure Abkürzung |     |   | Verwendete<br>Seitenkettenschutzgruppe |
|----------------------|-----|---|--|
| Alanin               | Ala | А | -                                      |
| Arginin              | Arg | R | Pbf                                    |
| Asparagin            | Asn | N | Trt                                    |
| Asparaginsäure       | Asp | D | tBu                                    |
| Cystein              | Cys | С | Trt                                    |
| Glutamin             | Gln | Q | Trt                                    |
| Glutaminsäure        | Glu | E | tBu                                    |
| Glycin               | Gly | G | -                                      |
| Histidin             | His | Н | Trt                                    |
| Isoleucin            | lle | 1 | -                                      |
| Leucin               | Leu | L | -                                      |
| Lysin                | Lys | К | Boc                                    |
| Methionin            | Met | М | -                                      |
| Phenylalanin         | Phe | F | -                                      |
| Prolin               | Pro | Р | -                                      |
| Serin                | Ser | S | tBu                                    |
| Threonin             | Thr | Т | tBu                                    |
| Tryptophan           | Trp | W | Boc                                    |
| Tyrosin              | Tyr | Y | tBu                                    |
| Valin                | Val | V | -                                      |

# **1 EINLEITUNG**

### **1.1** Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) werden auch als Prionen-Erkrankungen bezeichnet und sind tödlich verlaufende degenerative Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems.<sup>1</sup> Zu den TSE gehören u.a. die Traberkrankheit bei Schafen (*scrapie*), der Rinderwahnsinn (*bovine spongiform encephalopathy BSE*) und die menschlichen Prionen-Erkrankungen. Zu den humanen Varianten zählt die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), eine seltene fortschreitende Störung des menschlichen Kleinhirns. Kuru ist eine ähnlich geartete (vermutlich identische) degenerative Erkrankung des Gehirns, die unter Ureinwohnern von Papua-Neuguinea auftritt und durch rituellen Kannibalismus übertragen wird.<sup>2</sup> Das Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrom (GSS) sowie *fatal familia insomnia* (FFI) sind seltene Erbkrankheiten und stellen weitere Formen der menschlichen Spongiformen Enzephalopathien dar.<sup>3</sup>

Alle Erkrankungen dieser Art zeigen einen ähnlichen Verlauf, der nach recht langer, symptomloser Inkubationszeit in eine kurze progressive Krankheitsphase übergeht, welche über Schreckhaftigkeit, Koordinationsstörungen (Ataxie) und Demenz zum Tod führt. Charakteristisch ist eine Degeneration des zentralen Nervensystems, die sich in einer schwammartigen Gewebeauflockerung der grauen Hirnsubstanz und Ablagerungen von amyloiden Plaques äußert, die zur Apoptose neuronaler Zellen führen (Abbildung 1).<sup>1</sup>



**Abbildung 1:** Links: Intrazytoplasmatische Vakuolen im Gehirngewebe. Rechts: Fibrillenartige, amyloide Plaques.

Allerdings treten keine Anzeichen für einen Entzündungsprozess oder Fieber auf, so dass angenommen werden kann, dass die Krankheiten zu keiner Aktivierung des Immunsystems führen.<sup>4</sup>

Mit dem Rinderwahnsinn, der 1986 erstmalig in Großbritannien diagnostiziert wurde, wurde das öffentliche Interesse an den TSE geweckt, da sich die Tragweite des bis dahin noch weitgehend unerforschten Krankheitstyps schlecht abschätzen ließ. Bald wurde BSE mit der Verfütterung von Tiermehl in Zusammenhang gebracht, bei dessen Herstellung unzureichende Sterilisierungsmethoden angewandt wurden. 1988 verbot die britische Regierung solche Futterzusätze.

1996 wurde eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob Krankheit (nvCJK) diagnostiziert,<sup>5</sup> die sich von der schon länger bekannten sporadischen Variante hauptsächlich darin unterscheidet, dass auch jüngere Menschen betroffen sind. Des Weiteren weist sie einen verlängerten Krankheitsverlauf und frühe psychische Symptome auf. Das Auftreten von nvCJK wurde in Zusammenhang mit dem Verzehr von BSE-infiziertem Rindfleisch gebracht. Weltweit sind 161 Todesfälle von Patienten bekannt, die an nvCJD erkrankt waren. Davon starben 149 in Großbritannien, je ein Patient in Kanada, USA, Italien und Irland und acht in Frankreich (Stand 04/2005). BSE-Fälle gab es weltweit 188406, davon allein 180820 in Großbritannien. In Deutschland wurden bislang 363 Fälle gemeldet (Stand 12/2004).<sup>6;7</sup>

#### 1.1.1 Der Krankheitserreger und seine Replikation

Das Wesen des Krankheitserregers wird kontrovers diskutiert,<sup>8-10</sup> wobei die "Protein-*only*-Hypothese"<sup>1;11</sup> und die Virus-Theorie<sup>12</sup> die verbreitetsten Standpunkte widerspiegeln.

Im Jahr 1967 zeigte Alper *et al.*, dass das Agens auch nach der Behandlung mit DNA degenerierenden Chemikalien oder UV-Strahlung infektiös bleibt.<sup>13</sup> Des Weiteren konnte bislang kein DNA- oder RNA-Strang dem infektiösen Partikel eindeutig zugeordnet werden.<sup>1</sup> Auch die Tatsache, dass eine Masse von ~2x10<sup>5</sup> Da für die Infektiosität der Substanz ausreicht, spricht gegen einen virulenten Erreger, da ein Virus ein größeres Gewicht besäße.<sup>14</sup> Griffith vermutete im Jahr 1967 erstmalig, dass der Krankheitserreger der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien aus Eiweißen besteht.<sup>11</sup> Stanley Prusiner und seinen Mitarbeitern gelang 1982 die Isolierung eines Proteins aus dem infektiösen Material.<sup>15</sup> Aufgrund dieses Befunds postulierte er im gleichen Jahr die "Protein-*only*-Hypothese", nach der der Krankheitserreger der TSE nur aus einem Protein, dem sog. Prionprotein (*proteinaceous infectious only*, Prion), besteht. Für diese Theorie wurde Prusiner 1997 der

Nobelpreis verliehen. Trotz der Entdeckung des Prionproteins (PrP) blieb die Frage lange unbeantwortet, wie sich das infektiöse Agens ohne DNA bzw. RNA replizieren kann.

Handelte es sich bei dem Krankheitserreger tatsächlich um ein Protein, so müsste er sich durch Reagenzien, die Proteine denaturieren, inaktivieren und durch anti-PrP Antikörper neutralisieren lassen. Tatsächlich gibt es Studien, die dies belegen.<sup>16-18</sup> Bald zeigte sich, dass das Protein auf einem Gen codiert ist, das in allen untersuchten Säugern vorgefunden wurde.<sup>19;20</sup> Das Gen ist die meiste Zeit aktiv, so dass der Organismus das Protein fortwährend produziert, ohne an TSE zu erkranken. Exprimiert wird das zelluläre Prionprotein (PrP<sup>C</sup>) von vielen Zell-Typen, u.a. Neuronen, Gliazellen und Lymphozyten.<sup>21-23</sup> Versuche, in denen das Gen ausgeschaltet wurde, zeigten, dass PrP-*knockout* Mäuse immun gegen eine Infektion sind, was die Bedeutung des zellulären Prionproteins für die Krankheit unterstreicht.<sup>24-26</sup> Für das PrP-Gen sind zwei Allele bekannt, die am Codon 129 entweder Methionin oder Valin codieren. Die neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit wurde nur bei Patienten beobachtet, die Met129 homozygot waren.<sup>27</sup>

Die Anwesenheit von  $PrP^{C}$  im gesunden Organismus legt nahe, dass das Protein in zwei Konformationen vorliegen kann. Die 3D-Struktur des zellulären PrP konnte bestimmt werden.<sup>28;29</sup> Eine hochaufgelöste Struktur des pathogenen Isomers (PrP<sup>Sc</sup>) ist bislang noch nicht zugänglich, doch ist bekannt, dass der β-Faltblatt Anteil in PrP<sup>Sc</sup> (43%) im Vergleich zur zellulären Variante (3%) deutlich höher ist.<sup>30</sup>

Zur Replikation der pathologischen Form des Prions werden hauptsächlich zwei Mechanismen diskutiert, bei denen die Konformationsänderung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Se</sup> durch die pathogene Isoform katalysiert wird. Prusiner postulierte das Heterodimer-Modell, in dem angenommen wird, dass ein PrP<sup>Se</sup>-Monomer ein PrP<sup>C</sup>-Molekül bindet und dessen Konformationsänderung in einer direkten Autokatalyse verursacht.<sup>31</sup> Dieses Modell setzt eine hohe Energiebarriere für den Faltungsprozess voraus, so dass ein sog. Protein X postuliert wurde, das während der Konformationsänderung als Chaperon agiert.<sup>32</sup> Das alternative Nukleations-Polymerisations–Modell von Lansbury geht von einem eindimensionalen Kettenwachstumsmechanismus mit einem vorgelagerten Gleichgewicht zwischen der zellulären und der pathologischen Form des Prionproteins aus (Abbildung 2).<sup>33</sup> Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Bildung eines stabilen Keims kritischer Größe, der dann irreversibel weitere PrP<sup>Se</sup>-Moleküle anlagert, und diese damit dem Gleichgewicht entzieht. Ein exponentieller Zuwachs von PrP<sup>Se</sup>-Einheiten kann dann angenommen werden, wenn man eine Fragmentierung der wachsenden Keime voraussetzt, die ihrerseits wiederum PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle anlagern und zu wachsenden Keimen werden.



**Abbildung 2:** Angenommene Mechanismen für die Konformationsänderung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>.<sup>34</sup> Oben: Heterodimer-Modell nach Prusiner. Unten: Nukleations-Polymerisations–Modell nach Lansbury.

Letzterer Mechanismus ist wahrscheinlicher, da er den Beobachtungen Rechnung trägt, dass erst eine Einheit von 200 kDa (PrP<sup>Sc</sup>), infektiös wirkt. Außerdem sprechen auch kinetische Berechnungen für das Modell von Lansbury, da eine autokatalytische Reaktion, wie sie von Prusiner vorgeschlagen wurde, nicht mit den schon erwähnten langen Inkubationszeiten von mehreren Jahren in Einklang zu bringen wäre. Nach dem Nukleations-Polymerisations-Modell müsste zunächst ein Schwellenwert überschritten werden, um dann zum Ausbruch der Krankheit zu führen.

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit weist nicht bei allen Patienten die gleiche Symptomatik auf. Inkubationszeiten, klinische Merkmale und Neuropathologie können differieren. Diese Charakteristik ist nicht ohne weiteres mit der "Protein-*only*-Hypothese" erklärbar, da unterschiedliche Krankheitsverläufe oft durch genetische Mutationen des Erregers hervorgerufen werden. Prusiner erklärte das Phänomen damit, dass die pathogenen Aggregate unterschiedlicher Stämme diverse Formen und Größen annehmen können, die ihrerseits die Konformationsänderung verschieden katalysieren und dazu führen, dass selektiv bestimmte Gehirnbereiche von den Ablagerungen betroffen sind.<sup>1</sup> Diese Theorie wurde durch Studien unterstützt, die zeigen, dass PrP<sup>Sc</sup> unterschiedlicher Stämme verschiedene Sekundärstrukturen aufweisen<sup>35;36</sup> und ihre Eigenschaften auf das zelluläre PrP übertragen können.<sup>37</sup> Besteht der Krankheitserreger der TSE lediglich aus dem pathogenen Konformer des Prionproteins und erfolgt seine Replikation nur durch Interaktion mit der zellulären Isoform, so müsste sich PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* aus PrP<sup>C</sup> darstellen lassen. Caughey und seine Mitarbeiter entwickelten hierzu ein zellfreies System.<sup>38</sup> Allerdings wurden nur geringe Ausbeuten erzielt, die eine Unterscheidung zwischen neu erzeugtem PrP<sup>Sc</sup> und dem zu Beginn eingesetzten pathogenen Material aus dem entstandenen Gemisch erschwerte. Hill *et al.* nutzte die Speziesbarriere aus, um zwischen eingesetztem und neu generiertem PrP<sup>Sc</sup> zu unterscheiden. Auf diese Weise konnte selektiv die Infektiosität des *in vitro* erzeugten PrP<sup>Sc</sup> gestestet werden; es erwies sich allerdings als nicht infektiös.<sup>39</sup>

Soto gelang mit der Entwicklung des protein-misfolding cyclic amplification assay (PMCA) die Darstellung von PrP<sup>Sc</sup> in vitro mit guten Ausbeuten.<sup>40</sup> Hier wird das Homogenisat eines infizierten Gehirns stark verdünnt und mit dem Homogenisat eines gesunden Gehirns versetzt. Durch Ultraschallbehandlung werden die sich bildenden PrP<sup>Sc</sup> Aggregate in kleine Einheiten gespalten, an denen sehr schnell der Konversionsprozess verläuft. In mehreren Zyklen wird das Homogenisat weiter verdünnt und mit gesundem homogenisierten Gehirn inkubiert, so dass schon nach fünf Zyklen davon ausgegangen werden kann, dass ca. 98% des Homogenisats aus neu generiertem PrP<sup>Sc</sup> besteht. Dieses PrP<sup>Sc</sup> besitzt im Vergleich zur pathogenen Isoform aus infiziertem Gehirn identische strukturelle und biochemische Eigenschaften. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Hamster, die mit dem generierten Agens infiziert wurden, die typischen Symptome der Krankheit aufwiesen und nach ca. 170 Tagen starben.<sup>41</sup> Auch wenn das *in vitro* gebildete PrP<sup>Sc</sup> aus den Versuchen von Castilla *et al.* 10-100-fach weniger infektiös ist als PrP<sup>Sc</sup> aus *scrapie*-infiziertem Gehirn, so gelang Soto und seinen Mitarbeitern hiermit erstmalig die in vitro Erzeugung von PrP<sup>Sc</sup> mit in vivo Infektiosität. Die Ergebnisse stellen somit ein weiteres Indiz für die "Protein-only-Hypothese" dar.

#### 1.1.2 Struktur und Stabilität des Prionproteins

Das Prionprotein ist ein hydrophobes Glycoprotein mit einer molaren Masse von etwa 30 kDa. Es ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI), der an S230 am C-Terminus des Proteins gebunden ist, auf der Außenseite der Zellmembran fixiert.<sup>42</sup> Die Struktur des zellulären Isomers wurde mittels NMR<sup>29;43</sup> und Kristallstrukturanalyse<sup>28</sup> aufgeklärt. Die NMR Struktur des unglycosylierten humanen PrPs zeigt einen globulären, C-terminalen Rest, der aus drei α-Helices (D144-N153 α1, N174-K194 α2 und E200-R228 α3) und zwei β-Faltblatt-Strukturen (Y128-G131 β1 und V161-Y163 β2) besteht, sowie einen

flexiblen, ungefalteten Rest am N-Terminus. Flexibler und globulärer Teil umfassen jeweils etwa 50% des Proteins. Die Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  am C-terminalen Ende sind durch eine Disulfidbrücke zwischen C179 und C214 miteinander verknüpft (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** NMR-Struktur des in *E. coli.* rekombinant exprimierten, unglycosylierten humanen Prionproteins hPrP<sup>c</sup>(23-230) bei pH 4.5.<sup>29</sup> In der Abbildung ist der flexible N-Terminus nicht gezeigt.



**Abbildung 4:** Röntgenkristallstruktur des in *E. Coli* rekombinant exprimierten hPrP<sup>C</sup>(90-231) mit einer Auflösung von 2 Å in der Stereoansicht.<sup>28</sup>

In der Kristallstruktur des unglycosylierten humanen Prionproteins liegt das Protein als Dimer vor (Abbildung 4). Die Dimerisierung ist hierbei darauf zurückzuführen, dass die Disulfidbrücke nicht wie in der NMR Struktur intramolekular, sondern intermolekular zwischen den beiden Peptidsträngen gebildet wird. Davon abgesehen sind die Strukturelemente, die über NMR- und Kristallstrukturanalyse ermittelt wurden, miteinander vergleichbar.

FTIR und CD Spektren des pathogenen Konformationsisomer ( $PrP^{Sc}$ ) zeigen einen größeren  $\beta$ -Faltblatt-Anteil als die zelluläre Form.<sup>30;44</sup> Es ist weiterhin unlöslich und liegt multimer vor, da vermutlich der größere  $\beta$ -Faltblatt-Anteil zu stärkeren intermolekularen Wechselwirkungen führt. Somit ist  $PrP^{Sc}$  für hochauflösende Strukturbestimmungsmethoden unzugänglich. Im Gegensatz zu  $PrP^{C}$ , das von der Proteinase K vollständig verdaut wird, lässt sich die pathologische Form lediglich N-terminal bis W90 verdauen.

Die N-terminale Region des Prionproteins enthält vier Kopien der hochkonservierten *octarepeat* Sequenz PHGGGWGQ, die zwischen den Aminosäureresten 60-91 der humanen Sequenz lokalisiert sind. Diese Histidin-reiche Region bietet bis zu vier Bindungsstellen für Cu<sup>2+</sup>-Ionen, die ihrerseits eine Faltung des Proteins in dieser Region hervorrufen.<sup>45-47</sup> Brown *et al.* konnten zeigen, dass in der Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen gefaltetes PrP<sup>C</sup> eine Superoxid-Dismutase ähnliche Funktion übernimmt.<sup>48</sup> Weitere Studien lassen vermuten, dass PrP<sup>C</sup> als Kupfertransport Protein fungiert.<sup>49</sup>

Das zelluläre Prionprotein ist relativ pH-stabil, lediglich die hydrophile  $\alpha$ 1-Helix ist im sauren Milieu um drei Aminosäuren verlängert.<sup>50</sup> Salze in geringer Konzentration (< 50 mM) setzen die thermische Stabilität von PrP<sup>C</sup> herab. Bei höheren Konzentrationen wurde für Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaF und NaAc der umgekehrte Effekt beobachtet, sie verhalten sich analog der Hofmeister Serie. NaCl hingegen destabilisiert das Protein in hohen Konzentrationen. Die Beobachtungen sprechen für einen starken Einfluss von elektrostatischen Wechselwirkungen auf die Stabilität des Proteins und lassen sich vermutlich auf eine Ionen-induzierte Destabilisierung der Salzbrücken zwischen D144 und R148 bzw. D147 und R151 zurückführen. Es besteht daher die Annahme, dass der  $\alpha$ 1-Helix eine entscheidende Rolle im pathogenen Faltungsprozess zukommt.<sup>51</sup> In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Methoden etabliert, die Aggregation des zellulären Prionproteins zellfrei zu induzieren. Die metallkatalysierte Oxidation durch redoxaktive Übergangsmetalle wie Kupfer, Eisen und Zink stellt eine Möglichkeit dar. Die Übergangsmetalle fungieren dabei als Elektronen-Donoren, die den im Medium befindlichen Sauerstoff zur reaktiven Spezies aktivieren. Die reaktive Spezies oxidiert unverzüglich das Protein und löst somit die Aggregation aus.<sup>52-54</sup> Auch durch Erwärmung und Druck lässt sich die Aggregation des Prionproteins auslösen.<sup>55;56</sup> Anionische Lösungsmittel wie Sarkosyl und SDS führen ebenfalls zur Bildung von PrP-Aggregaten. Kationische, zwitterionische und nicht-ionische Lösungsmittel rufen keinen derartigen Effekt hervor.<sup>57</sup> Eine Infektiosität der Aggregate, die durch die oben beschriebenen Methoden erzeugt wurden, konnte bislang allerdings nicht nachgewiesen werden.

#### 1.1.3 Glycosylierung des Prionproteins

Das Prionprotein enthält zwei N-Typ gebundene Glycosylierungsstellen an N181 und N197, welche sich im disulfidverbrückten Helix( $\alpha$ 2)-*loop*-Helix( $\alpha$ 3)-Motiv im globulären Bereich des Proteins befinden. Dabei liegt das Glycan an N181 auf der  $\alpha$ 2-Helix, während sich das Oligosaccharid, das über N197 mit dem Peptidrückgrat verknüpft ist, im Bereich der *loop* befindet. Die Analyse der Glycane lässt auf eine große Heterogenität der Glycostrukturen schließen. Es wurden 60 verschiedene di-, tri- und tetra-antennäre Oligosaccharide gefunden, die dem Komplex-Typ angehören. An etwa 70% der terminalen Galactose-Einheiten ist Sialylsäure gebunden.<sup>58;59</sup> Eine schematische Darstellung der Glycan-Strukturen ist in Abbildung 5 gezeigt, aus der sich alle gefundenen Oligosaccharide durch partiellen Abbau erzeugen lassen.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Oligosaccharidstruktur.

PrP<sup>Sc</sup> enthält verglichen mit PrP<sup>C</sup> einen größeren Anteil an tri- und tetraantennären Strukturen. Im zellulären Prionprotein ist hingegen mit größerer Wahrscheinlichkeit zusätzlich an die Position 4 der β-*D*-Mannose ein weiteres N-Acetylglycosamin gebunden (*bisected glycan*). Dieser strukturelle Unterschied der Kohlenhydratstrukturen ist vermutlich damit zu erklären, dass der Glycosylierungs-Apparat in Zellen, in denen PrP<sup>Sc</sup> gebildet wird, gestört ist. Man vermutet, dass in erkrankten Zellen die Aktivität der Glycosyltransferase GnTIII eingeschränkt ist, und als Folge höher antennäre Strukturen ausgebildet werden.<sup>60</sup> Enzyme, die beim Glycosylierungsprozess in der Zelle mitwirken und somit Einfluss auf die Glycostruktur der Proteine nehmen, reagieren oft empfindlich auf weitere Ereignisse, die in der Zelle stattfinden. Variationen der Oligosaccharidstrukturen und Glycosylierungsgrade spiegeln also häufig Veränderungen in der Zelle wider, die durch Krankheiten verursacht werden.

Im Allgemeinen steigt mit dem Glycosylierungsgrad die Stabilität der Proteine.<sup>61</sup> Korth *et al.* gelang die Expression der mono- und unglycosylierten Form des murinen Prionproteins durch Mutationen der entsprechenden Asparagine des Glycosylierungsmotivs, durch Glutamin (N180Q; N196Q).<sup>62</sup> Konversionsversuche dieser Proteine mit PrP<sup>Sc</sup> zeigten, dass der pathogene Faltungsprozess mit steigendem Glycosylierungsgrad langsamer verläuft. Neben dem Aspekt der strukturellen Stabilität des Prionproteins, wird angenommen, dass durch die beiden Glycosylierungsstellen ein großer Anteil der Proteinoberfläche abgeschirmt wird.<sup>60</sup> Somit könnten sie intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie intramolekulare Wechselwirkungen, die den flexiblen Rest des Proteins mit einbeziehen, sterisch hindern. Aus molecular dynamic (MD) Simulationen des zweifach glycosylierten humanen Prionproteins mit GPI Anker und der entsprechenden unglycosylierten Referenz geht hervor, dass die globuläre Domäne des Proteins durch die Saccharide stabilisiert wird. Als Proteinstruktur wurde hierbei ein Homologie-Modell von humanem PrP(90-231) verwendet, das auf der NMR Struktur von Hamster PrP basiert. Als Saccharide wurde die in Abbildung 5 dargestellte Struktur modelliert.<sup>63</sup> Die Stabilisierung wird dabei allerdings nicht durch direkte Interaktion der Glycane mit dem Proteinbackbone hervorgerufen, vielmehr scheinen sie die Mobilität des umgebenden Wassers zu reduzieren. In Abbildung 6 ist eine Überlagerung der gemittelten Strukturen des Glycoproteins (grau) und der unglycosylierten Referenz (schwarz) gezeigt. Das Protein ist dabei als Strang der C $\alpha$ -Atome dargestellt, wobei die Dicke des Stranges ein Ausdruck für die Flexibilität der Atome im Verlauf der Simulation ist. In der Umgebung um die Glycosylierungstelle an N197 scheint die Flexibilität der Aminosäurereste durch das Glycan eingeschränkt zu sein.<sup>63</sup> In der Abbildung ist ebenfalls zu erkennen, dass die Oligosaccharide einen großen Teil des Proteins abschirmen.

9



**Abbildung 6:** Stereoansicht einer aus MD-Rechnungen gemittelten Struktur des glycosylierten, humanen Prionproteins (K104-Ser230) (grau) überlagert mit der Struktur der unglycosylierten Referenz (schwarz). Das Protein wird als ein Strang der C $\alpha$  Atome repräsentiert, wobei die Dicke des Stranges die Beweglichkeit der C $\alpha$  Atome während der MD-Simulation widerspiegelt.<sup>63</sup>

Die Glycosylierung scheint ebenfalls einen Einfluss auf Fibrillenbildung zu haben. So konnte für das glycosylierte Peptidfragment F175-G195 der humanen Sequenz gezeigt werden, dass der Zucker die Bildung der Fibrillen deutlich verlangsamt. Chitobiose diente dabei als Modell-Saccharid.<sup>64</sup>

#### 1.1.4 Speziesbarriere

Zur Zeit sind knapp 200000 BSE-Fälle bekannt<sup>7</sup>, die Anzahl der nicht gemeldeten Infektionen ist schwer abzuschätzen. Daher ist im Zuge des Rinderwahnsinns interessant, inwieweit BSE auf andere Arten übertragbar ist. Ein Erreger, der eine bestimmte Tierart befällt, lässt sich unter Umständen auf eine andere Tierart übertragen, wobei sich meist längere Inkubationszeiten einstellen. Zur Untersuchung der sogenannten Artenbarriere haben López *et al.* die dreidimensionale Struktur des zellulären PrPs von Mensch, Rind, Hamster und Maus in Hinsicht auf räumliche Ähnlichkeiten NMR-spektroskopisch analysiert. Es stellte sich heraus, dass das zelluläre Prionprotein von Maus oder Hamster verglichen mit dem vom Rind deutliche Unterschiede in der räumlichen Ausdehnung aufweisen, weswegen BSE auf diese Arten zwar übertragen werden kann, aber dennoch eine moderate Artenschranke besteht. Die Proteine von Rind und Mensch sind sich hingegen sehr ähnlich (rmsd: 0.98 Å).<sup>29</sup>

#### 1.1.5 Therapieansätze

Die Wechselwirkung der zellulären mit der abnormen Isoform ist das Schlüsselereignis der Pathogenese. Aufgrund der Besonderheit des Krankheitserregers scheiden herkömmliche Arzneimittel wie antivirale und antibakterielle Medikamente sowie Fungizide, Hormone und Immunsuppresiva zur Behandlung der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien aus. Substanzen hingegen, die in der Lage sind, die Protein-Protein-Interaktion zu inhibieren, sind potentielle anti-TSE Wirkstoffe.

Vielversprechende Untersuchungen zeigten, dass Pentosan Polysulfat (PS), ein polyanionisches, sulfatiertes Polysaccharid, die Inkubationszeit bei Mäusen verlängern kann.<sup>65</sup> Zyklische Tetrapyrrole wie Porphyrine und Phthalocyanine binden stark und selektiv an Proteine und beeinflussen die Konformation von Proteinen. Tatsächlich wurde beobachtet, dass solche Verbindungen in vitro die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung inhibieren.<sup>66</sup> In vivo zeigten sie im Maus-Modell eine Verzögerung des Krankheitsausbruchs, falls sie zum Zeitpunkt der Infektion verabreicht wurden.<sup>67</sup> Soto und seine Mitarbeiter verfolgten das Konzept, die Bildung des pathogenen Konformationsisomers durch  $\beta$ -sheet-breaker-Peptide zu hemmen. Das 13er-Peptid iPrP13 war in der Lage, *in vitro* PrP<sup>Sc</sup> zumindest teilweise in PrP<sup>C</sup> ähnliche zurückzuwandeln.<sup>68</sup> Weitere peptidische Inhibitoren Strukturen des pathogenen Faltungsprozesses wurden diskutiert. So konnte in einem zellfreien Konversions-Assav gezeigt werden, dass die Peptidfragmente K106-Y128, M109-F141, V166-C179 und E200-Q223 der Hamstersequenz eine durch PrP<sup>Sc</sup> induzierte Konformationsänderung inhibieren können.<sup>69;70</sup> Allerdings erwies sich das Fragment K106-G126 der humanen Sequenz in vivo als zytotoxisch.<sup>71</sup> Verschiedene Peptidsequenzen sind inzwischen patentrechtlich geschützt.72-77

Untersuchungen mit anti-PrP Antikörpern lassen hoffen, dass die passive Immunisierung ein Therapieansatz sein könnte.<sup>16;18</sup> Der monoklonale Antikörper 6H4 konnte die Infektion von Neuroblastoma N2a Zellen, die zu den Zelllinien gehören, die potentiell durch PrP<sup>Sc</sup> infizierbar sind, unterdrücken.<sup>16</sup>

Vor dem Hintergrund der BSE-Krise und der daraus resultierenden, nicht abschätzbaren Anzahl an nvCJD-infizierten Menschen wird die Dringlichkeit der Suche nach anti-TSE Wirkstoffen deutlich. Die Entwicklung solcher Arzneimittel steht noch in den Anfängen.

### 1.2 Wirkstoffe

#### 1.2.1 Peptide als Wirkstoffe und Leitstrukturen

Peptide sind im menschlichen Organismus als Botenstoffe für verschiedene biologische Funktionen verantwortlich oder dienen als Enzymsubstrate. Es liegt daher nahe, Peptide oder Peptidomimetika in der Therapie einzusetzen.

Die Bioverfügbarkeit von Peptiden ist allerdings oft nicht ausreichend für Arzneimittel. Sie werden durch Proteasen im Magen-Darm-Trakt und im Serum leicht gespalten und können über die Leber und die Nieren schnell ausgeschieden werden. Weiterhin werden Peptide nach oraler Gabe meist schlecht resorbiert, im Wesentlichen bedingt durch ihre Größe. Ein weiteres Problem stellt die Flexibilität der Peptide dar, die zu schlechten Bindungskinetiken und unvorteilhaften Bindungsentropien führt.

Dennoch eignen sich Peptide als Ausgangspunkt für die Arzneimittelforschung, da sie leicht und schnell durch die automatisierte Festphasensynthese synthetisiert werden können und häufig überaus biologisch aktiv sind. Die peptidische Leitstruktur wird dann in Hinblick auf die Bioverfügbarkeit gemäß der Lipinski-Regel optimiert. Diese besagt, dass ein Wirkstoff eine schlechte orale Bioverfügbarkeit besitzt, wenn er ein Molekulargewicht von mehr als 500 g/mol, mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren oder mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren besitzt, oder der cLogP-Wert größer als fünf ist. Dabei ist der cLogP-Wert der berechnete, dekadische Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungs-koeffizienten.<sup>78</sup>

#### 1.2.2 Fluorierte Wirkstoffe

In den letzten Jahren hat sich die Anzahl von fluorierten organischen Molekülen, die kommerziellen Status als Pflanzenschutz- oder Arzneimittel erlangten, stetig erhöht. In der pharmazeutischen Industrie waren im Jahr 1990 ca. 220 fluorierte Arzneimittel auf dem Markt, was einem Anteil von 8% bezogen auf alle synthetischen Wirkstoffe entspricht. Sechs Jahre später waren es schon mehr als 1500 Arzneimittel.<sup>79</sup> In der folgenden Abbildung sind zwei von ihnen abgebildet.



Abbildung 7: Fluorierte Arzneimittel. A) Fluoxetin, ein Antidepressivum, B) Ciprofloxacin, ein Antibiotikum.

Im Prozess der Leitstrukturoptimierung hat die Einführung von Fluor in Arzneimittel aufgrund seiner physisch-chemischen Eigenschaften und als NMR-Label (Kapitel 2.1.2) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Substitution durch Fluor kann die Interaktion mit dem Rezeptor sowie die Verteilung der betreffenden Substanz im Gewebe beeinflussen. In Abhängigkeit von dem Weg, über den eine Verbindung metabolisiert wird, kann ihre Halbwertszeit durch Fluor sowohl verlängert als auch verkürzt werden. Im Vergleich zu der C-H-Bindung ist die C-F-Bindung deutlich stärker, so dass letztere Bindung gegenüber dem Angriff durch z.B. Cytochrom P450 erheblich stabiler ist.

Der van der Waals Radius von Fluor (1.47 Å) liegt zwischen dem von Sauerstoff (1.57 Å) und Wasserstoff (1.2 Å). Dennoch haben verschiedene Studien gezeigt, dass Wasserstoff generell recht bedenkenlos durch Fluor ersetzt werden kann, da es meist keine bedeutenden sterischen Hinderungen in Hinblick auf die Bindungstasche hervorruft. Bezüglich der elektronischen Eigenschaften unterscheiden sich Fluor und Wasserstoff jedoch sehr. Fluor ist das elektronegativste Element, wodurch sich bei der Substitution von Wasserstoff durch Fluor die Elektronenverteilung im Molekül ändert. Dies führt wiederum zu anderen Dipolmomenten, pK<sub>a</sub>-Werten und sogar zu veränderten chemischen Reaktivitäten und Stabilitäten der Verbindung. Weiterhin wurde gezeigt, dass einige fluorierte, funktionelle Gruppen die Lipophilie der Substanz vergrößern, und damit die Diffusion der Wirkstoffe durch die Membran verbessern.<sup>80</sup>

## 2 METHODEN

### 2.1 NMR Screening

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe erfordert verlässliche und rasche Assays, mit denen die Bindungsereignisse detektiert und gute von schlechten Liganden unterschieden werden können. Neben der Bestimmung der Dissoziationskonstanten sind aber auch Informationen über das Bindungsepitop und die Konformation des gebundenen Liganden für die rationale Wirkstoffentwicklung unerlässlich. NMR-*screening*-Methoden sind in der Lage, solche Informationen zu liefern. Tritt ein Ligand in Interaktion mit einem Protein, so können verschiedene Mechanismen oder Veränderungen von Eigenschaften ausgenutzt werden, um das Bindungsereignis mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu detektieren. Solche sind zum einen Veränderungen der chemischen Verschiebung der Protein- und/oder Ligandresonanzen. Auch Änderungen des Diffusionsverhaltens sowie der Relaxationszeit des Liganden, der Transfer von Sättigung und der Aufbau des Nuklear Overhauser Effektes (NOEs) können zur Visualisierung des Bindungsereignisses genutzt werden.<sup>81</sup>

Im Jahre 1996 entwickelten Fesik *et al.* das "SAR *by* NMR"-Verfahren (structure activity relationship). Es beruht auf der Beobachtung einer veränderten chemischen Verschiebung der Protein-Resonanzen im Falle eines Bindungsereignisses, da sich die chemische Umgebung der an der Bindung beteiligten Kerne verändert. Im Allgemeinen werden <sup>1</sup>H<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren des <sup>15</sup>N-markierten Proteins in An- und Abwesenheit des Liganden aufgenommen und miteinander verglichen.<sup>82</sup> Limitierend für dieses Verfahren ist die Proteingröße aufgrund der unvorteilhaften Relaxationseigenschaften der Makromoleküle und der Komplexität der Spektren großer Proteine (> 30 kDa). Mit Hilfe des TROSY-Verfahrens<sup>83</sup> und der Perdeuterierung der Proteine lässt sich die Grenze der noch untersuchbaren Proteine nach oben verschieben. Selektives <sup>13</sup>C-*labeling* verschiedener Aminosäuren führte weiterhin zu weniger komplexen Spektren.<sup>84</sup>

*Transient transferred* NOE Experimente können für das *screening* von Substanzgemischen eingesetzt werden. Man unterscheidet dabei zwischen dem intramolekularen trNOE, bei dem man Informationen über die Konformation des gebundenen Liganden erhält, und dem intermolekularen trNOE, über den sich die Orientierung des Liganden in der Bindungstasche ermitteln lässt. Allgemein ist die Größe und das Vorzeichen des NOEs abhängig von der Korrelationszeit und der Spektrometerfrequenz, wobei die Korrelationszeit ein Maß für die

molekulare Beweglichkeit ist. Kleine Moleküle mit kleinen Korrelationszeiten weisen einen positiven NOE auf, der bei einer Mischzeit von einigen Sekunden sein Maximum erreicht. Große Moleküle, deren Korrelationszeiten länger sind, zeigen einen negativen NOE, der sich innerhalb kürzerer Mischzeiten aufbaut (einige 100 ms).

Tritt ein kleiner Ligand in Wechselwirkung mit einem Protein, so übernimmt er die Eigenschaften des Komplexes und zeigt starke negative, intramolekulare *transferred* NOEs. Die Information über die Konformation des gebundenen Liganden wird in Form der Kreuzrelaxationsrate "gespeichert" und mit der Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes in Lösung getragen, wo sie dann mittels der Signale des freien Liganden detektiert wird.<sup>85;86</sup>

Das ursprüngliche NOE-Pumping und das davon abgeleitete Reverse NOE-Pumping (RNP) Experiment basiert auf der Tatsache, dass sich im Falle eines Bindungsereignisses zwischen Ligand und Protein die Relaxationsumgebung sowohl für den Liganden als auch für das Protein verändert. Bei dem NOE-Pumping-Experiment wird der NOE vom Protein auf den Liganden übertragen. Mittels eines Diffusionsfilters wird hierbei zunächst die Magnetisierung des Liganden zerstört. Es schließt sich eine dem NOESY-Experiment ähnelnde Mischzeit an, bei der nun das Protein abgesehen von den intramolekularen Relaxationswegen auch der über den gebundenen Liganden zur Verfügung steht, so dass die Ligandresonanzen in Abhängigkeit von der Mischzeit sichtbar werden.<sup>87</sup> Bei dem sich davon ableitenden reversen NOE-Pumping-Experiment (RNP) wird im Gegensatz dazu zunächst die Magnetisierung des Proteins durch einen T2-Filter zerstört, worauf eine NOE-Mischzeit folgt, in der der Ligand nun seinerseits über das Protein relaxieren kann. Verglichen mit einem Referenz-Experiment, in dem T<sub>2</sub>-Filter und NOE-Mischzeit miteinander vertauscht sind, weisen die Ligandsignale eine geringere Intensität auf, da die Relaxationszeit im ersten Fall kürzer ist. Die Differenz aus Referenz- und RNP-Spektrum weist nur die Resonanzen der Moleküle auf, die im engen Kontakt zum Protein stehen.88

Nach dem Stokschem Gesetz ist die Diffusionsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu dem Radius eines Teilchens. Freie Moleküle und Liganden, die an ein Protein binden, sollten sich also in ihren Diffusionskoeffizienten unterscheiden. In diffusionseditierten NMR Experimenten lässt sich dies mit Hilfe von gepulsten Feldgradienten sichtbar machen.<sup>89</sup>

Da sich im Fall einer Protein-Ligand-Interaktion die Relaxationsumgebung für den Liganden ändert, weil er nun zusätzlich über das Protein relaxieren kann, verkürzen sich seine  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten. Dies führt zu einer Linienverbreiterung der Ligand-Resonanzen, die im Vergleich mit einem Referenzspektrum des Liganden in Abwesenheit des Proteins beobachtbar ist. Über das *inversion recovery* Experiment lässt sich die  $T_1$ -Relaxationszeit, über die CarrPurcell-Meiboom-Gill-Spin-Echo Pulssequenz (CPMG) die T<sub>2</sub>-Relaxationszeit direkt bestimmen.<sup>90;91</sup>

Im WaterLOGSY (*Water-Ligand Observed via Gradient SpectroscpoY*) Experiment wird Sättigung von dem Wasser auf den bindenden Liganden übertragen. In vielen NMR Studien von Protein-Ligand-Komplexen wurde gezeigt, dass sich Wassermoleküle in der Grenzfläche befinden.<sup>92</sup> Das gebundene Wasser besitzt dort eine Residenzzeit von einigen hundert µs, was zu negativen Wasser-Ligand-NOEs führt. Freie Moleküle, die vom Wasser umgeben sind, zeigen hingegen positive NOEs. Wird ein Referenzspektrum aufgenommen, bei dem *offresonance* eingestrahlt wird, und davon ein Spektrum subtrahiert, bei dem das Wasser gesättigt wird, so entsteht ein Differenzspektrum, in dem Liganden positive und nichtbindende Moleküle negative Signale zeigen.<sup>93</sup> Der Transfer von Sättigung wird auch bei der im nächsten Kapitel beschriebenen STD NMR Spektroskopie ausgenutzt.

#### 2.1.1 STD NMR

Das *saturation transfer difference*-Experiment (STD) ist bereits schon in den frühen 60-iger Jahren beschrieben worden, diente hier aber der Charakterisierung von Bindungsereignissen, bei denen ein langsamer Austausch vorliegt.<sup>94;95</sup> Dieses Verfahren wurde 1999 von Mayer und Meyer erstmals für das *screening* von Substanzbibliotheken auf bindungsaktive Substanzen und für die Bestimmung des Bindungsepitopes eingesetzt.<sup>96;97</sup>

Das Prinzip des STD NMR-Verfahrens ist in Abbildung 8 dargestellt. Ist der Austausch des Liganden an einer Rezeptorbindungsstelle schnell in Relation zur NMR-Zeitskala, kann intermolekular Sättigung von dem Protein auf den Liganden übertragen werden. Dazu wird das Protein selektiv mit einer Kaskade von Gausspulsen über einen Zeitraum von einer bis vier Sekunden gesättigt. Dies ist möglich, da die Proteinsignale aufgrund ihrer kurzen T<sub>2</sub>-Relaxationszeit sehr breit sind, und daher Einstrahlpunkte außerhalb des spektralen Bereiches der zu untersuchenden Liganden gefunden werden können. Einstrahlpunkte bei ca. -1 ppm erwiesen sich häufig als geeignet. Die Sättigung wird durch die Spindiffusion über das gesamte Protein verteilt. Bei der Spindiffusion handelt es sich um einen indirekten Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen über einen dritten. Sie tritt dann auf, wenn die Kreuzrelaxationsrate groß gegenüber der T<sub>1</sub>-Relaxationszeit ist. Daher ist die Verwendung der STD NMR-Spektroskopie auf Proteine begrenzt, die ein Molekulargewicht von über ca. 10 kDa und globuläre Struktur besitzen, da bei kleineren Makromolekülen die Spindiffusion nicht effektiv genug ist.



Abbildung 8: Prinzip der STD NMR Spektroskopie.

Tritt ein Molekül in Wechselwirkung mit dem Rezeptor, wird die Sättigung auf den Liganden übertragen. Bei Dissoziation des Komplexes wird sie in Lösung getragen und dort detektiert. Die Signalintensitäten der bindenden Liganden sind in diesem *on-resonance* Spektrum geringer gegenüber einem Spektrum, bei dem *off-resonance* eingestrahlt wird. Die Differenz zwischen dem *off-resonance-* und dem *on-resonance-*Spektrum, ergibt das STD-Spektrum, in dem nur die Resonanzen der bindenden Moleküle beobachtbar sind. Im herkömmlichen Pulsprogramm werden die *off-* und *on-resonance* Spektren intern über den Phasenzyklus abgezogen.<sup>98</sup> Zur Unterdrückung der Proteinsignale, die im STD-Spektrum ebenfalls auftreten und gegebenenfalls zu Signalüberlagerungen mit Ligandsignalen führen, wird ein T<sub>1</sub> $\rho$ -Filter verwendet. Das HDO-Signal wird durch eine WATERGATE-Pulssequenz unterdrückt.

Zusätzlich zu der Detektion des Bindungsereignisses kann das Bindungsepitop der Liganden bestimmt werden. Protonen, die sich in räumlicher Nähe zum Protein befinden, erhalten einen höheren Grad an Sättigung als jene, die einen größeren Abstand zum Protein einnehmen.

Bei der Bestimmung des Bindungsepitops muss allerdings berücksichtigt werden, dass die experimentellen STD-Effekte von dem Sättigungsauf- bzw. abbau abhängen. Bei langer T<sub>1</sub>-Relaxationszeit fließt die Sättigung nur langsam ab, so dass große STD-Intensitäten resultieren, die einen zu kleinen Abstand zum Protein vortäuschen. Ist die T<sub>2</sub>-Relaxationszeit im Protein-Ligand-Komplex sehr kurz relativ zur Residenzzeit des Liganden in der Bindungstasche, verteilt sich die Sättigung gegebenenfalls sehr schnell über den gesamten Liganden, so dass sich die STD-Effekte einander angleichen, und die Bestimmung des Epitops nicht mehr

möglich ist. Für die Größe der STD-Intensität ist ebenfalls die Bindungskinetik entscheidend. Für das Dissoziationsgleichgewicht gilt:

$$[PL] \xrightarrow{K_{off}} [P] + [L]$$

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$
GI. 1

Mit: [P] = Proteinkonzentration; [L] = Ligandkonzentration; [PL] = Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes;  $k_{on}$  = Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion;  $k_{off}$  = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation.

Kleine *off-rates* führen dazu, dass nicht genügend Ligandmoleküle im Verlauf der Sättigungszeit die Bindungstasche erreichen, der Durchsatz also gering ist. Bei sehr großen *on*und *off-rates* reicht die Residenzzeit nicht für den Transfer von Sättigung aus. Für den Fall, dass die Assoziationsreaktion diffusionskontrolliert verläuft beträgt  $k_{on}$  ca.  $10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . In Abhängigkeit vom K<sub>D</sub>-Wert lässt sich dann  $k_{off}$  abschätzen. Für STD-Messungen sollte  $k_{off}$ größer als 1 s<sup>-1</sup> sein.

Durch die Aufnahme von Titrationskurven lassen sich mittels STD NMR Spektroskopie auch Dissoziationskonstanten ermitteln. Dazu werden bei verschiedenen Ligandkonzentrationen die STD-Effekte durch Vergleich mit dem *off-resonance*-Spektrum bestimmt und daraus der STD-Amplifikationsfaktor (STD<sub>Ampl</sub>) nach der Gleichung 2 berechnet. Der Amplifikationsfaktor dient der Quantifizierung des Durchsatzes an Ligandmolekülen und ist das Produkt aus dem prozentualen STD-Effekt und dem Ligandüberschuss.

$$STD_{Ampl.} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \frac{[L]_{total}}{[P]_{total}}$$
Gl. 2

Mit:  $I_0$  = Signalintensität im *off-resonance*-Spektrum;  $I_{sat}$  = Signalintensität im *on-resonance*-Spektrum und  $I_0$  -  $I_{sat}$  = Signalintensität im STD-Spektrum;  $[L]_{total}$ =Gesamtligandkonzentration;  $[P]_{total}$ =Gesamtproteinkonzentration

Wird dieser Amplifikationsfaktor gegen die Ligandkonzentration aufgetragen, so ergibt sich im Falle einer spezifischen Bindung eine Kurve, die unter der Voraussetzung eines *one-site-binding* Modells an die Gleichung 3 gefittet werden kann. Aus dem Fit ergibt sich dann der K<sub>D</sub>-Wert.

$$STD_{Ampl.} = \frac{STD_{Ampl.(max)} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$
Gl. 3

Das STD-NMR-Verfahren ist nicht nur auf Systeme mit löslichem Protein beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass auch Protein-Ligand-Systeme, bei denen das Protein auf *controlled pore glass-beads* (CPG) immobilisiert ist, mittels HRMAS-STD untersucht werden können.<sup>99</sup>

Die Durchführung von Bindungsstudien an Membranproteinen ist oft nicht trivial, da diese Proteine, wenn sie aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst werden, meist ihre Struktur und damit Funktionalität verlieren. Meinecke und Meyer gelang die Untersuchung der Interaktion zwischen in Liposomen eingebettetem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und dem Pentapeptid Cyclo(RDGfV) mit Hilfe der STD NMR Spektroskopie.<sup>100</sup> Die Verwendung einer kürzlich entwickelten *double-difference*-Methode erlaubte die Bindungsstudie zwischen den gleichen Komponenten an intakten Thrombozyten.<sup>101</sup>

#### 2.1.2 Fluor-NMR Screening

Wie bereits im Kapitel 1.2.2 erwähnt dient die Einführung von Fluor in Medikamente unter anderem der <sup>19</sup>F-Markierung für Fluor-NMR-Experimente. Fluor ähnelt in seinen Kernresonanzeigenschaften dem Proton. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit von <sup>19</sup>F (100%) und einem gyromagnetischen Verhältnis von  $\gamma_F = 25.181 \cdot 10^7 \text{ rad/Ts}$  ( $\gamma_F \sim 0.94 \gamma_H$ ) ist die Empfindlichkeit der NMR-Experimente denen des Protons ähnlich.<sup>102</sup> Bei einer Magnetfeldstärke von 11.67 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 500 MHz für Protonen, liegt die Larmorfrequenz von Fluor also bei 470 MHz. Die spektrale Breite der Fluorresonanzen verschiedener Verbindungen umfasst ca. 900 ppm, wodurch es zu wenig Signalüberlagerungen kommt.<sup>103</sup> Für das *screening* von <sup>19</sup>F-markierten Liganden in biologischen Systemen stellen <sup>19</sup>F-NMR-Spektren eine gute Alternative zu Protonen-Spektren dar, da das biologische System und protonierte Lösungsmittel keine störenden Hintergrund-Signale hervorrufen. Die resultierenden Spektren sind daher leicht zu interpretieren.

Fluorkerne reagieren sehr stark auf Änderungen ihrer chemischen Umgebung, wie sie im Fall eines Bindungsereignisses eintreten (*chemical shift anisotropy, CSA*). Im Fall eines langsamen Austausches können die Signale des gebundenen und des freien Liganden getrennt von einander beobachtet werden. Unter langsamen Austausch versteht man hier, dass die Austauschrate kleiner ist als die Frequenzdifferenz zwischen freiem und gebundenem Zustand. Die Integration der Signale liefert direkt die Dissoziationskonstante des Dissoziationsgleichgewichtes.<sup>104</sup> Austauschraten und Gleichgewichtskonstanten können im Fall eines schnellen Austausches auch über die Linienbreiten der Signale ermittelt werden.<sup>105</sup>

Basierend auf der außergewöhnlich großen Anisotropie der chemischen Verschiebung, die für Fluorkerne beobachtet wird, wurde von Dalvit und seinen Mitarbeitern die FAXS- Strategie (fluorine chemical shift anisotropy and exchange for sreening) entwickelt.<sup>106;107</sup> Das screening von Substanzbibliotheken wird dabei in Gegenwart eines fluorierten "Spion-Moleküls" in Form eines Kompetitions-Experiments durchgeführt. Der "Spion" sollte ein schwacher Ligand des betreffenden Rezeptors sein und im schnellen Austausch mit dem Protein wechselwirken. Die durch CSA verursachte Relaxation wächst mit der Zunahme der Feldstärke und mit steigender Korrelationszeit des betreffen Moleküls oder Komplexes.<sup>108</sup> Daher ist die Signalintensität des Spions im Falle einer Interaktion mit dem Rezeptor klein. Sind in dem zu untersuchenden Gemisch bindende Liganden mit  $K_D(Ligand) \le K_D(Spion)$  enthalten, wird der Spion aus der Bindungstasche verdrängt, und die Intensität des Signals nimmt zu. Zusätzlich wird ein Kontroll-Molekül eingesetzt, dass keinerlei Wechselwirkung mit dem Rezeptor eingeht. Bindungsereignisse zwischen der Substanzbibliothek und dem Protein werden durch das Verhältnis der Signalintensitäten von Spion- zu Kontroll-Molekül visualisiert. Somit können mit dieser Methode Substanzen auf Bindungseigenschaften untersucht werden, die kein Fluoratom enthalten.

Ebenfalls von Dalvit und seinen Mitarbeitern wurde ein biochemischer Assay auf der Grundlage von  $1D^{-19}F$ -Experimenten beschrieben.<sup>109</sup> Für die sogenannte 3-FABS-Methode (*three fluorine atoms for biochemical screening*) wird in das Substrat eine CF<sub>3</sub> eingeführt. Da die Fluorresonanzen sehr empfindlich auf ihre chemische Umgebung reagieren, sollten im Idealfall Substrat und Produkt zwei separierte Signale zeigen. Diese Methode ist somit ein geeignetes Hilfsmittel zur Identifizierung und Optimierung von Leitstrukturen. Mit Hilfe von Titrationsreihen lassen sich die Michaelis-Menten-Konstanten der Substrate berechnen, indem man die Signalintensität des Produkts gegen die Substrat-Konzentration aufträgt und die resultierende Kurve mathematisch an eine der Gleichung 3 analogen Formel anpasst. Problematisch ist allerdings, dass die CF<sub>3</sub>-Markierung die Bindungseigenschaften des Substrates verändern kann.

#### Heteronuklearer Sättigungstransfer

Für den schnellen Austausch wäre die Aufnahme von <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD Spektren denkbar, bei denen die Protonen des Proteins selektiv gesättigt würden. Der Sättigungstransfer verliefe dann von den Proteinprotonen auf die Fluorkerne des Liganden, deren Resonanzen schließlich beobachtet würden (Abbildung 9). Die große spektrale Weite der Fluorresonanzen und die geringe Anzahl von Signalen würden zu gut interpretierbaren 1D-Spektren mit wenig Signalüberlagerungen führen. Der Vorteil eines solchen Experimentes im Vergleich zu der

oben beschriebenen FAXS-Strategie ist, dass kein geeignetes Spion- oder Kontroll-Molekül im Vorwege gefunden werden muss.  ${}^{19}F{}^{1}H$ -STD Spektren zeigen direkt die Signale der bindenden Liganden, so dass eine Dekonvolution der Bibliothek bei eindeutiger Zuordnung der Signale nicht notwendig ist.



**Abbildung 9:** Prinzip des <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiments.

Für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD Experiment wird im Folgenden der theoretische Hintergrund diskutiert. Der Mechanismus des Sättigungstransfers entspricht dem des NOEs. Für die Fragestellung, ob der heteronukleare Sättigungstransfer zwischen Protein und Ligand theoretisch möglich ist, ist demnach zunächst zu klären, wie sich der heteronukleare NOE (HOE) bei den großen Korrelationszeiten verhält, die für Rezeptor-Ligand-Komplexe üblich sind. Da im STD-Experiment das Protein über einen Zeitraum von ca. 2s gesättigt wird, gleicht es dem *steadystate*-NOE Differenz-Experiment. Die Solomon-Gleichung (4) für den NOE beschreibt die Verstärkung des Signals von Kern I bei Sättigung von S in folgender Weise:

$$f_{I}\{S\} = \frac{\gamma_{S}}{\gamma_{I}} \cdot \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}}$$
GI. 4

mit:

$$\sigma_{IS} = W_{2IS} - W_{0IS} = \frac{1}{10} K^2 \tau_c \left[ \frac{6}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} - \frac{1}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} \right]$$
GI. 5

$$\rho_{IS} = W_{0IS} + 2W_{1IS} + W_{2IS} = \frac{1}{10}K^2\tau_c \left[\frac{1}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_I^2\tau_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2\tau_c^2}\right]$$
GI. 6

Wobei gilt:  $f_{I}{S}$  = Verstärkung des Signals von Kern I bei Sättigung von S,  $\gamma_{s}$  = gyromagnetisches Verhältnis des Kerns I,  $\sigma_{IS}$  = Kreuzrelaxationsrate,  $\rho_{IS}$  = direkte dipolare Relaxation,  $W_{2IS}$  = Zweiquantenübergangswahrscheinlichkeit,  $W_{0IS}$  = Nullquantenübergangswahrscheinlichkeit,  $W_{1/S}$  = Einquantenübergangswahrscheinlichkeit,  $K = (\mu_{0}/4\pi)\hbar \gamma_{I} \gamma_{S} r_{IS}^{-3}$ ,  $\tau_{c}$  = Korrelationszeit,  $\omega_{I}$  = Larmorfrequenz von Kern I und  $\omega_{S}$  = Larmorfrequenz von Kern S.

Gemäß der Gleichung 4 ist die Verstärkung von dem Verhältnis der gyromagnetischen Verhältnisse der beteiligten Kerne abhängig. Des Weiteren gehen die Kreuzrelaxationsrate des Zweispinsystems  $\sigma_{IS}$ , die den NOE-Aufbau beschreibt, und die direkte dipolare Relaxation  $\rho_{IS}$ , die für den NOE-Abbau verantwortlich ist, in die Gleichung ein. Die Kreuzrelaxationsrate und die direkte dipolare Relaxation lassen sich ihrerseits durch die Larmorfrequenzen der einzelnen Kerne und die Korrelationszeit des Systems beschreiben.

Der Zusammenhang zwischen dem maximalen NOE und dem Produkt aus Korrelationszeit des Systems und der Spektrometerfrequenz für ein  $X{^{1}H}$ -Experiment ist in Abbildung 10 gezeigt.



**Abbildung 10:** Abhängigkeit des maximalen theoretischen NOE von  $\omega_X \tau_c$  in einem X{<sup>1</sup>H}-Experiment.<sup>108</sup>

Der HOE zwischen Fluor und Protonen verhält sich wie der homonukleare NOE des <sup>1</sup>H-Kerns. Ist das Produkt aus Korrelationszeit und Spektrometerfrequenz gleich eins, so nehmen die Wahrscheinlichkeiten für den Null- und den Zweiquantenübergang den gleichen Wert an, und es ist kein HOE-Effekt beobachtbar (Nulldurchgang der Kurve). Für die Grenzfälle des *extreme narrowing limit* ( $\omega \tau_c \ll 1$ , sehr kleine Moleküle) und des *spin diffusion limit* ( $\omega \tau_c \gg 1$ , sehr große Moleküle) werden die maximalen NOEs +0.5 bzw. –1. Der Nulldurchgang liegt bei einer Spektrometerfrequenz von 500 MHz bei einer molekularen Masse von 1000-1500 Da (dies ist eine grobe Abschätzung für kugelförmige Moleküle ohne Berücksichtigung der Hydratisierung).

Der entsprechende HOE zwischen dem <sup>13</sup>C- bzw. <sup>31</sup>P-Kern und Protonen hingegen strebt mit steigendem  $\omega \tau_c$  gegen null. Demnach ist der heteronukleare Sättigungstransfer für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD Experiment denkbar, während ein entsprechendes Experiment für Kohlenstoff und Phosphor theoretisch nicht möglich ist.

### 2.2 Konformationsanalyse von Peptiden

Peptidische Leitstrukturen dienen oft als Ausgangspunkt für die Arzneimittelforschung. Sie enthalten allerdings viele frei drehbare Bindungen, so dass eine konformelle Vielfalt resultiert. Häufig ist die energetisch günstigste und damit die wahrscheinlichste dreidimensionale Gestalt eines Moleküls in Hinblick auf Struktur-Wirkungsbeziehungen von großem Interesse. Bei Verwendung klassischer Kraftfelder ist der abzusuchende Konformationsraum für Peptide und Proteine sehr groß, so dass für realistische Strukturen experimentelle Daten zu Hilfe genommen werden müssen. Hauptsächlich werden zwei Verfahren für die Bestimmung dreidimensionaler Strukturen von Liganden und Proteinen genutzt: die Kristallstrukturanalyse und die hochauflösende NMR-Spektroskopie. Im Folgenden soll nur auf die NMR-Analyse eingegangen werden.

NMR-Daten liefern Informationen über Bindungswinkel und intramolekulare, interatomare Abstände. Die Konformation des Peptidrückgrats lässt sich durch die Winkel  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  ausdrücken. Die Winkel  $\chi_n$  legen die Orientierung der Seitenkette fest (Abbildung 11).<sup>110</sup>



**Abbildung 11:** Peptidrückgrat und die dazu gehörigen Diederwinkel  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$ ,  $\chi_1$  und  $\chi_2$ .<sup>110</sup>

Da die skalaren <sup>3</sup>*J*-Kopplungskonstanten von dem Diederwinkel abhängen, lassen sich die entsprechenden Winkel aus dem NMR Spektrum über Kopplungskonstanten zwischen den betreffenden Protonen bestimmen. Der Zusammenhang zwischen der Kopplungskonstante und dem Diederwinkel wird durch die Karplus-Gleichung angegeben:<sup>111</sup>

$$^{3}J = A\cos^{2}\theta + B\cos\theta + C$$
 Gl. 7

Hierbei ist  $\theta$  der Diederwinkel. A, B und C sind Karpluskoeffizienten, welche empirische Konstanten sind. Mit Hilfe von quantenmechanischen Rechnungen und empirischen Parametrisierungen wurden Karpluskoeffizienten für bestimmte molekulare Systeme erhalten. Die für Peptide parametrisierte Karplus-Gleichung lautet:<sup>110</sup>

$${}^{3}J_{HNH\,\alpha}(\phi) = 6.7\cos^{2}(\phi - 60^{\circ}) - 1.3\cos(\phi - 60^{\circ}) + 1.5$$
 GI. 8

Das Auflösen der Gleichung nach \u03c6 führt zu:

$$\phi = 60^{\circ} \pm ar \cos\left[\frac{1.3}{13.4} \pm \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)}\right]$$
GI. 9

Bei der Analyse der <sup>3</sup>*J*-Kopplungskonstanten muss berücksichtigt werden, dass die Lösung der Karplus-Gleichung nicht eindeutig ist. Es ergeben sich für eine Kopplungskonstante bis zu vier Möglichkeiten für den entsprechenden Diederwinkel. Allerdings bestehen für  $\phi$  und  $\psi$  bestimmte Einschränkungen, wie Ramachandran anhand von *hard sphere* Modellen zeigen konnte.<sup>112</sup> Die erlaubten Winkel werden im Ramachandranplot dargestellt (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Ramachandranplot mit den erlaubten Werten für die  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel.

Neben der skalaren Kopplung tritt die dipolare Kopplung auf, die unabhängig von Bindungselektronen durch den Raum wirkt. Anhand des Nuklear Overhauser-Effektes lassen sich in einem Molekül interatomare Abstände bestimmen. Wird die Resonanz eines Protons durch selektives Einstrahlen gestört, befindet sich das System nicht mehr im thermodynamischen Gleichgewicht. Es ist bestrebt, unter Nutzung aller möglichen Relaxationswege dorthin zurückzukehren. Für das Entstehen des NOE-Effektes sind Nullquanten- und Zweiquantenübergänge verantwortlich, deren Wahrscheinlichkeiten direkt von den Abständen der beteiligten Kerne abhängen. Die Solomon-Gleichung beschreibt den Intensitätszugewinn eines Kernes I bei Sättigung des Kerns S (Gleichung 4-6). Sobald man NOE-Effekte für mehr als eine gestörte Resonanz messen möchte, bietet sich das NOESY-Spektrum an. Es handelt sich um ein 2D-Verfahren, in dem ein transienter NOE beobachtet wird, d.h. die Störung wird durch eine einmalige Besetzungsinversion in das System hineingetragen. Danach finden gleichzeitig der NOE-Aufbau und der NOE-Abbau durch weitere Relaxationswege statt. Die Intensität des NOE-Effektes durchläuft also in Abhängigkeit von der Mischzeit des Experiments ein Maximum. Durch die 2D-Pulssequenz werden die NOE-Effekte für alle Protonenpaare gleichzeitig detektiert.<sup>108</sup> Die Abhängigkeit des maximalen  ${}^{1}H{}^{-1}H{}^{-NOE}$  vom Produkt aus der Spektrometerfrequenz  $\omega$  und der Korrelationszeit  $\tau_c$  wurde in Abschnitt 2.1.2 anhand des  ${}^{19}F{}^{1}H$ -HOEs erklärt. Die entsprechende NOE-Kurve für den heteronuklearen  ${}^{19}F{}^{1}H{}$ -NOE ist in Abbildung 10 gezeigt. Zur Bestimmung der interatomaren Abstände werden NOESY-Spektren mit unterschiedlichen Mischzeiten aufgenommen. NOE-Aufbaukurven erhält man durch Auftragung der Peakvolumina (Vcrosspeak) gegen die Mischzeit. Es lässt sich zeigen, dass der NOE-Auf- und Abbau im Idealfall einer doppelt exponentiellen Kinetik der Form:

$$V_{crosspeak} = p_0 \cdot e^{-p_2 t_m} \cdot (1 - e^{-p_1 t_m})$$
 GI. 10

folgt, wobei  $t_m$  die Mischzeit des NOESY-Experiments ist. Der Fit der experimentell bestimmten Daten an die Gleichung 10 ergibt die Parameter  $p_0$ ,  $p_1$  und  $p_2$ . Aus dem Produkt von  $p_0$  und  $p_1$  erhält man die Kreuzrelaxationsrate  $\sigma_{IS}$ , die ihrerseits im direkten Zusammenhang zum Protonenabstand  $r_{IS}$  steht:

$$\sigma_{IS} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{IS}^{-6}} \left( \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^{-2}} - \tau_c \right)$$
GI. 11

Da die Korrelationszeit des Moleküls meist unbekannt ist, ermittelt man die Abstände im Allgemeinen bezüglich eines Referenzabstandes gemäß der Gleichung 12:

$$r_{IS} = r_{ref} \left(\frac{\sigma_{ref}}{\sigma_{IS}}\right)^{-6}$$
Gl. 12

Dabei ist  $\sigma_{ref}$  die Kreuzrelaxationsrate und  $r_{IS}$  der interatomare Abstand des Referenzprotonenpaars. Als Referenz eignen sich geminale Protonen oder Protonen in *ortho*-Position am aromatischen Ring, da ihre Abstände konstant sind. Bei der Berechnung der Abstände über die Gleichung 12 muss berücksichtigt werden, dass gegebenenfalls mehr als

zwei Protonen an dem Kreuzsignal beteiligt sind. In diesem Fall müssen die ermittelten Abstände mit Korrekturfaktoren multipliziert werden (Tabelle 2).<sup>108</sup>

| Tabelle 2: Korrekturfaktoren zur Berichtig | ung von Abständen, | , die sich aus k | Kreuzsignalen | ergeben, ar |
|--|--------------------|------------------|---------------|-------------|
| denen mehr als zwei Protonen teilhaben.    |                    |                  |               |             |

| Beteiligte Protonen | Korrekturfaktor |
|---------------------|-----------------|
| HH2                 | 1.05            |
| HH3                 | 1.07            |
| H2H2                | 1.12            |
| H2H3                | 1.16            |
| H3H3                | 1.20            |

Die NMR-Daten erlauben zwar die Bestimmung einer 3D-Struktur, die räumliche Darstellung des Molekül entspricht aber dem zeitlichen Mittel aller möglichen Konformationen.

Um die aus den NMR-Experimenten erhaltenen Informationen in Raumkoordinaten der Atome zu "übersetzen", wurden *distance geometry* (DG) Algorithmen entwickelt<sup>113</sup>, in die die NMR-Daten als Beschränkungen (*constraints*) einfließen. Das hier verwendete Programm DYANA<sup>114</sup> zählt nicht zu den klassischen Vertretern der DG-Verfahren. Es berechnet aus den eingesetzten Distanz- und Winkelbeschränkungen Konformationen, die den Anforderungen des ECEPP-Kraftfeldes genügen.<sup>115</sup> Dies führt zu einer Minimierung der Rechenzeit. Weiterhin werden realistische Bindungslängen und -winkel eingehalten. Die zunächst zufällig generierten Strukturen werden in mehreren Zyklen durch Variationen der Diederwinkel an die vorgegebenen Abstandsbedingungen angepasst. Ein Maß für die Güte der erzeugten 3D-Struktur ist die Zielfunktion, die umso kleinere Werte annimmt, je besser die Vorgaben erfüllt sind. Allerdings werden energetische Aspekte in DG-Rechnungen nicht berücksichtigt.

Häufig koppelt man die Erzeugung des Strukturmodells mit Moleküldynamiksimulationen. Diese Rechungen liefern Moleküle in den energiegünstigsten und den *constraints* genügenden 3D-Strukturen. Die aus den DG-Berechnungen resultierenden Konformationen können hierbei als Startstrukturen dienen. Das in dieser Arbeit verwendete Moleküldynamik (MD)-Simulationsprogramm basiert auf der Integration der Bewegungsgleichung von Newton, die die zeitliche Änderung eines Ortsvektors in Abhängigkeit von dem Potential und der Masse des Teilchens beschreibt. Beim Start der Simulation wird dem System eine Temperatur zugewiesen. Die Atome bewegen sich innerhalb eines Kraftfeldes, wobei nach kurzen Zeitabständen die Kräfte neu berechnet werden. Man erhält so eine Trajektorie von Konformationen als Funktion der Zeit. Durch die vorgegebene Temperatur können Energiebarrieren von  $k_bT$  pro Freiheitsgrad abgetastet werden.
## 2.3 Oberflächenplasmonenresonanz

Die Firma Biacore (Uppsala, Schweden) entwickelte Anfang der neunziger Jahre ein auf der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance* SPR) beruhendes Sensorchip-Messystem, mit dem biospezifische Bindungsereignisse in Echtzeit untersucht werden können.<sup>116</sup> Die Methode ist sehr empfindlich und verlangt daher nur geringe Substanzmengen. Geräteabhängig können nicht nur Proteine als Rezeptoren, sondern auch größere Systeme wie Viren<sup>117</sup>, Bakterien<sup>118</sup> oder Zellen<sup>119</sup> eingesetzt werden. Gegenüber den klassischen biochemischen Assays besteht der Vorteil der SPR-Messungen darin, dass keiner der Bindungspartner mit einer Sonde markiert werden muss, allerdings ist eine Komponente auf einem Sensorchip zu immobilisieren.

Die physikalischen Grundlagen des SPR-Experiments wurden schon 1959 von Turbadar beschrieben.<sup>120</sup> Oberflächenplasmonenresonanz ist ein Phänomen, das auftritt, wenn Licht von dünnen Metallfilmen reflektiert wird. Fällt das Licht unter einem bestimmten Winkel ein, so kann ein Teil der Lichtenergie mit den delokalisierten Elektronen im Metallfilm wechselwirken, so dass die Intensität des reflektierten Lichts geringer ist als die des einfallenden Lichtes. Der exakte Einfallswinkel, bei dem dies geschieht, ist bei monochromatischem Licht abhängig von den Brechungsindices des optisch dichteren und dünneren Mediums. In Abbildung 13 ist der Versuchsaufbau des SPR-Experiments schematisch dargestellt.



Abbildung 13: Schematische Darstellung des SPR-Experiments.

Das optisch dichtere Medium ist bei dem Biacore-Chipsystem ein mit einem Goldfilm bedeckter Glasträger; das optisch dünnere Medium stellt eine Flusszelle dar. Eine Komponente des biologischen Systems wird auf der Sensorchip-Matrix immobilisiert, während der Bindungspartner in gelöster Form entlang der Flusszelle darüber geleitet wird. Im Falle einer Interaktion mit der immobilisierten Komponente verändert sich der Brechungsindex des optisch dichteren Mediums, so dass sich der Winkel, unter dem Oberflächenplasmonenresonanz auftritt, verändert. Die Verschiebung des Intensitätsminimums der Totalreflexion in Abhängigkeit des Winkels wird in Echtzeit gemessen. Winkeländerungen von bis zu 10<sup>-4</sup> Grad können mit den kommerziell erhältlichen Geräten von Biacore aufgelöst werden. Als Signal wird die Veränderung des SPR-Winkels in RU (*response unit*) ausgegeben, wobei die Differenz zwischen Mess- und einer Referenzzelle, die eigentliche Messkurve darstellt. Ein Differenzwert von eins entspricht einer Masse von ca. 1 pg gebundener Substanz.

Zur Immobilisierung der Substanzen stehen diverse Chipoberflächen zur Verfügung. Für die Immobilisierung von Peptiden und Proteinen hat sich die kovalente Fixierung über eine Dextran-Matrix als vorteilhaft erwiesen. An die Carboxylfunktion der carboxymethylierten Dextran-Matrix wird dabei das Protein oder das Peptid über freie Aminogruppen gekuppelt.

Ein weiterer Chiptyp trägt auf der Oberfläche Nitrilotriessigsäure (NTA), welche Nickel (II) in einem Chelat-Komplex bindet. Das Protein kann dann über Histidin-Seitenketten an das Nickel-Ion koordiniert werden. Der Chip bietet sich für Proteine mit His-*tag* an.

Wird über die immobilisierte Komponente eine gelöste Substanz geleitet, steigt der RU-Wert, sofern eine Wechselwirkung stattfindet (Assoziation). Mit Beendigung der Injektion beginnt die Dissoziation, so dass die gemessene Antwort idealerweise wieder ihren Ausgangswert erreicht. Zur vollständigen Regeneration ist es manchmal notwendig, Regenerationslösungen einzusetzen. Solche Lösungen können verdünnte Säuren sein. Ein Sensorgramm ist beispielhaft in Abbildung 14 gezeigt.



**Abbildung 14:** Idealisierte Darstellung einer Assoziations- und Dissoziationskurve wie sie aus der SPR-Messung hervorgeht.

SPR-Experimente ermöglichen die Bestimmung kinetischer sowie thermodynamischer Daten des Bindungsereignisses. So sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion ( $k_{on}$  und  $k_{off}$ ) durch Anpassen des Sensorgramms an die Langmuir-Gleichung zu ermitteln. Im Falle einer spezifischen Wechselwirkung sollte das Sensorgramm mit der Zeit einen Sättigungswert erreichen. Die Auftragung der Sättigungswerte gegen die jeweilige Ligandkonzentration ergibt eine Kurve, die unter der Annahme, dass die Bindungsreaktion dem *one-site-binding* Modell folgt, an folgende Gleichung angepasst werden kann:

$$RU = \frac{RU_{\text{max}} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$
Gl. 13

 $C_B$  ist dabei die Konzentration der gelösten Komponente und RU<sub>max</sub> der theoretische Gleichgewichtswert bei unendlich hoher Ligandkonzentration. Aus dem Fit ist die Dissoziationskonstante der Interaktion erhältlich.

Die Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Bindungsparameter ist allerdings nicht immer unproblematisch. Sehr schnelle Bindungskinetiken ( $k_{on} > 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} > 10 \text{ s}^{-1}$ ) sind nicht durch Analyse des Sensorgramms auswertbar, da die Datenrate der Biacore-Geräte nur etwa 10 Hz beträgt. Für fehlerhafte Ergebnisse können auch sog. Rückbindungseffekte verantwortlich sein, die zu einer Verringerung der beobachteten Dissoziationsrate führen. Dieses Phänomen lässt sich durch niedrige Belegungen des Sensorchips minimieren.

### 2.4 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS) liefert Informationen über die Größenverteilung von Teilchen in Lösung und ist somit eine wichtige Methode, um Aggregationen zeitlich zu verfolgen. Dabei lassen sich Teilchengrößen von Nanometern bis Mikrometern bestimmen.

Strahlt man mit einem Laser auf eine gelöste Probe, so wird ca. 1% des Lichts an den gelösten Molekülen gestreut. Je nach Bewegung der streuenden Partikel kommt es zu einer destruktiven oder konstruktiven Interferenz des gestreuten Lichtes in Abhängigkeit von der relativen Position der streuenden Teilchen zueinander. Dies führt zu zeitabhängigen Fluktuationen der Streuintensität, die als sogenannte Zählrate gemessen und der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen durch das Medium zugeordnet werden kann. Man erhält die Diffusionskoeffizienten, aus denen sich über die Stokes-Einstein-Beziehung die hydrodynamischen Radien der diffundierenden Partikel ergeben:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h}$$
GI. 14

mit: D = Diffussionskoeffizient, k = Boltzmannkonstante, T = Temperatur,  $\eta$  = Viskosität des Mediums und  $r_h$  = hydrodynamischer Radius des diffundierenden Partikels.<sup>121</sup>

Unter der Annahme eines sphärischen Teilchens lässt sich daraus über die Gleichung 15 das durchschnittliche Molekulargewicht des Partikels berechnen:

$$M = \frac{4}{3}\pi \cdot r_h^3 \cdot \rho \cdot N_A$$
 GI. 15

mit: M = Molekulargewicht,  $\rho$  = Dichte und  $N_A$  = Avogadrozahl.

## 2.5 Peptid- und Glycopeptidsynthese

Proteine oder Peptide lassen sich die entweder enzymatisch durch spezifische Peptidasen<sup>122</sup> oder durch gentechnologische Synthese, die auf Expressionssystemen basieren,<sup>123</sup> darstellen. Die Synthese von Peptiden kann aber auch rein chemisch erfolgen. Aufgrund der vielen funktionellen Gruppen der Aminosäuren, ist die Synthese bezüglich der Schutzgruppenchemie nicht trivial. Bei der Kupplungsreaktion ist weiterhin die Carboxylfunktion zu aktivieren.

#### 2.5.1 Festphasenpeptidsynthese

Die Peptidsynthese setzt sich aus sich ständig wiederholenden Reaktionsschritten zusammen, so dass sich eine Automatisierung des Verfahrens anbietet. 1962 entwickelte Merrifield die Festphasensynthese, mit der sich die Automatisierung verwirklichen ließ.<sup>124</sup> Das Peptid wird ausgehend vom C-Terminus synthetisiert, wobei die wachsende Peptidkette an einer festen Phase gebunden ist. Durch die Fixierung des Peptids am Harz erlaubt die Festphasensynthese die quantitative Entfernung überschüssiger, nicht umgesetzter Reagenzien ohne Ausbeuteverluste. Auf der Oberfläche des Harzes befindet sich ein Linker, an den je nach Problemstellung die C-terminale Aminosäure über die Carboxylatfunktion zumeist als Amidoder Benzylester gebunden wird. Bei dem nun folgenden Aufbau des Peptids wird für jede zu kuppelnde Aminosäure der gleiche Synthesezyklus durchlaufen. Er wird durch die Entschützung der N-terminalen Aminofunktion des am Harz verankerten Restes eingeleitet. Als Amino-Schutzgruppe hat sich die Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) durchgesetzt, da sich deren Abspaltung unter milden basischen Bedingungen photometrisch anhand des abgespaltenen Methylenfluorens bei einer Wellenlänge von 301 nm verfolgen lässt.125

Im folgenden Syntheseschritt wird die zu kuppelnde Aminosäure wiederum Fmoc-geschützt eingesetzt, wobei ihre Carboxylfunktion aktiviert wird. Als Aktivatoren haben sich TBTU<sup>126</sup> und HATU<sup>127</sup> aufgrund ihrer hohen Reaktivität etabliert. Die Aktivierung von TBTU und HATU basiert auf der Bildung eines Aktivesters, der seinerseits durch die zuvor entschützte Aminofunktion erleichtert angegriffen werden kann.

Da die Kupplung der Aminosäuren dennoch meist nicht quantitativ verläuft, sollten die nicht umgesetzten, freien Aminogruppen blockiert werden, um die Produktvielfalt der Synthese einzudämmen. Dazu wird nach jeder Kupplung ein *capping*-Schritt eingeführt, bei dem die verbleibenden freien Aminogruppen acetyliert werden. Mit der Abspaltung der nächsten Fmoc-Gruppe beginnt ein neuer Zyklus (Abbildung 15).



Abbildung 15: Schematische Darstellung der Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie.

Die Bindung zwischen Peptid und Harz muss sich nach Beendigung der Synthese leicht und quantitativ lösen lassen. Dabei ist es ratsam, die Abspaltbedingungen so zu wählen, dass auch die Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren bei Bedarf mit entfernt werden. Es bietet sich daher an, Trityl-, Pbf-, *t*-Bu und Boc-Schutzgruppen zur Blockierung der Seitenketten-

Funktionalitäten einzusetzen, da sie sich unter gleichen Bedingungen wie das Peptid vom Harz in TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan und H<sub>2</sub>O problemlos abspalten lassen. TIPS wirkt als Hydridionendonor und sorgt durch Reaktion mit den während der Abspaltung frei werdenden Carbokationen dafür, dass diese nicht erneut mit dem Peptid reagieren können.<sup>128</sup> Je nach Natur des Linkers liegt der C-Terminus des Peptids nach der Abspaltung als Amid oder freie Carboxyl-Gruppe vor.

#### 2.5.2 Synthese von N-Typ-Glycopeptiden

Die Isolierung einheitlicher Glycopeptide aus natürlichen Ressourcen ist ein aufwendiges Verfahren. Leider ist auch die gentechnologische Synthese problematisch, da die Glycosylierung post-translational und damit Organismus- und zellspezifisch verläuft.<sup>129</sup> Daher stellt die rein chemische Synthese eine wertvolle Alternative für die Gewinnung von Glycopeptiden dar.

Die Bausteinsynthese hat sich für die Darstellung von N-Typ-Glycopeptiden als vorteilhaft erwiesen. Hierbei wird ein Fmoc-geschüzter, glycosylierter Asparaginbaustein (Abbildung 16) in der sequentiellen Synthese direkt eingesetzt.



Abbildung 16: Asparaginbaustein, der in der sequentiellen Synthese eingesetzt werden kann.

Bei der Kupplung des Bausteins tritt allerdings nach dessen Aktivierung die Succinimid-Ringbildung zwischen der Carboxylfunktion der Aminosäure und der NH-Gruppe der Amidbindung zum Saccharid als Nebenreaktion auf,<sup>130</sup> so dass die Anbindung des Glycosylbausteins in der Regel nicht quantitativ erfolgt.

# **3 PROBLEMSTELLUNG**

Die pathogene Konformationsänderung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> wird durch eine Interaktion der beiden Konformationsisomere hervorgerufen. Daher stellen Moleküle, die diese Protein-Protein-Wechselwirkung inhibieren oder die Konformation des zellulären Isomers stabilisieren potentielle anti-TSE Wirkstoffe dar. Peptidfragmente aus dem globulären Bereich des Prionproteins bieten sich als solche Verbindungen an.

Im Rahmen dieser Dissertation soll eine Bibliothek von 28 Octapeptiden aus der globulären Domäne (V121-L242) des humanen Prionproteins synthetisiert werden. Die Peptide sollen anschließend mittels Oberflächenplasmonenresonanz hinsichtlich der Bindungseigenschaften gegenüber humanem PrP<sup>C</sup> untersucht und im Falle einer Interaktion die Dissoziationskonstanten der betreffenden Peptide bestimmt werden. Die Bindungsepitope der besten Liganden sollen durch STD NMR-Experimente ermittelt werden. Die Substitution von in der Sequenz enthaltenen Hydroxyl-Gruppen durch Fluor soll die Bedeutung dieser funktionellen Gruppen für intermolekulare Protein-Ligand-Wasserstoffbrückenbindungen klären, und die Bioverfügbarkeit der Peptide erhöhen.

Ob die Liganden einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von hPrP<sup>C</sup> ausüben, wird anhand eines zellfreien Assays, in dem die Aggregation durch metallkatalysierte Oxidation induziert wird, getestet. Die Größe der gebildeten Aggregate wird dabei mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht.

Weiterhin soll der Einfluss der Glycosylierung an N197 auf die Struktur und die Bindungseigenschaft des Peptidfragments T192-T201 untersucht werden. Anstelle des natürlichen Oligosaccharids wird dabei Chitobiose verwendet. Das Glycan wird dabei als Fmoc-geschützter Nγ-Chitobiosylasparagin-Baustein in die laufende Peptidsynthese eingesetzt. Mittels NMR-spektroskopischer Methoden soll die Struktur des Glycopeptids und des unglycosylierten Referenzpeptids bestimmt werden. SPR-Experimente sollen einen vergleichenden Einblick in die Bindungseigenschaften der beiden Peptide geben.

In einem weiteren Teil der Arbeit soll basierend auf dem bereits bestehenden <sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H}-STD NMR Experiment das Pulsprogramm für das entsprechende <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment entwickelt und anhand von verschiedenen Rezeptor-Ligand-Systemen getestet werden. Als Anwendungsbeispiel wird die Interaktion zwischen dem Prionprotein und den im Rahmen der Dissertation synthetisierten fluorierten Peptiden mit dem entwickelten <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment untersucht.

# **4** ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Peptidbibliothek

Gemäß der "Protein-*only*-Hypothese" von Prusiner<sup>1</sup>, für deren Richtigkeit es bereits gute Hinweise gibt,<sup>13;18;24;41</sup> ist das pathogene Konformationsisomer des Prionproteins (PrP<sup>Sc</sup>) das infektiöse Agens der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopatien. Der Mechanismus ist zwar noch nicht vollständig geklärt, allgemein anerkannt ist aber die Annahme, dass der pathogene Faltungsprozess des PrP<sup>c</sup> zum PrP<sup>Sc</sup> durch eine Wechselwirkung der beiden Konformationsisomere eingeleitet wird. Die Inhibition dieser Anlagerung bzw. eine Stabilisierung von PrP<sup>C</sup> könnte somit ein Therapieansatz für die Krankheit sein. Da das Prionprotein mit sich selbst in Wechselwirkung tritt, und die Erkennung von Proteinen über ihre Oberflächenstrukturen stattfindet, scheinen sich Peptidfragmente aus dem globulären Bereich des Prionproteins als solche Inhibitoren gut zu eignen.

Daher wurde eine Peptidbibliothek von Oktapeptiden aus dem strukturierten Teil des humanen  $PrP^{C}$  (V121-L242) synthetisiert. Um sicher zu stellen, dass ein mögliches Bindungsepitop nicht zwischen zwei Peptiden lokalisiert ist, wurden die zu synthetisierenden Oktapeptide so gewählt, dass sie sich jeweils um vier Aminosäuren überlappen. In der Sequenz vorkommende Cysteine wurden dabei durch Serin ersetzt, um eine Bildung von Dimeren unter Ausbildung von Disulfidbrücken zu vermeiden. Es resultierte eine Bibliothek von 28 Oktapeptiden, die parallel in 20 µmol Ansätzen am Syntheserobotor nach der Fmoc-Strategie dargestellt wurden. Als Festphase diente ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz, an das die Fmoc-geschützte 5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeriansäure (PAL) als Linker gebunden ist. Die Abspaltung der Peptide vom Harz sowie die Entschützung der Aminosäureseitenketten mit TFA/TIPS und H<sub>2</sub>O im Verhältnis 95:5:2 erfolgte in einem zweiten Schritt ebenfalls am Syntheseroboter. Die Peptide werden so mit freiem N-Terminus und dem C-Terminus als Amid erhalten.

Da die Aufreinigung aller Peptide mittels RP-HPLC sehr zeitaufwendig gewesen wäre, wurden sie lediglich durch Extraktion unpolarer Verunreinigungen mit *tert*-Butylmethylether vorgereinigt. Nach der Aufnahme in Wasser und anschließender Gefriertrocknung wurde die Ausbeute des wasserlöslichen Teils des Feststoffes ermittelt. Die Reinheiten der so erhaltenen Peptide wurden mittels ESI-MS aus dem Totalionenstrom bestimmt. Das Peptid **26** konnte in

diesem Syntheseansatz nicht erhalten werden. Etwa die Hälfte der Peptide wies eine Reinheit von unter 80% auf. Diese Verbindungen wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt, um zu verhindern dass die späteren SPR-Experimente nicht durch einen zu großen Anteil an Verunreinigungen verfälscht würden. Die Identität der Peptide wurde mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie und teilweise mittels NMR-Spektroskopie bestätigt. In Tabelle 3 sind die synthetisierten Peptide und ihre Ausbeuten sowie die ermittelten Reinheiten zusammengestellt. Die Charakterisierung der Peptide ist im Abschnitt 7.10 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Synthetisierte Peptide und deren Ausbeuten sowie Reinheiten. Die Ausbeuten sind auf die Reinheiten und einen 20 µmol Ansatz bezogen. k.A. = keine Ausbeute; <sup>1</sup>Aufreinigung mittels RP-HPLC (angenommene Reinheit: > 95%); <sup>2</sup>Es wurde auf die Aufreinigung mittels RP-HPLC verzichtet.

|    | Sequenz  | Fragment  | Ausbeute [mg]<br>(Reinheit [%]) |    | Sequenz  | Fragment  | Ausbeute [mg]<br>(Reinheit [%]) |
|----|----------|-----------|---------------------------------|----|----------|-----------|---------------------------------|
| 1  | VVGGLGGY | V121-Y128 | 12.7 (99)                       | 15 | DSVNITIK | D178-K185 | 10.8 (>95)                      |
| 2  | LGGYMLGS | L125-S132 | 10.8 (93)                       | 16 | ITIKQHTV | l182-V189 | 10.4 (83)                       |
| 3  | MLGSAMSR | M129-R136 | 5.2 (>95) <sup>1</sup>          | 17 | QHTVTTTT | Q186-T193 | 15 (4) <sup>2</sup>             |
| 4  | AMSRPIIH | A133-H140 | 2.7 (>95) <sup>1</sup>          | 18 | TTTTKGEN | T190-N197 | 1.0 (>95)                       |
| 5  | PIIHFGSD | P137-D144 | 0.5 (>95) <sup>1</sup>          | 19 | FTETDVKM | F198-M205 | 9.1 (93)                        |
| 6  | FGSDYEDR | F141-R148 | 1.4(>95) <sup>1</sup>           | 20 | DVKMMERV | D202-V209 | 0.4 (>95)                       |
| 7  | YEDRYYRE | Y145-E152 | 0.1 (>95) <sup>1</sup>          | 21 | MERVVEQM | M206-M213 | 5.3 (92)                        |
| 8  | YYRENMHR | Y149-R156 | 1.0 (>95) <sup>1</sup>          | 22 | VEQMSITQ | V210-Q217 | 8.6 (86)                        |
| 9  | NMHRYPNQ | N153-Q160 | 4.5 (88)                        | 23 | ITQYERES | I215-S222 | 5.3 (83)                        |
| 10 | YPNQVYYR | Y157-R164 | 13.9 (86)                       | 24 | ERESQAYY | E219-Y226 | 0.1 (>95)                       |
| 11 | VYYRPMDE | V161-E168 | 1.9 (>95) <sup>1</sup>          | 25 | QAYYQRGS | Q223-S230 | 0.3 (>95)                       |
| 12 | PMDEYSNQ | P165-Q172 | 1.3 (41) <sup>2</sup>           | 26 | QRGSSMVL | Q227-L234 | k.A.                            |
| 13 | YSNQNNFV | Y169-V176 | 8.7 (97)                        | 27 | SMVLFSSP | S231-P238 | 5.1 (95)                        |
| 14 | NNFVHDSV | N173-V180 | 0.3 (>95)                       | 28 | FSSPPVIL | F235-L242 | 5.8 (91)                        |

### 4.2 Screening der Bibliothek durch SPR-Messungen

Die Peptide der Bibliothek sollten hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität gegenüber dem zellulären Prionprotein mittels Oberflächenplasmonenresonanz untersucht werden. Um die Verbindungen untereinander einstufen zu können, sollten alle Peptide in einem ersten *screening* bei derselben Konzentration vermessen und die sich ergebenden RU-Werte verglichen werden. Die Verbindungen 7, 12, 17, 24 und 26 konnten nicht oder in nicht ausreichender Menge für die SPR-Messungen dargestellt werden, so dass auf die Untersuchung dieser Verbindungen verzichtet wurde. Als Protein wurde dabei das kommerziell erhältliche, in

*E. coli* rekombinant exprimierte, humane Prionprotein, rhPrP<sup>C</sup>(23-231), verwendet, das am N-Terminus mit einem His-*tag* versehen ist. Alle SPR-Experimente wurden an einem Biacore 3000-Messinstrument vorgenommen, das alle vier Flusszellen des Senorchips nutzen kann.

Zunächst wurde versucht, das Protein über den His-*tag* auf einem NTA-Chip zu immobilisieren, da auf diese Weise die Bindungsepitope des Proteins frei vorliegen sollten. Hierzu wurde eine Nickel(II)chlorid-Lösung über Mess- und Referenzzelle geleitet und anschließend auf der Messzelle das Protein immobilisiert. Problematisch ist dabei jedoch, dass nicht komplexiertes Nickel auf der Chipoberfläche nicht blockiert werden konnte. Die Messungen zeigten, dass die Peptide eine höhere Affinität zur Referenz- als zur Messzelle aufwiesen. Auf weitere Messung mit dem NTA-Chip wurde verzichtet, da es nicht möglich war, eine aussagekräftige Referenzzelle zu erzeugen. Eine Möglichkeit könnte jedoch sein, dem Puffer Imidazol zuzusetzen, oder die nicht komplexierten Nickel-Ionen mit einem anderen His-*tag* Protein vergleichbarer Größe zu blockieren. Für die folgenden Experimente wurde das Protein über freie Aminogruppen unter Aktivierung durch EDC und NHS auf einem CM5-Chip immobilisiert. Nicht umgesetzte, aktivierte Carboxylfunktionen wurden mit Ethanolamin *gecappt*. Die Belegung des Chips wurde über die sich ergebene Antwort von 3427 RU auf 143 fmol bestimmt.

Zur Aktivitätskontrolle des Chips wurde der kommerziell erhältliche monoklonale anti-hPrP-Antikörper 15B6 der Firma Roboscreen, der die Region 160-170 der humanen Sequenz erkennt, verwendet. Bei einer Konzentration von 100 nM wurde eine Antwort von 115 RU beobachtet. Das Protein schien also aktiv zu sein, die aktive Belegung des Chips ließ sich jedoch nicht ermitteln, da für den Antikörper kein K<sub>D</sub>-Wert bekannt ist. Als problematisch erwies sich allerdings die Regeneration des Chips nach der Messung mit dem Antikörper. Aufgrund seiner festen Bindung an das Protein ließ er sich nicht durch Spülen mit Puffer-Lösung entfernen. Daher wurden auf einer weiteren Messzelle 2758 RU entsprechend 115 fmol Protein auf gleiche Weise immobilisiert und als aktiv angenommen.

Alle Peptide wurden bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M in HEPES-P-Puffer bei pH 7.4 vermessen. Die Ergebnisse des *screenings* sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Aufgrund der verschiedenen Molekulargewichte der Peptide, ist selbst bei gleicher Bindungseigenschaft nicht die gleiche Antwort zu erwarten. Um die Peptide besser miteinander vergleichen zu können, sind in der Tabelle daher ebenfalls die Verhältnisse aus den experimentell bestimmten Daten und den RU-Werten, die bei der Chip-Belegung und gegebenen Molekulargewichten der Peptide theoretisch möglich sind, prozentual angegeben. Ein Wert über 100% (Peptide **9** und

10) deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung bei der gemessen Konzentration hin. Die grau hinterlegten Felder kennzeichnen die Peptide, die eine hohe Bindungsaffinität zum Protein aufweisen.

**Tabelle 4:** Messergebnisse der SPR-Experimente bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M. RU<sub>ex</sub> gibt die experimentell bestimmten RU-Werte an, während RU<sub>ex</sub>/RU<sub>theor.</sub> die experimentellen Werte bezogen auf die theoretisch erreichbaren RU-Werte in Prozent angibt. Die grau hinterlegten Peptide zeigen große SPR-Effekte. neg. = negative SPR-Kurve.

| Nr.      | Sequenz  | RU <sub>ex</sub> | RU <sub>ex</sub> /RU <sub>theor.</sub> | Nr.         | Sequenz            | RU <sub>ex</sub> | RU <sub>ex</sub> /RU <sub>theor.</sub> |
|----------|----------|------------------|--|-------------|--------------------|------------------|--|
| Peptide: |          |                  |  |             |                    |                  |  |
| 1        | VVGGLGGY | 65               | 79%                                    | 16          | ITIKQHTV           | neg.             | -                                      |
| 2        | LGGYMLGS | 91               | 100%                                   | 18          | TTTTKGEN           | 6                | 6%                                     |
| 3        | MLGSAMSR | 53               | 54%                                    | 19          | FTETDVKM           | 20               | 18%                                    |
| 4        | AMSRPIIH | 23               | 22%                                    | 20          | DVKMMERV           | neg.             | -                                      |
| 5        | PIIHFGSD | 30               | 30%                                    | 21          | MERVVEQM           | 22               | 19%                                    |
| 6        | FGSDYEDR | 47               | 41%                                    | 22          | VEQMSITQ           | 13               | 12%                                    |
| 8        | YYRENMHR | 86               | 64%                                    | 23          | ITQYERES           | 38               | 32%                                    |
| 9        | NMHRYPNQ | 638              | 525%                                   | 25          | QAYYQRGS           | neg.             | -                                      |
| 10       | YPNQVYYR | 252              | 199%                                   | 27          | SMVLFSSP           | 87               | 87%                                    |
| 11       | VYYRPMDE | 38               | 31%                                    | 28          | FSSPPVIL           | 29               | 29%                                    |
| 13       | YSNQNNFV | 14               | 12%                                    |             |                    |                  |  |
| 14       | NNFVHDSV | neg.             | -                                      | Antikörper: |                    |                  |  |
| 15       | DSVNITIK | neg.             | -                                      |             | pos. Kontr. 100 nM | 115              |  |

Es wurde nur eine Konzentration gemessen, so dass unbekannt ist, in welchem Bereich der Bindungskurve die Konzentration von 500  $\mu$ M jeweils rangiert. Über die Güte der Bindungseigenschaft lässt sich daher keine absolute Aussage treffen. Die gemessene Konzentration liegt allerdings oberhalb des interessanten K<sub>D</sub>-Bereiches für potentielle Wirkstoffe. Anhand der Messdaten wurden die Bereiche V121-R136, Y149-R164 und S231-L242 für weitere Untersuchungen ausgewählt.

In der Abbildung 17 ist die Lokalisation der bindenden Bereiche in der 3D-Struktur des Prionproteins<sup>29</sup> farblich markiert. Die Peptide **1-3** umschließen die erste  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Peptide **8-10** verbinden die erste  $\alpha$ -Helix mit der zweiten  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Die Peptide **27** und **28** können in der Darstellung nicht gekennzeichnet werden, da sie sich C-terminal zur dritten  $\alpha$ -Helix befinden.



**Abbildung 17:** Die Regionen mit der höchsten Bindungsaffinität sind in der NMR-Struktur von Zahn *et al.*<sup>29</sup> farblich gekennzeichnet (Stereoplot). Blau: Peptide **1-3**, rot: Peptide **8-10**. Peptide **27** und **28** liegen C-terminal zur dritten  $\alpha$ -Helix und befinden sind nicht in der hier dargestellten Struktur.

Ein quantitativer Vergleich der Bindungseigenschaften der Liganden ist durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Bindungsgleichgewichtes möglich. Daher sollten für die Peptide, die im ersten *screening* gute Bindungseigenschaften zeigten (1-3, 8-10, 27-28), Konzentrationsreihen aufgenommen werden. Dazu wurden die betreffenden Peptide - falls nicht bereits für das erste *screening* getan - mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die Messungen erfolgten mit demselben Chip nach einem Zeitraum von acht Wochen. Daher wurde die Aktivität des Chips erneut überprüft. Für die Verbindung 10, die auch in den folgenden Messreihen als Referenz diente, wurde bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M eine Antwort von 121 RU erhalten. Dies entspricht einer Aktivität von 48% bezogen auf die ursprüngliche. Trotz der deutlich abgesunkenen Aktivität wurde der Chip verwendet, da die aktive Belegung ausreichend hohe und damit messbare RU-Werte lieferte. In Tabelle 18 (Kapitel 7.5) sind die Konzentrationen aufgeführt, die für die jeweiligen Peptide vermessen wurden. Verbindung 27 zeigte in dieser Messreihe negative, unspezifische Sensorgramme, weswegen für dieses Peptid keine Konzentrationsreihe aufgenommen wurde.

Stellvertretend für die Liganden **8-10** sind in Abbildung 18 die Sensorgramme des Peptids **9** dargestellt. Die Assoziationskurve erreicht nach ca. fünf Minuten ihren Sättigungswert. Mit der

Beendigung der Injektion beginnt die Dissoziation. Es ist zu erkennen, dass nach ca. sechs Minuten ohne jegliches Einwirken die Basislinie ereicht wird. Die Peptide **1-3** und **28** zeigen einen abweichenden Kurvenverlauf. Der Anstieg der Assiziations- und Abfall der Dissoziationskurve ist für die Verbindungen **1** und **2** deutlich steiler, allerdings kehrt das System nicht vollständig auf die Basislinie zurück. Es lässt sich aber durch  $5 \,\mu$ L einer wässrigen Lösung von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM) in beiden Fällen regenerieren. Die Sensorgramme von **3** zeigen negative RU-Werte. Aufgrund dieser Besonderheit werden die Messergebnisse dieses Peptids gesondert diskutiert. Bei Peptid **28** erfolgt sowohl die Assoziation also auch die Dissoziation deutlich langsamer verglichen mit den hier gezeigten Sensorgrammen.



Abbildung 18: Sensorgramme des Peptids 9 (NMHRYPNQ) bei verschiedenen Ligandkonzentrationen.

Bei einer spezifischen Interaktion ergibt die Auftragung der maximalen RU-Werte gegen die Ligandkonzentration eine Kurve, die bei hohen Konzentrationen einem Maximalwert entgegenstrebt. Eine Gerade deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung mit dem Rezeptor hin. Die sich jeweils ergebenden Konzentrationsreihen wurden mit dem Programm Origin im Sinne eines *one-site-binding* Modells an die Gleichung 13 angepasst, und so die K<sub>D</sub>-Werte der Liganden erhalten. In Abbildung 19 sind die Affinitätsplots und die zugehörigen Dissoziationskonstanten gezeigt.



**Abbildung 19:** Affinitätsplots der Peptide **1**, **2**, **8-10** und **28**. Die Dissoziationskonstanten wurden durch einen Fit der Datenpunkte an die Gleichung 13 erhalten.

Der Fehler der Dissoziationskonstanten für die Peptide **8-10** beträgt ca. 25%, während die Fehler, die für die Verbindungen **1**, **2** und **28** bestimmt wurden, mit 65-100% deutlich höher liegen. Trotz der teilweise großen Ungenauigkeiten lassen sich die Peptide bezüglich ihrer Bindungseigenschaft quantitativ einstufen. Mit einer Dissoziationskonstante von 21 und 25  $\mu$ M zeigen die Liganden **8** und **9** die höchste Bindungsaffinität gegenüber rhPrP<sup>C</sup>. Die Peptide **1** und **10** binden um den Faktor 6 schlechter. Die Bindungsaffinität des Liganden **2** ist ungefähr 20-fach, die der Verbindung **28** 65-fach geringer.

Bei der Betrachtung der Affinitätsplots ist zu erkennen, dass mit Ausnahme von Verbindung **28** bei allen anderen Peptiden bei hohen Ligand-Konzentrationen eine Sättigung erreicht wird. Demnach scheint die Bindung der Peptide **1**, **2** und **8-10** spezifisch zu sein, während der Affinitätsplot des Peptids **28** auf eine gering affine bis unspezifische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung hindeutet. Es ist aber zu bedenken, dass die Peptide **8** und **9** in dem ersten *screening* bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M RU-Werte zeigten, die über der theoretisch möglichen Antwort lagen. Demnach scheint die Bindung dieser Peptide bei geringen Ligand-Konzentrationen spezifisch zu sein und bei hohen Konzentrationen in eine unspezifische Bindung überzugehen.

Die Verbindung **3** nimmt eine Sonderstellung ein, da die Sensorgramme negativ sind (Abbildung 20A). Bei Betrachtung der Sensorgramme für die höheren Ligand-Konzentrationen ist zu erkennen, dass die Assoziationskurve einem Sättigungswert zustrebt. Weiterhin nimmt der Betrag des maximalen RU-Wertes mit der Konzentration wie üblich zu. Trägt man die Beträge der maximalen RU-Werte gegen die Ligandkonzentration auf, so ergibt sich eine Kurve, die bei hoher Ligandkonzentration einem Sättigungswert zustrebt. Unter diesen Bedingungen ergibt sich für **3** eine Dissoziationskonstante von 171  $\mu$ M (Abbildung 20B).

Negative Sensorgramme können zustande kommen, wenn der Ligand unspezifisch an die Referenzzelle bindet. Die Auftragung der Beträge der maximalen RU-Werte gegen die Konzentration würde in diesem Fall allerdings eher eine Gerade ergeben. Weiterhin basiert das SPR-Experiment auf der Veränderung von Brechungsindices, die durch die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung hervorgerufen wird. Je nachdem, ob sich der Brechungsindex verkleinert oder vergrößert, resultiert ein positives oder negatives Sensorgramm.



**Abbildung 20:** A) Sensorgramme des Peptids **3** (MLGSAMSR). B) Abhängigkeit der RU-Werte von der Konzentration. Hierzu wurden die negativen Sensorgramme aus A) ausgewertet und die Beträge der RU-Werte aufgetragen.

Bemerkenswert ist, dass der sich um nur vier Aminosäure unterscheidende Ligand 2 positive Sensorgramme aufweist. Dabei ist jedoch zu beachten, dass Peptid 3 um den Faktor 3 besser an rhPrP<sup>C</sup> bindet als 2, was darauf hindeutet, dass die C-terminalen Aminosäuren A133, M134, S135 und R136 des Peptids 3 einen Einfluss auf die Bindungseigenschaft der Verbindung ausüben.

#### 4.2.1 Kinetik der Bindungsreaktion

Die Kinetik der Assoziations- und Dissoziationsreaktion lässt sich aus den Sensorgrammen durch Anpassung an die Langmuir-Gleichung ermitteln. Der Fit ist allerdings nicht immer unproblematisch. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, konnte kein Fit gefunden werden, der sowohl für die Assoziation als auch für die Dissoziation des Peptids **9** gleichermaßen gut zutreffend ist.

Wird der Bereich der Assoziation betont (linke Abbildung), so ergibt sich ein  $k_{on}$ -Wert von 603 s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion beträgt  $1.0 \cdot 10^{-2}$  s<sup>-1</sup> entsprechend einer Gleichgewichtskonstante von 16  $\mu$ M. Rechts ist die Anpassung an die Dissoziationskurve dargestellt. Hier beträgt die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation 87 s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>, die der Dissoziation  $1.1 \cdot 10^{-2}$  s<sup>-1</sup> entsprechend einem K<sub>D</sub>-Wert von 132  $\mu$ M.



**Abbildung 21:** Sensorgramm von Peptid **9** (NMHRYPNQ) (rot), das bei einer Ligandkonzentration von 100 µM erhalten wurde, und die Ergebnisse der Anpassung an die Langmuir-Gleichung (schwarz).

Vergleicht man die K<sub>D</sub>-Werte, die aus der Anpassung der SPR-Kurve an die Langmuir-Gleichung hervorgehen, mit dem K<sub>D</sub>-Wert, der sich für das gleiche Peptid aus der Konzentrationsreihe ergeben hat (K<sub>D</sub> = 25  $\mu$ M), so scheint der "Assoziations-Fit" eher der tatsächlichen Situation zu entsprechen.

Der Vergleich der beiden Fits zeigt aber, dass die sich daraus ergebenden  $k_{on}$  und  $k_{off}$ -Werte nicht deutlich voneinander abweichen. Eine ungefähre Abschätzung der Bindungskinetik ist daher möglich. Die Daten sprechen für eine für die folgenden STD-Experimente recht langsame Kinetik der Bindungsreaktion (vgl. Abschnitt 4.3).

#### 4.2.2 Fluorderivate

Um Informationen darüber zu erhalten, ob die Tyrosine der Verbindungen 9 (NMHRYPNQ) und 10 (YPNQVYYR) an dem Bindungsepitop beteiligt sind, wurde in Peptid 9 das Tyrosin durch 4-Fluorphenylalanin (9a) bzw. durch 4-Trifluormethylphenylalanin (9b) ersetzt (Abbildung 22). Weiterhin wurden die in der Verbindung 10 enthaltenden drei Tyrosine durch 4-Fluorphenylalanin (10a) substituiert. Die Einführung von Fluor in die Verbindungen sollte ebenfalls die Bioverfügbarkeit der Liganden verbessern und der <sup>19</sup>F-Kern als NMR-Sonde für die im zweiten Teil dieser Arbeit entwickelten <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experimente dienen.



Abbildung 22: Fluorderivate der Verbindungen 9 (NMHRYPNQ) und 10 (YPNQVYYR).

Die Peptide **9a** und **9b** wurden in einem 30 µmol Ansatz manuell synthetisiert, das Peptid **10a** wurde vollautomatisch in einem 50 µmol-Ansatz am Peptidsyntheziser dargestellt. Dabei wurde anstelle des Tyrosins entweder Fmoc-geschütztes 4-Fluorphenylalanin oder 4-Trifluormethylphenylalanin in der Synthese eingesetzt. Die Peptide wurden nach der Abspaltung vom Harz und der Entschützung der Aminosäureseitenketten durch Extraktion unpolarer Verunreinigungen mit *tert*-Butylmethylether vorgereinigt. Nach der Aufreinigung

der Verbindungen mittels RP-HPLC wurden für **9a** 15.6 mg (49%), für Peptid **9b** 15.1 mg (45%) und für das Derivat **10a** 15.9 mg (29%) Ausbeute bezogen auf die Ansatzgröße erhalten. Für die SPR-Messungen der Fluorderivate wurde ein neuer CM5-Chip belegt. Es ergab sich eine Antwort von 3587 RU entsprechend einer Belegung von 149 fmol. Die Aktivität des Chips wurde wie gewöhnlich mit dem Peptid **10** überprüft. Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M wurde eine Antwort von 135 RU erreicht, was die Aktivität des Proteins nach der Immobilisierung bestätigte. Die Sensorgramme der Derivate weichen von denen des Peptids **9** (Abbildung 18) dahingehend ab, dass die Basislinie nur durch Regeneration mit 5  $\mu$ L einer wäßrigen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung (100 mM) wieder erreicht wurde. Der Verlauf der Assoziationskurve ist dem des Peptids **9** aber sehr ähnlich.

Wiederum wurde die maximale RU-Antwort gegen die Ligandkonzentration der jeweiligen Derivate aufgetragen. Die erhaltenen Affinitätsplots der Konzentrationsreihen für Verbindungen **9a** und **9b** und die entsprechenden K<sub>D</sub>-Werte sind in Abbildung 23 dargestellt. Für das Peptid **9a**, in dem das Tyrosin durch 4-Fluorphenylalanin ersetzt wurde, ergibt sich ein Affinitätsplot, der mit steigenden Ligandkonzentrationen in die Sättigung geht. Demnach handelt es sich hier um eine spezifische Wechselwirkung mit dem Protein. Die Konzentrationsreihe für das 4-Trifluormethylphenylalanin-Derivat (**10a**) führt zu einer deutlich flacheren Kurve, bei der die nicht-lineare Anpassung an die Gleichung 13 für eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung im Sinne eines *one-site-binding*-Modells fraglich ist.



Abbildung 23: Konzentrationsreihen der Fluorderivate 9a und 9b.

Der K<sub>D</sub>-Wert des Derivats **9a** ist mit 114  $\mu$ M fünffach schlechter als der des Referenzpeptids **9** (**K**<sub>D</sub> = 25 ± 7). Die Bindungsaffinität des Derivats **9b** ist verglichen mit der von **9** sogar um den Faktor 34 geringer. Die deutlich schlechteren K<sub>D</sub>-Werte der Fluorderivate lassen vermuten, dass das Tyrosin in einer Wasserstoffbrückenbindung zum Protein als Donor fungiert, die

Fluorderivate hingegen können diese Rolle in der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung nicht einnehmen. Der große sterische Anspruch der Trifluormethylgruppe führt zusätzlich zu einer deutlichen Verschlechterung der Bindungseigenschaft des Peptids **9b**. Die Bindungstasche des Proteins scheint demnach den Raum für diese Gruppe nicht zu bieten.

Die Auftragung der RU-Werte gegen die Ligand-Konzentration des Derivats **10a** ergibt eine Gerade. Die Interaktion von **10a** mit rhPrP<sup>C</sup> scheint daher unspezifisch zu sein (Abbildung 24). Auch hier wird deutlich, dass die Spezifität der Bindung durch die Tyrosine hervorgerufen wird. In der Verbindung **10** scheinen sie ebenfalls in einer Wasserstoffbrückenbindung als Donor zu fungieren.



Abbildung 24: Affinitätsplot des Peptids 10a.

## 4.3 STD-Messungen mit dem Prionprotein

Das Umpuffern des handelsüblichen Prionproteins in deuterierte Puffer erwies sich als problematisch. Es wurde versucht, das Lösungsmittel mit Hilfe einer Ultrafiltrationsmembran (*cut off* MW = 5000 g/mol) auszutauschen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration über die UV-Absorption der Probe bei 260 und 280 nm ergab, dass die erhaltene Stammlösung 10-fach geringer konzentriert war als angenommen.

Daher wurde das Protein in der handelsüblichen Form (83  $\mu$ M PrP(23-231) in 50 mM Acetat-Puffer) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen enthielte eine NMR-Probe (mit einem Volumen von 250  $\mu$ L bei einer Proteinkonzentration von 5  $\mu$ M) undeuterierten Acetat-Puffer einer Konzentration von 3 mM und 6.8% H<sub>2</sub>O. Der Acetat-Puffer würde ein großes, störendes Signal liefern und die Empfindlichkeit des Experimentes erheblich verringern.

Daher wurde das bestehende  $1D^{-1}H\{{}^{1}H\}$ -STD-Experiment *std19sp* dahingehend verändert, dass eine zweite Lösungsmittelunterdrückung möglich wurde. Die dazu verwendete Pulssequenz leitet sich von einem bereits bestehenden  $1D^{-1}H$ -WATERGATE-Experiment ab.<sup>[1]</sup> Die Unterdrückung des HDO-Signals erfolgt hierbei über das sog. *excitation sculpting*, einer DPFGSE- (*double pulsed field gradient spin echo*) Sequenz.<sup>131-133</sup> Die Unterdrückung des zweiten Lösungsmittels wird durch einen zusätzlichen, selektiven 180° Puls jeweils in den Gradienten-Echos erreicht. Dadurch wird die Inversion des zweiten Lösungsmittelsignals durch die w5-Kaskade zu einem 0°-Flip-Winkel kompensiert und die Resonanz jeweils mit dem zweiten Gradientenpuls nicht refokussiert. Auf diese Weise wird ein Anregungsprofil mit zwei Aussparungen erhalten. Diese Sequenz wurde in das STD-Pulsprogramm (*std19sp*) implementiert und das Experiment in die Pseudo-2D-Variante umgeschrieben. Auf letztere wird in Kapitel 4.6.1 genauer eingegangen.

Die neuen STD-Pulsprogramme mit und ohne  $T_{1\rho}$ -Filter (*stdw52ssl2d.bc* und *stdw52s2d.bc*) wurden anhand einer Probe bestehend aus BSA, dem Liganden 6-Fluortryptophan und dem Peptid **11**, das als negativ Kontrolle dienen sollte, in deuteriertem Tris- $d_{11}$ -Puffer in Anwesenheit von 3.4 mM Acetat und 6.8% H<sub>2</sub>O getestet (Abbildung 25). Die Bestimmung des selektiven 180°-Pulses erfolgte über das Standardpulsprogramm *selzg*. Der selektive Gausspuls (Trunkierung 20%) wurde auf 4 ms bei einer Abschwächung der Pulsleistung von 42 dB bestimmt.

<sup>&</sup>lt;sup>[1]</sup> Die Pulssequenz wurde von Dr. Robert Meinecke zur Verfügung gestellt (w52sgp32.ro).



**Abbildung 25:** A) 500 MHz <sup>1</sup>H-STD-Spektrum einer Probe bestehend aus 20  $\mu$ M BSA, 500  $\mu$ M 6-Fluortryptophan und 500  $\mu$ M Verbindung **11** in 3.4 mM Acetat-Puffer, 10 mM Tris- $d_{11}$ -Puffer und 6.8% H<sub>2</sub>O mit doppelter Lösungsmittelunterdrückung und T<sub>1p</sub>-Filter bei 290 K. Das Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm *stdw52ssl2d.bc* aufgenommen. Der Sättigungspuls wurde bei -1 ppm über einen Zeitraum von 2 s eingestrahlt. B) <sup>1</sup>H-STD-Spektrum der gleichen Probe unter gleichen Bedingungen ohne T<sub>1p</sub>-Filter (Pulsprogramm: *stdw52s2d.bc*) C) Entsprechendes <sup>1</sup>H-WATERGATE-Spektrum mit doppelter Lösungsmittelunterdrückung (Pulsprogramm: *w52sgs32.ro*). D) <sup>1</sup>H-Referenz-Spektrum mit einer Standard WATERGATE-Pulssequenz.

Abbildung 25D zeigt das Standard WATERGATE-Spektrum der Probe. Bei ca. 1.8 ppm liegt das Acetat-Signal, welches im Vergleich zu den weiteren Signalen eine deutlich höhere Intensität aufweist. In Abbildung 25C ist das entsprechende <sup>1</sup>H-WATERGATE-Spektrum mit doppelter Lösungsmittelunterdrückung dargestellt. Das Acetat-Signal ist nahezu vollständig unterdrückt. Allerdings weisen die benachbarten Resonanzen ebenfalls eine deutlich geringere Intensität auf. In Abbildung 25A ist das STD-Spektrum mit doppelter Lösungsmittelunterdrückung und T<sub>1p</sub>-Filter, in Abbildung 25B das entsprechende Spektrum ohne T<sub>1p</sub>-Filter abgebildet. Die STD-Spektren zeigen hauptsächlich die Signale von 6-Fluortryptophan. Die zweite Lösungsmittelunterdrückung scheint demnach keine Artefakte zu erzeugen, so dass die neuen Pulssequenzen für STD-Experimente eingesetzt werden können. Um die Sättigung des Prionproteins für die STD-Experimente zu optimieren, wurden STD-Spektren ohne  $T_{1\rho}$ -Filter bei verschiedenen Einstrahlpunkten der Sättigungspulse mit dem Pulsprogramm *stdw52s2d.bc* aufgenommen und die Intensitäten der resultierenden Protein-Hüllkurven miteinander verglichen. Bei einem Einstrahlpunkt von -0.1 ppm ist eine Sättigung von durchschnittlich 32% zu beobachten (Abbildung 26A). Eine Einstrahlung bei -1 ppm führt zu einer Sättigung von etwa 24% (Abbildung 26B). Das <sup>1</sup>H-Referenz-Spektrum des Prionproteins (Abbildung 26C) zeigt sehr viele scharfe Signale mit einer Linienbreite von ca. 5 Hz. Diese könnten auf Verunreinigungen zurückzuführen sein, die in der handelsüblichen Lösung enthalten sind. Möglich wäre auch, dass der flexible N-Terminus derartige Signale liefert.



**Abbildung 26:** Sättigung des Prionproteins im STD-Experiment. Die Proteinkonzentration betrug 8  $\mu$ M in 3.4 mM Acetat- und 10 mM Tris- $d_{11}$ -Puffer. A) 500 MHz <sup>1</sup>H-STD-Spektrum, bei dem die Einstrahlung der Sättigungspulse bei -0.1 ppm über einen Zeitraum von 2 s mit einer Abschwächung der Sättigungspulsleistung von 40 dB erfolgte. B) Unter ansonsten gleichen Bedingungen wurde bei einem Einstrahlpunkt von -1 ppm eingestrahlt. C) <sup>1</sup>H-Referenz-Spektrum, das aus dem STD-Experiment von B) hervorging.

Die verhältnismäßig schwache Sättigung könnte damit zu erklären sein, dass der Sättigungstransfer in dem kleinen Protein nicht effizient ist. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa, davon weisen jedoch nur ca. 12 kDa eine globuläre Struktur auf. Somit befindet sich das Protein am *spin diffusion limit*.

Da bei der Probenvorbereitung für die NMR-Messungen im deuterierten Tris-Puffer bei pH 7 ein feiner Niederschlag zu erkennen war, wurde auf einen 50 mM Acetat-Puffer (pH 4.5) gewechselt, in dem das Prionprotein deutlich stabiler scheint.

In den SPR-Experimenten erwiesen sich Verbindungen **8** und **9** als beste Liganden. Daher sollten ihre Bindungsepitope mittels STD NMR untersucht werden. Die STD-Spektren dieser Verbindungen zeigten allerdings nur sehr geringe Intensitäten, und das Verhältnis zwischen STD-Effekt und Artefakt ist kritisch (ca. 2.5:1). Ein Grund dafür könnte in einem ineffizienten Sättigungstransfer liegen, der seinerseits durch geringe Proteinsättigung bei den für die Messungen gewählten Einstrahlpunkten zustande kommen kann. Weiterhin wurde bereits in Kapitel 4.2.1 die langsame Bindungskinetik der Bindungsreaktion zwischen dem Peptid **9** und rhPrP beschrieben. Die mittlere Verweildauer ist definiert als  $ln2/k_{off}$ . Bei einem  $k_{off}$ Wert von  $1 \cdot 10^{-2}$  s<sup>-1</sup> beträgt die Verweildauer des Liganden in der Proteinbindungstasche demnach ca. 70 s. Innerhalb der Sättigungszeit, die sich im allgemeinen im Rahmen von 2 - 4 s bewegt, ist daher der Durchsatz an Ligandmolekülen sehr gering. Weiterhin könnten die intensiven Artefaktsignale (bis zu 1.5%) auf eine partielle Selbstaggregation der Peptide hindeuten.

Es wurde daher versucht, die Bedingungen der STD-Experimente zu optimieren, wobei sich alle Angaben in dem folgenden Abschnitt auf das 500 MHz-Spektrometer beziehen. Zum einen sollte die Effizienz der Sättigung gesteigert werden. Eine Möglichkeit dafür besteht darin, die Leistung der Sättigungspulse zu erhöhen. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass dadurch auch die Seitenbanden der Gausspulse intensiver werden, was zu einer direkten Anregung des Liganden führen kann. Es wurden Abschwächungen von 40 - 56 dB gestestet. Weiterhin könnte ein breiterer Anregungspuls zu einer effektiveren Sättigung des Proteins führen. Die Breite des Sättigungspulses lässt sich vergrößern, indem man ihn verkürzt. Die Länge des Sättigungspulses wurde daher zwischen 20 ms und den üblichen 50 ms variiert. Außerdem kann man für den Sättigungspuls anstelle des Gausspulses eine andere Form wählen, die für eine breitere Anregung sorgt. Als shape wurde dazu eine G4-Kaskade gewählt. Die Fourier-Transformation dieser Anregung führt im Vergleich zur üblichen Gauss-Form zu einem verbreiterten Rechteckpuls. Alle Versuche, die Effizienz der Sättigung zu erhöhen, führten jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Weiterhin sollte ein optimaler Einstrahlpunkt gefunden werden, in der eine gute Sättigung des Proteins noch möglich ist, aber der Ligand nicht direkt gesättigt wird. Dazu wurden die Einstrahlpunkte im Bereich zwischen -0.2 und -1.2 ppm variiert.

Aufgrund der langsamen Bindungskinetik wurde versucht, die Effektivität des Sättigungstransfers durch Temperaturerhöhung auf 305 K zu steigern. Weiterhin wurde die Sättigungszeit auf 4 s verlängert, um den Durchsatz an Ligandmolekülen in der Proteinbindungstasche während der Experimentdauer zu erhöhen. Allerdings führten auch diese Versuche nicht zu intensiveren STD-Signalen.

Es erwies sich als problematisch, die Balance zwischen STD-Artefakten und echten STD-Signalen zu finden. Als geeignetste Bedingungen erwiesen sich eine Sättigungseinstrahlung bei -0.9 bzw. -1 ppm mit einer Abschwächung der Pulsleistung von 40 dB über einen Zeitraum von 4 s bei 305 K. Der Ligand wurde jeweils im 100-fachen Überschuss eingesetzt. Das Messergebnis des Peptids **8** mit hPrP(23-231) ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27:** STD-Experimente mit Peptid **8** (YYRENMHR). A) 500 MHz <sup>1</sup>H-STD-Spektrum einer Probe bestehend aus 5 μM hPrP<sup>C</sup> und 500 μM **8** in 50 mM Acetat-Puffer. Das Spektrum wurde bei einem Einstrahlpunkt von -1 ppm mit dem Pulsprogramm *stdw52ssl2d.bc* mit 5k Scans aufgenommen. B) <sup>1</sup>H-STD-Spektrum das mit 8k Scans bei einem Einstrahlpunkt von -0.9 unter ansonsten gleichen Bedingungen wie (A) akquiriert wurde. C) zeigt das STD-Referenzspektrum von 500 μM **8** unter den gleichen Bedingungen wie (A). In D) ist das entsprechende STD-Spektrum der Ligandprobe unter den gleichen Bedingungen wie (B) gezeigt. In E) ist das <sup>1</sup>H-WATERGATE-Spektrum des Liganden **8** abgebildet. Die Spektren (A) und (C) wurden mit einer Linienverbreiterung von 1 Hz prozessiert, die Spektren (B) und (D) mit einer Verbreiterung von 2 Hz.

Die Abbildung 27A zeigt das STD NMR-Spektrum des Peptids **8** mit dem Prionprotein bei einem Einstrahlpunkt von -1 ppm, in Abbildung 27C ist das entsprechende STD-Spektrum der Ligandblindprobe abgebildet. In der Abbildung 27B bzw. Abbildung 27D sind die Spektren zu sehen, die bei einem Einstrahlpunkt von -0.9 ppm erhalten wurden.

Der Vergleich mit dem <sup>1</sup>H-Referenzspektrum des Liganden (Abbildung 27E) zeigt, dass in den Protein-Ligand-Spektren fast ausschließlich Artefaktsignale zu beobachten sind. Weiterhin fällt auf, dass in den STD-Spektren der Ligandblindproben deutlich die aromatischen Protonen zu erkennen sind, in den STD-Spektren fehlen diese Signale fast vollständig. Der Ligand **8** scheint zur Bildung von Aggregaten zu neigen, welche sich bei Zugabe des Proteins auflösen.

In der Abbildung 28A ist das Protein-Ligand-STD-Spektrum zu sehen, das mit der Verbindung 9 und dem Prionprotein erhalten wurde. Der Einstrahlpunkt lag bei -0.9 ppm. Auch hier ist im Vergleich mit dem STD-Spektrum der Ligandblindprobe (Abbildung 28B) zu erkennen, dass die Experimente keine auswertbaren, echten STD-Signale lieferten.



**Abbildung 28:** STD-Experimente mit Peptid **9** (NMHRYPNQ). A) 500 MHz <sup>1</sup>H-STD-Spektrum von 500  $\mu$ M **9** mit 5  $\mu$ M rhPrP<sup>C</sup> in 50 mM Acetat-Puffer bei 6k Scans. B) zeigt das <sup>1</sup>H-STD-Spektrum der Blindprobe unter den gleichen Bedingungen. C) <sup>1</sup>H-WATERGATE-Spektrum des Liganden.

Für das Fluorderivat **9a** ergab die Anpassung der Langmuir-Gleichung an das Sensorgramm im Vergleich zum Peptid **9** eine etwas schnellere Kinetik. Die *offrate* wurde auf  $3 \cdot 10^{-2}$  s<sup>-1</sup> bestimmt. Die mittlere Verweildauer der Verbindung **9a** in der Proteinbindungstasche beträgt demnach ca. 23 s und ist damit dreifach kürzer als die des Peptids **9**, so dass der Durchsatz an

Ligandmolekülen im Verlauf des STD-Experimentes etwas größer ist. Die STD-Spektren, die mit dem Fluorderivat **9a** erhalten wurden, sind in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29:** A) 500 MHz <sup>1</sup>H-STD-Spektrum des Peptids **9a** (500  $\mu$ M) mit rhPrP<sup>C</sup> (5  $\mu$ M). B) zeigt das entsprechende Referenzspektrum der Ligandblindprobe, C) das <sup>1</sup>H-Spektrum des Liganden. Das in den Spektren (B) und (C) auftretende große Signal bei ca. 2.8 ppm ist zum einen auf ein  $\beta$ -Proton des 4-Fluorphenylalanins, zum anderen auf eine Verunreinigung zurückzuführen.

Wiederum sind in dem STD-Spektrum der Ligandblindprobe (Abbildung 29B) intensive Artefaktsignale zu erkennen. Aber im Unterschied zu den vorhergehenden STD-Experimenten weist das STD-Spektrum dieser Protein-Ligand-Probe zusätzliche Signale auf. Der Vergleich der Spektren zeigt weiterhin, dass insbesondere in dem Bereich zwischen 2.5 und 3 ppm die Signale unterschiedliche Intensitätsverhältnisse aufweisen, was auf echte STD-Effekte hindeutet. Der Ligand **9a** wurde dabei wie gewohnt im 100-fachen Überschuss eingesetzt.

Trotz des kritischen STD%/Artefakt-Verhältnis wurde aus diesen STD-Spektren das Bindungsepitop des Liganden **9a** bestimmt. Von den gemessenen STD% wurden die aus der Ligandblindprobe hervorgehenden Artefakte abgezogen. Um sicher zu stellen, dass das sich ergebende *epitope mapping* nicht durch die verschiedenen T<sub>1</sub>-Relaxationszeiten der individuellen Protonen verfälscht wird, wurden die Relaxationszeiten mit dem *inversion recovery*-Experiment *t1irw5gp\_2.bc* gemessen. Es zeigt sich, dass die Relaxationszeiten mit Ausnahme der Hδ- und Hε-Protonen von 4-Fluorphenylalanin sehr ähnlich sind, und damit das ermittelte Epitop mit der tatsächlichen Nähe zum Protein korreliert (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Absolute STD% des Peptids **9a** (grau) und die jeweiligen T<sub>1</sub>-Relaxationszeiten der Protonen (schwarz).

Das *epitope mapping* lässt auf eine Beteiligung der Aminosäurereste Arginin, 4-Fluorphenylalanin und Prolin schließen (Abbildung 31). Dabei weisen die  $\gamma$ -Protonen des Argnins und die  $\beta$ -Protonen von 4-Fluorphenylalanin die stärksten STD-Effekte auf. Die  $\delta$ -Protonen von Prolin scheinen ebenfalls an der Bindung beteiligt zu sein. Aufgrund der schlechten Spektrenqualität ist das ermittelte Bindungsepitop aber kritisch zu bewerten. Durch die Synthese des Tripeptids RYP und die Analyse seiner Bindungsaktivität gegenüber dem Prionprotein mittels SPR-Untersuchungen sollten sich diese Daten überprüfen lassen (Abschnitt 4.4).



Abbildung 31: Bindungsepitop des Peptids 9a NMHR(4-F)-FPNQ.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass der schlechte Sättigungstransfer in den durchgeführten STD-Experimenten darin seine Begründung finden könnte, dass die Peptide an den flexiblen Teil des Proteins binden, welcher vermutlich im STD-Experiment deutlich schlechter gesättigt wird als der globuläre. Durch Bindungsstudien mit verschiedenen PrP-Fragmenten ließe sich der Abschnitt, auf dem sich die Proteinbindungstasche befindet, lokalisieren.

## 4.4 SPR-Studien der Sequenzen Y149-Q160 und R156-P158 mit PrP-Fragmenten

Aus vorhergehenden SPR-Experimenten (siehe Abschnitt 4.2) gingen die sich überlappenden 8 (Y149-R156) und 9 (N153-Q160) als diejenigen Peptide mit den besten Dissoziationskonstanten hervor. Um festzustellen, ob die gesamte Region eine höhere Bindungsaffinität besitzt, wurde das Peptid (Y149-Q160) YYRENMHRYPNQ 29 vollautomatisch in einem 50 µmol Ansatz mit einer Gesamtausbeute von 11% (9.5 mg) am Peptidsynthesizer dargestellt, aufgereinigt und mittels Oberflächenplasmonenresonanz untersucht. In dem Experiment sollte gleichzeitig gezeigt werden, mit welchem Teil des Prionproteins die Peptide wechselwirken. Dazu wurde auf einem CM5-Chip sowohl das Prionprotein rhPrP(23-231) als auch das verkürzte Fragment rhPrP(90-231) immobilisiert. Die Belegung des PrP(23-231) auf der Flusszelle 2 betrug 6760 RU entsprechend einer Stoffmenge von 280 fmol, die des verkürzten Fragments war 2197 RU (129 fmol). Die Aktivität des Chips wurde wieder mit der Verbindung 10 gestestet. Bei einer Konzentration von 100 µM wurde eine Antwort von 128 RU mit PrP(23-231) gemessen, diejenige mit PrP(90-231) betrug 27 RU. Unter der Berücksichtigung der Belegung bindet das Peptid 10 um den Faktor zwei besser an das längere Protein. Die Konzentrationsreihen, die für das Peptid 29 mit den verschiedenen Proteinfragmenten erhalten wurden, sind in Abbildung 32 dargestellt.

Die Kurven zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, der ab einer Konzentration von 150  $\mu$ M auf eine unspezifische Wechselwirkung mit dem Protein hindeutet. Die ermittelten K<sub>D</sub>-Werte betragen 140  $\mu$ M bzw. 103  $\mu$ M und weichen damit nur um 26% voneinander ab. Im Rahmen der Fehlerabweichung sind die Ergebnisse als gleich zu betrachten. Auch für das Peptid **9** wurden in einer analogen Messreihe gleiche K<sub>D</sub>-Werte erhalten. Somit zeigt das Experiment, dass die Bindungstasche des Proteins für diese Peptide auf dem Fragment PrP(90-231) lokalisiert ist.



**Abbildung 32:** A) Affinitätsplot des Peptids **29** (YYRENMHRYPNQ) an das Prionprotein rhPrP(23-231). B) Die Konzentrationsreihe des gleichen Peptids mit dem verkürzten Prionprotein Fragment rhPrP(90-231), welche unter den gleichen Bedingungen aufgenommen wurde, zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf.

Der Vergleich der Dissoziationskonstanten des 12er Peptids **29** mit denen der Verbindungen **8** (21  $\mu$ M) und **9** (25  $\mu$ M) zeigt, dass das verlängerte Peptid entgegen der Erwartungen einen sechsfach schlechteren K<sub>D</sub>-Wert aufweist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Entropie der Protein-Ligand-Wechselwirkung aufgrund der höheren Flexibilität des Moleküls stärker negativ ist, bzw. das Peptid **29** aufgrund seiner größeren, räumlichen Ausdehnung eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit aufweist. Denkbar ist weiterhin, dass die im Vergleich zu den Ausgangspeptiden **8** und **9** jeweils erweiternden Aminosäurereste die Wechselwirkung des Liganden mit der Proteinbindungstasche destruktiv beeinflussen.

Um die Richtigkeit des *epitope mappings* (Kapitel 4.3) zu bestätigen, wurde das Peptid RYP **30** manuell in einem 50 µmol mit einer Gesamtausbeute von 82% (18 mg) synthetisiert und bezüglich seiner Bindungseigenschaft mittels Oberflächenplasmonenresonanz mit demselben Chip untersucht (Abbildung 33). Die Konzentrationsreihe mit dem Fragment PrP(90-231) führte zu sehr kleinen RU-Werten, welche nicht eindeutig bestimmt werden konnten.

Die Auswertung der SPR-Daten, die mit rhPrP(23-231) erhalten wurden, ergibt für **30** einen  $K_D$ -Wert von 1264  $\mu$ M. Demnach ist die Sequenz RYP am Bindungsepitop beteiligt. Dies steht im Einklang mit den Resultaten, die mit den Fluorderivaten **9a** und **9b** erzielt wurden, in denen die Interaktion der Hydroxylgruppe von Tyrosin mit dem Protein charakterisiert werden konnte. Das Peptid **30** bindet allerdings im Vergleich zu **9** um den Faktor 51 schlechter, was darauf schließen lässt, dass die Aminosäurereste, die im Peptid **9** die Sequenz RYP umgeben,

die Bindungseigenschaft deutlich zu verbessern scheinen. Das *epitope mapping* konnte somit nur bedingt bestätigt werden.



**Abbildung 33:** A) Affinitätsplot des Peptids **30** (RYP) mit dem Prionprotein PrP(23-231). Im Vergleich zu dem Peptid **9** zeigt das verkürzte Peptidfragment **30** einen um den Faktor 51 schlechteren  $K_D$ -Wert.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids **30** deutete darauf hin, dass das Peptid als ein *trans/cis*-Rotamerengemisch zwischen der Tyrosin-Prolin-Amidbindung im Verhältnis 2.2:1 vorliegt, wobei davon ausgegangen wird, dass das *trans*-Isomer das stabilere ist. Es ist anzunehmen, dass die beiden Rotamere aufgrund ihrer konformellen Unterschiede nicht gleichermaßen gut an das Protein binden. Die angegebenen Konzentrationen des Affinitätsplots beziehen sich auf das Isomerengemisch. In dem Fall, dass die Komponenten unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen und die Geschwindigkeit der Isomerisierung im Vergleich zum Bindungsereignis langsam ist, ist der ermittelte K<sub>D</sub>-Wert nicht aussagekräftig.

## 4.5 Einfluss der Glycosylierung auf die Struktur und die Bindungsaffinität des Peptidfragments T192-T201

Glycosylierungen beeinflussen häufig die Faltung von Peptiden und Proteinen. Daher sollte der Einfluss der Glycosylierungsstelle an N197 auf die Struktur und die Bindungseigenschaft gegenüber rhPrP untersucht werden.

Dazu wurde zunächst das unglycosylierte Referenzpeptid **31** TTKGENFTET (T192-T201) vollautomatisch am Peptidsyntisizer in einem 50 µmol Ansatz dargestellt. Nach Aufreinigung des Rohprodukts mittels RP-HPLC wurden 33.2 mg entsprechend einer Gesamtausbeute von 59% des Peptids **31** erhalten. In der Abbildung 34 ist der NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des Referenzpeptids dargestellt. Das Spektrum lässt auf eine hohe Reinheit der Verbindung schließen.



**Abbildung 34:** NH-Bereich des TOCSY-Spektrums vom Peptid TTKGENFTET **31**. Das Spektrum wurde in  $H_2O/D_2O$  im Verhältnis 9:1 (pH 4) bei 276K mit einer Spektrometerfrequenz von 700 MHz aufgenommen.

Als synthetisch relativ leicht zugängliches Saccharid für das Glycopeptid wurde Chitobiose verwendet, welches ein Teil der *core*-Struktur repräsentiert. Das Peptid TTKGEN[ $\beta$ -*D*-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -*D*-GlcNAc]FTET (**32**) wurde in einer Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese dargestellt. Die Ansatzgröße betrug 50 µmol. Vom C-Terminus ausgehend erfolgte die Anknüpfung der ersten vier Aminosäuren an die Festphase vollautomatisiert am Peptidsynthesizer. Die Anbindung des Fmoc-geschützten N $\gamma$ -Chitobiosylasparagin-Bausteins wurde manuell durchgeführt, wobei die Ausbeute 30% betrug. Die Kupplung der restlichen Aminosäuren erfolgte wieder vollautomatisch. Die Hydroxyl-Gruppen des Kohlenhydratrests wurden mit Hydrazinhydrat und MeOH an der Festphase entschützt, und das Glycopeptid vom Harz abgespalten. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC wurden 9 mg entsprechend einer Gesamtausbeute von 11% des Produktes **32** erhalten. Der NH-Bereich des TOCSY-Spektrums lässt ebenfalls auf eine hohe Reinheit des Glycopeptids schließen, auch die NH-Spuren des Saccharids sind eindeutig zu erkennen (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des Glycopeptids TTKGEN[ $\beta$ -*D*-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -*D*-GlcNAc]FTET **32**. Das Spektrum wurde in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O im Verhältnis 9:1 (pH 4) bei 276K mit einer Spektrometerfrequenz von 700 MHz aufgenommen.

#### 4.5.1 SPR-Messungen von 31 und 32 mit rhPrP(23-231)

Um den Einfluss der Glycosylierung auf die Affinität des Peptidfragments T192-T201 gegenüber rhPrP zu untersuchen, wurden die Bindungseigenschaften des Glycopeptids und des unglycosylierten Referenzpeptids mittels SPR analysiert und miteinander verglichen. Die SPR-Messungen wurden innerhalb der Messreihen der Fluorderivate mit dem gleichen Sensorchip durchgeführt. Die Belegung mit dem Prionprotein rhPrP(23-231) betrug 149 fmol.

Abbildung 36 zeigt die Sensorgramme, die für das Glycopeptid erhalten wurden. Die Assoziationskurven der kleinen Ligandkonzentrationen (50, 100 und 250  $\mu$ M) streben einem Maximalwert zu. Die Kurven der höheren Konzentrationen scheinen zunächst einen Sättigungswert zu erreichen (bis zu ca. 100 s) anschließend steigen die Kurven linear an. Nach Beendigung der Injektion regeneriert das System in der Regel nahezu vollständig. Die Sensorgramme des Referenzpeptids zeigen einen ähnlichen Verlauf.



Abbildung 36: Sensorgramme des Glycopeptids 32.

Für das Referenzpeptid ergab sich eine lineare Abhängigkeit der RU-Werte von der Konzentration, was auf eine unspezifische Wechselwirkung hindeutet (siehe Abbildung 37A). Die Kurve des Glycopeptids nähert sich hingegen bei steigenden Konzentrationen einem maximalen Grenzwert an (Abbildung 37B).



Abbildung 37: A) Affinitätsplot des unglycosylierten Referenzpeptids 31. B) Der Affinitätsplot des Glycopeptids 32.

Werden alle Konzentrationen bei dem Fit an die Gleichung 13 berücksichtigt, so ergibt sich für das Glycopeptid eine Dissoziationskonstante von  $455 \,\mu$ M. Bei der Betrachtung der Abbildung 37B ist jedoch auch vorstellbar, dass das Glycopeptid ab einer Konzentration von 750  $\mu$ M unspezifisch mit dem Protein interagiert. Berücksichtigt man bei dem *one-site binding*-Fit nur die Daten bis zu einer Konzentration von 500  $\mu$ M, so ergibt sich der Affinitätsplot, der in Abbildung 38 dargestellt ist. Unter dieser Annahme besäße **32** eine Dissoziationskonstante von 61  $\mu$ M. Zwischen diesen beiden Situationen kann anhand der vorhandenen Daten nicht eindeutig unterschieden werden.



**Abbildung 38:** Affinitätsplot des Glycopeptids **32** bei Berücksichtigung der Daten bis zu einer Konzentration von 500 µM.
Der Vergleich der Daten lässt vermuten, dass die Bindungsspezifität des Peptidfragments T192-T201 von dem Saccharid herrührt. Das Glycan scheint demnach entweder direkt an der Bindung teilzunehmen oder die aktive Konformation des Peptids zu stabilisieren.

### 4.5.2 Konformationsanalyse des Referenzpeptids 31 und des Glycopeptids 32

Zur Bestimmung von Interprotonenabständen sollten 2D-NOESY-Spektren aufgenommen werden. Die Korrelationszeiten des Glycopeptids **32** bzw. der unglycosylierten Referenz **31** liegen allerdings in dem Bereich, in dem der theoretische maximale NOE bei den gegebenen Spektrometerfrequenzen (500 MHz und 700 MHz) das Vorzeichen wechselt. Daher mussten für die NOE-Aufbaukurven zunächst Messbedingungen gefunden werden, die eine sinnvolle Auswertung der Spektren erlauben. Dies ist nur unter Bedingungen gegeben, unter denen sowohl **32** als auch **31** ausschließlich positive oder negative NOE-Kreuzsignale zeigen. Bei einer Temperatur von 276 K waren sowohl für das Referenzpeptid als auch für das Glycopeptid am 700 MHz-Spektrometer nur negative NOE-Kreuzsignale zu beobachten. Für beide Peptide wurden dann NOESY-Spektren bei Mischzeiten von 50, 100, 200, 400, 800 und 1200 ms aufgenommen. Die Spektren lieferten gut separierte und somit gut integrierbare Signale.

innerhalb eines Moleküls weisen oftmals unterschiedliche Einzelne Fragmente Beweglichkeiten aufweisen. Für Molekülgruppen, deren Korrelationszeiten in der Nähe des Nulldurchgangs auf der NOE-Kurve liegen, lassen sich aus den NOE-Aufbaukurven keine zuverlässigen Abstände bestimmen. Um sicherzustellen, dass die NOESY-Aufbaureihe auch für das Referenzpeptid sinnvolle Distanzen liefert, sollten vorab für 31 die Abstände zwischen dem β- und den γ-Protonen von T193 bzw. T199 aus den NOE-Aufbaukurven bestimmt werden. Diese Kreuzsignale waren in einem NOESY-Spektrum, das zuvor bei 300 K am 700 MHz-Spektrometer aufgenommen wurde, positiv. Sie besitzen demnach die kleinste Korrelationszeit und befinden sich auf der NOE-Kurve am dichtesten am Nulldurchgang. Mit Hilfe des Programms SYBYL kann der theoretische Protonenabstand zwischen den β- und γ-Protonen eines Threonins gemessen werden. Bei Übereinstimmung mit den Distanzen aus den NOE-Daten kann davon ausgegangen werden, dass die Auswertung der NOE-Aufbaureihen sinnvolle interatomare Abstände für das Molekül liefert.

Üblicherweise werden Protonenabstände aus NOE-Aufbauraten durch Vergleich mit einem Referenzabstand ermittelt. Dazu werden die Kreuzrelaxationsraten, die den Anfangssteigungen der Aufbaukurven entsprechen, zueinander in Beziehung gesetzt. Dies ist nur sinnvoll, wenn

die Korrelationszeiten aller internuklearen Vektoren in etwa gleich sind. Bei starker Anisotropie der Molekülbeweglichkeit muss streng genommen ein aufwendigerer Weg beschritten werden, der eine Bestimmung der Korrelationszeiten für jeden C-H-Vektor einschließt. In der vorliegenden Arbeit wurde aber davon ausgegangen, dass sich die Korrelationszeiten der Molekülfragmente ähneln, und für die Berechnung der interatomaren Abstände beider Peptide die geminalen β-Protonen von F198 als Referenzsignal verwendet. Zur Berechnung des prozentualen NOE-Effekts werden die Kreuzsignalvolumina durch das Volumen eines Diagonalpeaks geteilt, das durch exponentielle Extrapolation auf die Mischzeit Null gewonnen wird. Hier wurden die Peakvolumina jeweils auf das Diagonalsignal des Hβ-Protons von F198 bezogen. Zur Berechnung der Aufbaurate werden die prozentualen NOEs gegen die Mischzeit für das jeweilige Kreuzsignal aufgetragen. Die Anfangssteigung einer an die Datenpunkte angepassten doppelt exponentiellen Funktion ist proportional zur Kreuzrelaxationsrate derjenigen Protonen, die an dem Kreuzsignal teilhaben. Aus ihnen können direkt die Abstände über die Gleichung 12 berechnet werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass an einem Kreuzsignal mehr als zwei Protonen beteiligt sein können. In diesem Fall muss der ermittelte Abstand durch einen Korrekturfaktor (Tabelle 2, Kapitel 2.2) berichtigt werden.

Das Kreuzsignal zwischen dem  $\beta$ -Proton und den  $\gamma$ -Protonen von T193 ergab auf diese Weise einen Abstand von 2.57 Å. Der Abstand zwischen den gleichen Protonen von T199 wurde auf 2.43 Å bestimmt. Der theoretische Wert, der sich aus der Bestimmung mit dem Programm SYBYL ergab, betrug 2.71 Å und war somit mit den empirisch ermittelten Abständen vergleichbar. Die NOE-Aufbaureihe sollte daher zu sinnvollen interatomaren Abständen des Moleküls führen.

Analog wurden die Aufbaukurven aller in den Spektren integrierbaren Kreuzsignale für die beiden Peptide ausgewertet. Die Integration der Peakvolumina erfolgte hierbei mit dem im Programm AURELIA der Firma Bruker implementierten Segmentierungsalgorithmus. Bei Signalüberlagerungen bietet dieser Algorithmus Vorteile gegenüber anderen, da hier keine willkürlichen Integrationsgrenzen gesetzt werden, sondern das Signal von dem Maximum ausgehend "herab integriert" wird. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass das Maximum vor dem Integrationsvorgang festgelegt wird. Da es dem Programm trotz der guten Spektrenqualität nicht gelang, die Maxima und die Multiplettstruktur der einzelnen Signale automatisch zu erkennen, wurden die Maxima aller Signale in den sechs Spektren für das Glyco- und das Referenzpeptid manuell festgelegt. Der doppelt exponentielle Fit ist ein iteratives Verfahren und hängt stark von den gewählten Startwerten der Fitparameter ab. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Programm die Minimalwerte verwendete. Die Auswertroutine des Programms AURELIA erlaubt die automatisierte Auswertung der Aufbaukurven und gibt direkt die berechneten Abstände bezogen auf das Referenzsignal an. Für das Referenzpeptid **31** wurden auf diese Weise 42 Interprotonenabstände erhalten und falls nötig mit den Korrekturfaktoren multipliziert. Die korrigierten Protonenabstände sind in Tabelle 5 aufgeführt. Abbildung 39 zeigt einige der sich ergebenden Aufbaukurven.

**Tabelle 5:** Protonenabstände des Referenzpeptids **31**. Für Kreuzsignale, deren NOE-Aufbaukurven nicht sinnvoll ausgewertet werden konnten, wurde ein Bereich von 1.8 - 5.0 Å als *constraint* angegeben. Die Nomenklatur "198 PHE HN 198 PHE HA" bezeichnet den Protonenabstand zwischen dem NH- und dem H $\alpha$ -Proton von Phe198; Q = NMR-Pseudoatom. *Long range* Kontakte sind grau hinterlegt.

|    | Kreuzsignal            | Abstand [Å] |    | Kreuzsignal            | Abstand [Å] |
|----|------------------------|-------------|----|------------------------|-------------|
| 1  | 198 PHE HN 198 PHE HA  | 1.8 - 5.0   | 22 | 193 THR HN 193 THR HB  | 2.60        |
| 2  | 196 GLU HN 195 GLY QA  | 1.8 - 5.0   | 23 | 197 ASN HN 197 ASN QB  | 2.66        |
| 3  | 198 PHE HN 198 PHE QB  | 2.53        | 24 | 197 ASN HN 197 ASN HA  | 2.63        |
| 4  | 194 LYS HN 194 LYS HA  | 2.67        | 25 | 200 GLU HN 200 GLU HA  | 2.87        |
| 5  | 198 PHE HN 199 THR HN  | 2.86        | 26 | 201 THR HN 201 THR QG2 | 3.23        |
| 6  | 200 GLU HN 199 THR HN  | 2.82        | 27 | 201 THR HN 200 GLU QB  | 1.8 - 5.0   |
| 7  | 194 LYS HN 193 THR HB  | 1.8 - 5.0   | 28 | 197 ASN HN 196 GLU QG  | 3.67        |
| 8  | 200 GLU HN 199 THR HB  | 1.8 - 5.0   | 29 | 197 ASN HN 195 GLY QA  | 3.53        |
| 9  | 200 GLU HN 201 THR HN  | 2.97        | 30 | 201 THR HN 200 GLU QG  | 3.99        |
| 10 | 200 GLU HN 200 GLU QB  | 2.94        | 31 | 201 THR HN 200 GLU HA  | 2.40        |
| 11 | 200 GLU HN 200 GLU QG  | 3.16        | 32 | 199 THR HN 199 THR QG2 | 3.09        |
| 12 | 196 GLU HN 196 GLU QG  | 3.24        | 33 | 199 THR HN 198 PHE QB  | 3.10        |
| 13 | 198 PHE HN 197 ASN QB  | 3.17        | 34 | 199 THR HN 199 THR HB  | 2.68        |
| 14 | 196 GLU HN 196 GLU QB  | 2.54        | 35 | 199 THR HN 199 THR HA  | 2.74        |
| 15 | 194 LYS HN 194 LYS QB  | 2.63        | 36 | 199 THR HN 198 PHE HA  | 1.8 - 5.0   |
| 16 | 193 THR HN 193 THR QG2 | 3.18        | 37 | 197 ASN HN 198 PHE HN  | 2.85        |
| 17 | 194 LYS HN 193 THR QG2 | 1.8 - 5.0   | 38 | 197 ASN HN 196 GLU HN  | 2.80        |
| 18 | 194 LYS HN 194 LYS QG  | 3.23        | 39 | 195 GLY HN 195 GLY QA  | 2.32        |
| 19 | 200 GLU HN 199 THR QG2 | 3.21        | 40 | 195 GLY HN 194 LYS HA  | 1.8 - 5.0   |
| 20 | 193 THR HN 196 GLU QB  | 3.83        | 41 | 195 GLY HN 194 LYS QG  | 3.53        |
| 21 | 194 LYS HN 194 LYS QD  | 4.29        | 42 | 195 GLY HN 196 GLU HN  | 1.8 - 5.0   |



**Abbildung 39:** Exemplarische NOE-Aufbaukurven des unglycosylierten Referenzpeptids **31**. Dabei ist jeweils der prozentuale NOE bezogen auf das Diagonalsignal des H $\beta$ -Protons von F198 aufgetragen.

Neben den intraresidualen wurden hauptsächlich sequentielle NOE-Kontakte beobachtet. Hervorzuheben ist aber zum einen der Abstand zwischen dem NH-Proton von N197 und dem H $\alpha$ -Proton von G195, der auf 3.53 Å bestimmt wurde, sowie der *long range* Kontakt zwischen dem NH-Proton von T193 und dem H $\beta$ -Proton von E196 (3.83 Å). Für neun Kreuzsignale konnten die NOE-Aufbaukurven nicht sinnvoll ausgewertet werden, da sie zu wenig Datenpunkte enthielten. Da die betreffenden Protonenpaare aber in einigen NOESY-Spektren Kreuzsignale lieferten, wurde für sie eine räumliche Nähe von 1.8-5.0 Å angenommen, da nur für diesen Abstandsbereich NOE-Kreuzsignale möglich sind.

Auf analoge Weise wurden die NOESY-Spektren des Glycopeptids ausgewertet. Es ergaben sich 44 interatomare Abstände (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Protonenabstände des Glycopeptids **32**. Für Kreuzsignale, deren NOE-Aufbaukurven nicht sinnvoll ausgewertet werden konnten, wurde ein Bereich von 1.8 - 5.0 Å als *constraint* angegeben. *Long range* Kontakte sind grau hinterlegt.

|    | Kreuzsignal            | Abstand [Å] |    | Kreuzsignal             | Abstand [Å] |
|----|------------------------|-------------|----|-------------------------|-------------|
| 1  | 196 GLU HN 195 GLY QA  | 2.27        | 23 | 193 THR HN 193 THR QG2  | 3.34        |
| 2  | 194 LYS HN 193 THR HA  | 1.8 - 5.0   | 24 | 194 LYS HN 193 THR QG2  | 3.47        |
| 3  | 201 THR HN 200 GLU HA  | 2.35        | 25 | 197 ASN HN 196 GLU QG   | 1.8 - 5.0   |
| 4  | 196 GLU HN 196 GLU QB  | 2.46        | 26 | 200 GLU HN 198 PHE HA   | 1.8 - 5.0   |
| 5  | 194 LYS HN 194 LYS QB  | 2.61        | 27 | 195 GLY HN 195 GLY QA   | 2.40        |
| 6  | 196 GLU HN 196 GLU HA  | 2.80        | 28 | 193 THR HN 192 THR QG2  | 4.09        |
| 7  | 198 PHE HN 198 PHE QB  | 2.55        | 29 | 193 THR HN 196 GLU QB   | 3.97        |
| 8  | 197 ASN HN 197 ASN QB  | 2.52        | 30 | 199 THR HN 199 THR QG2  | 1.8 - 5.0   |
| 9  | 193 THR HN 193 THR HB  | 1.8 - 5.0   | 31 | 199 THR HN 198 PHE QB   | 2.95        |
| 10 | 194 LYS HN 194 LYS HA  | 2.68        | 32 | 199 THR HN 199 THR HA   | 2.63        |
| 11 | 197 ASN HN 196 GLU QB  | 2.70        | 33 | 199 THR HN 199 THR HB   | 2.59        |
| 12 | 200 GLU HN 200 GLU QB  | 2.76        | 34 | 199 THR HN 198 PHE HA   | 2.18        |
| 13 | 200 GLU HN 200 GLU HA  | 2.73        | 35 | 197 ASN HN 197 ASN HA   | 1.8 - 5.0   |
| 14 | 193 THR HN 193 THR HA  | 2.85        | 36 | 195 GLY HN 194 LYS QG   | 3.52        |
| 15 | 194 LYS HN 193 THR HB  | 2.85        | 37 | 195 GLY HN 194 LYS QB   | 3.12        |
| 16 | 200 GLU HN 199 THR HB  | 2.92        | 38 | 201 THR HN 201 THR QG2  | 3.65        |
| 17 | 196 GLU HN 196 GLU QG  | 3.07        | 39 | 201 THR HN 200 GLU QB   | 1.8 - 5.0   |
| 18 | 200 GLU HN 200 GLU QG  | 3.12        | 40 | 201 THR HN 200 GLU QG   | 4.27        |
| 19 | 193 THR HN 194 LYS HN  | 1.8 - 5.0   | 41 | 194 LYS HN 194 LYS QD   | 4.60        |
| 20 | 198 PHE HN 197 ASN QB  | 3.00        | 42 | 197 ASN QD2 201 THR QG2 | 4.91        |
| 21 | 194 LYS HN 194 LYS QG  | 1.8 - 5.0   | 43 | nag1.hn 201 THR QG2     | 4.53        |
| 22 | 200 GLU HN 199 THR QG2 | 3.30        | 44 | nag1.qc8 197 Asn QD2    | 4.06        |



**Abbildung 40:** Exemplarische Aufbaukurven des Glycopeptids **32**. Dabei ist jeweils der prozentuale NOE bezogen auf das Diagonalsignal des H $\beta$ -Protons von F198 aufgetragen.

Einige ausgewählte NOE-Aufbaukurven sind in der Abbildung 40 gezeigt. Wie im Fall des Referenzpeptids sind auch hier hauptsächlich intraresiduale und sequentielle NOE-Kontakte zu beobachten. Im Vergleich zum unglycosylierten Referenzpeptid weist das Glycopeptid allerdings mehr *long range* Abstände auf. Das NOE-Kreuzsignal zwischen dem NH-Proton von T193 und dem  $\beta$ -Proton von E196 ist auch in den Spektren des Glycopeptids zu erkennen (4.0 Å). Im Vergleich zum Referenzpeptid fehlt allerdings hier der Kontakt zwischen N197 und G195. Zusätzlich wird für **32** ein NOE-Kreuzsignal zwischen dem NH-Proton von E200 und dem H $\alpha$ -Proton von F198 beobachtet. Bemerkenswert sind die *long range* Kontakte zwischen dem  $\delta$ -Proton des glycosylierten N197 und den H $\gamma$ -Protonen von T201, welcher 4.9 Å beträgt. Auch das Glycan selbst scheint mit dem Peptidrückgrat über N197 verknüpft ist, weist einen Abstand von 4.5 Å zu den H $\gamma$ -Protonen von T201 auf. Demnach scheint das Glycopeptid eine Schlaufe zwischen dem C-Terminus und der Glycosylierungsstelle zu beschreiben.

Zur Berechnung der  $\phi$ -Winkel wurden zunächst aus den 1D-<sup>1</sup>H-*presat*-Spektren der beiden Peptide die <sup>3</sup>J<sub>NH,Hα</sub>-Kopplungskonstanten bestimmt. Durch Einsetzen der Kopplungskonstanten in Gleichung 9 ergeben sich direkt die  $\phi$ -Winkel bezogen auf die Kohlenstoffkette. Allerdings ist die Karplus-Gleichung nicht immer eindeutig, so dass sich in einigen Fällen mehrere Möglichkeiten für die entsprechenden Winkel ergeben. Durch den Vergleich der errechneten Winkel mit dem Ramachandran Plot (Abbildung 12), in dem die möglichen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel für eine Peptidkette graphisch dargestellt sind, lassen sich die korrekten Winkel herausfinden. In Tabelle 7 sind die Kopplungskonstanten und die zugehörigen Winkelmöglichkeiten für das Referenzpeptid und das Glycopeptid zusammengestellt, wobei diejenigen, die sich im Rachamadran Plot im erlaubten Bereich befinden, grau gekennzeichnet sind. Grau schraftfiert sind diejenigen Winkel, die in der unüblichen, linksgängigen Helix vorgefunden werden. Für alle  $\phi$ -Winkel des Peptidrückgrats sind demnach zwei Winkelwerte möglich. Im Folgenden werden die größeren Winkelbeträge (-150 bis -170°) als Winkelbereich A und die kleineren Beträge (-70 bis -90°) als Bereich B bezeichnet.

Glycin nimmt eine Sonderrolle ein, da es zwei  $\alpha$ -Protonen besitzt. Sowohl für das Referenzals auch für das Glycopeptid ist für die  $\alpha$ -Protonen jeweils ein Triplett zu beobachten. Die Kopplungskonstanten für die  ${}^{3}J_{\text{NH,H}\alpha}$ - bzw. der  ${}^{3}J_{\text{NH,H}\alpha}$ -Kopplung sind demnach sehr ähnlich. Dies ist nur in einer Konformation möglich, in der der Diederwinkel entlang der Kohlenstoffkette ca. ±180 beträgt.

| Peptid 31 | <sup>3</sup> J <sub>NH-Hα</sub> [Hz] | φ [°] <sup>1</sup> | Bereich A<br>∳[°] <sup>2</sup> | φ [°] <sup>3</sup> | Bereich Β<br>φ[°] <sup>4</sup> |
|-----------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| T193      | 7.48                                 | -                  | -151.49                        | -                  | -88.51                         |
| K194      | 5.98                                 | 83.01              | -163.41                        | 36.99              | -76.59                         |
| G195      | 5.56                                 | 88.18              | -166.57                        | 31.82              | -73.43                         |
| E196      | 6.84                                 | 65.72              | -156.77                        | 54.28              | -83.23                         |
| N197      | 7.48                                 | -                  | -151.49                        | -                  | -88.51                         |
| F198      | 6.84                                 | 65.72              | -156.77                        | 54.28              | -83.23                         |
| T199      | 7.69                                 | -                  | -149.65                        | -                  | -90.35                         |
| E200      | 6.84                                 | 65.72              | -156.77                        | 54.28              | -83.23                         |
| T201      | 7.91                                 | -                  | -147.64                        | -                  | -92.36                         |

**Tabelle 7:**  ${}^{3}J_{NH,H\alpha}$ -Kopplungskonstanten und die sich aus der Gleichung 9 ergebenden Winkelmöglichkeiten für das Peptid **31** (oben) bzw. das Glycopeptid **32** (unten). Die Winkel, die in Übereinstimmung mit dem Ramachandran Plot stehen, sind grau unterlegt. Schraffiert sind die Winkel hervorgehoben, die im Ramachandran Plot im Bereich der unüblichen linksgängigen  $\alpha$ -Helix liegen.

| Peptid 32 | <sup>3</sup> J <sub>NH-Hα</sub> [Hz] | φ [°] <sup>1</sup> | φ [°] <sup>2</sup> | φ [°] <sup>3</sup> | φ [°] <sup>4</sup> |
|-----------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| T193      | 7.48                                 | -                  | -151.49            | -                  | -88.51             |
| K194      | 5.98                                 | 83.01              | -163.41            | 36.99              | -76.59             |
| G195      | 5.98                                 | 83.01              | -163.41            | 36.99              | -76.59             |
| E196      | 6.62                                 | 72.43              | -158.51            | 47.57              | -81.49             |
| N197      | 7.70                                 | -                  | -149.56            | -                  | -90.44             |
| F198      | 7.27                                 | -                  | -153.27            | -                  | -86.73             |
| T199      | 7.48                                 | -                  | -151.49            | -                  | -88.51             |
| E200      | 6.84                                 | 65.72              | -156.77            | 54.28              | -83.23             |
| T201      | 7.27                                 | -                  | -153.27            | -                  | -86.73             |

$$\int_{0}^{1} \phi = 60^{\circ} + ar \cos\left[\frac{1.3}{13.4} + \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^{2} - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)}\right]; \\ \int_{0}^{2} \phi = 60^{\circ} + ar \cos\left[\frac{1.3}{13.4} - \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^{2} - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)}\right]; \\ \int_{0}^{3} \phi = 60^{\circ} - ar \cos\left[\frac{1.3}{13.4} + \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^{2} - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)}\right]; \\ \int_{0}^{4} \phi = 60^{\circ} - ar \cos\left[\frac{1.3}{13.4} - \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^{2} - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)}\right];$$

#### Strukturgenerierung mit dem Programm DYANA

Aus den ermittelten interatomaren Distanzen und  $\phi$ -Winkeln wurden mit Hilfe des Programms DYANA für das Glycopeptid und das Referenzpeptid Strukturen generiert.<sup>114</sup> Die Strukturen des Glycopeptids wurden dabei ohne die Saccharid-Einheit gerechnet, da in DYANA keine Nomenklatur der Zuckerprotonen implementiert ist. Die bestimmten Abstände dienten dabei als sog. *distance constraints* und wurden für die Berechnung jeweils als Bereich von ±5% bezogen auf die ermittelte Distanz angegeben. Die  $\phi$ -Winkel konnten nicht eindeutig zugeordnet, eine Kombination der zwei möglichen Werte für alle neun  $\phi$ -Winkel, würde aber 2<sup>9</sup> Rechnungen erfordern. Daher wurden für jedes Peptid zunächst zwei Rechnungen durchgeführt, wobei für die eine die Winkel des Bereiches A, für die andere die des Bereiches B als *dihedral angle constraints* eingesetzt wurden. Für G195 wurde stets ein  $\phi$ -Winkel von -167° (Referenzpeptid) bzw. von -163° (Glycopeptid) verwendet. Die Winkelbeschränkungen wurden dabei als Intervall von ±15° festgelegt. Da für das N-terminale T192 keine Kopplungskonstante bestimmt werden konnte, wurde hier die Winkeleinschränkung als Intervall von 0° bis -180° entsprechend der im Ramachandran Plot vorzufindenden Häufigkeit für die  $\phi$ -Winkel angegeben.

DYANA berechnete jeweils 500 Strukturen, die anhand von Zielfunktionen bewertet wurden. Je kleiner der Wert der Zielfunktion ist, umso besser sind die vorgegebenen *constraints* erfüllt. Die Zielfunktionswerte der Berechnungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

| Tabelle 8: Bereich der | Zielfunktionswerte | von 500 Strukturen | i, die mit dem Prog | ramm DYANA generiert |
|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| wurden.                |                    |                    |                     |                      |

|   | Referenzpeptid 31 | Glycopeptid 32 |
|---|-------------------|----------------|
| Zielfunktionswerte, aus den Rechnungen mit<br>Winkelbereich A | 3.6 - 6.4         | 2.9 - 5.8      |
| Zielfunktionswerte, aus den Rechnungen mit<br>Winkelbereich B | 1.4 - 5.0         | 1.5 - 8.8      |

Beim Vergleich der Zielfunktionswerte ist deutlich zu erkennen, dass für den Winkelbereich B Strukturen generiert werden konnten, in denen die *constraints* besser erfüllt waren. Die kleineren Winkelbeträge scheinen demnach wahrscheinlicher.

Für den sich anschließenden REDAC-Zyklus (*redundant dihedral angle constraints*), in dem die Strukturen über einen Algorithmus iterativ an die Distanz- und Winkelbeschränkungen angepasst werden, wurden jeweils aus den 500 Strukturen die besten 100 Konformationen ausgewählt. Es wurden drei REDAC-Zyklen durchgeführt, die jeweils 150, 400 und 800



Iterationsschritte enthielten. In Abbildung 41 sind die sich ergebenden Strukturen nach dem Rang der Zielfunktionswerte dargestellt.

**Abbildung 41:** Zielfunktionswerte der 100 Strukturen, die für die beiden Peptide nach dem REDAC-Zyklus erhalten wurden. Die Zielfunktionswerte, die aus den Berechnungen für das Referenzpeptid **31** hervorgingen, bei denen die φ-Winkel des Bereiches A als *constraints* verwendet wurden, sind in A) gezeigt. B) stellt die entsprechenden Zielfunktionen für **31** unter Verwendung des Winkelbereiches B dar. Die Ergebnisse der Rechnungen für das Glycopeptid **32** sind entsprechend in C) und D) gezeigt.

Beim Vergleich der Zielfunktionswerte, die jeweils für beide Peptide mit dem Winkelbereich A bzw. B erhalten wurden, fällt auf, dass die Winkel des Bereiches B wiederum zu deutlich kleineren Zielfunktionswerten führen. Für weitere Analysen und die folgende MD-Simulation wurden daher die Strukturen verwendet, die sich aus diesen Berechnungen ergaben.

Bei Betrachtung der Abbildung ist weiterhin zu beobachten, dass die Diagramme B und D, in denen für **31** und **32** die Strukturen dargestellt sind, die mit dem Winkelbereich B erhalten wurden, mehrere Stufen aufweisen. Solche Stufen deuten darauf hin, dass das Programm DYANA nur eine begrenzte Anzahl an Konformationen generieren kann, bei denen die Vorgaben in ähnlichem Maße erfüllt sind. Daher lässt das Ergebnis darauf schließen, dass der Konformationsraum durch die vorgegebenen *constraints* stark eingeschränkt ist. Von den 42 Distanzeinschränkungen, die für das Referenzpeptid vorgegeben wurden, wurden bei den gerechneten 100 Strukturen im Rahmen des gesetzten Toleranzbereiches acht verletzt. Für die Winkelvorgaben gab es hingegen keine Verletzungen. Die *constraints* des Glycopeptids wurden deutlich schlechter erfüllt. Von den 42 Abstandsbeschränkungen wurden nur 23 in allen 100 Strukturen erfüllt. Von den Winkelvorgaben wurde der  $\phi$ -Winkel von E200 verletzt. Um die generierten Konformationen des Referenzpeptids untereinander vergleichen zu können, wurden die *backbones* der zehn besten Strukturen, die aus den Berechnungen hervorgingen, mit dem Programm SYBYL bezogen auf die Struktur mit dem kleinsten Zielfunktionswert gefittet. In Abbildung 42 ist das Ergebnis für das Referenzpeptid dargestellt. Bei der Betrachtung des Stereoplots fällt auf, dass die Strukturen relativ ähnlich sind. Die einzelnen Aminosäuren weisen leicht unterschiedliche Orientierungen auf (rmsd: 0.3-1.7 Å). Die Strukturen scheinen daher recht gut definiert zu sein, weisen aber keine deutlichen Strukturmerkmale für ein  $\beta$ -Faltblatt oder eine  $\alpha$ -Helix auf.

In einer sich den DG-Rechnungen anschließenden constrained MD-Simulation des Glycopeptides, für die die gleichen Distanz- und Winkelvorgaben wie für die DYANA-Rechnung mit dem Winkelbereich B verwendet wurden, zeigte sich allerdings, dass sich im Winkelvorgaben wurde dabei auf 0.05 kcal/mol[ $\circ$ ]<sup>2</sup> festgelegt. Der  $\phi$ -Winkel von T193 änderte sich von -90 auf -130°, der von T201 von -80 auf -140. Diese finalen Winkel entsprechen eher denen des Winkelbereiches A. Es wurden daher erneut mit dem Programm DYANA Strukturen generiert, wobei für T193 ein ¢-Winkel von -151 und für T201 einer von -153 eingesetzt wurde. Die Rechnung wurde analog durchgeführt. Die Zielfunktionswerte der zunächst generierten 500 Strukturen lagen im Bereich von 1.4 - 4.1. Nach dem sich anschließenden REDAC-Zyklus waren die Vorgaben etwas besser erfüllt als in der vorhergehenden Rechnung mit den anderen ø-Winkeln für T193 und T201. In allen 100 Strukturen waren jetzt 27 distance constraints sowie alle Winkelvorgaben erfüllt. Der backbone-fit der zehn besten Strukturen ist in Abbildung 43 dargestellt. Da das Saccharid nicht in den Berechnungen berücksichtigt wurde, ist hier nur die peptidische Struktur gezeigt. Ebenso wie die Konformationen des Referenzpeptids sind die des Glycopeptids einander recht ähnlich mit vergleichbaren Abweichungen der Strukturen untereinander (rmsd: 0.2-1.7 Å).



**Abbildung 42:** Stereoplot (*crossed eyes*) der zehn besten Strukturen des unglycosylierten Referenzpeptids **31**, die aus der DG-Berechnung mit DYANA hervorgingen. In der Abbildung liegt der C-Terminus oben und der N-Terminus unten.



**Abbildung 43:** Stereoplot (*crossed eyes*) der zehn besten Strukturen des Glycopeptids **32** aus der DYANA-Rechnung mit den veränderten  $\phi$ -Winkeln für T193 und T201. In der Abbildung liegt der C-Terminus oben und der N-Terminus unten.

Im Vergleich zu **31** weist das Glycopeptid eine deutlich gestrecktere Konformation auf, die vermutlich in dem sterischen Anspruch des Saccharids ihre Begründung findet. Eine Sekundärstruktur ist auch für das Glycopeptid nicht erkennbar. Jedoch wird die postulierte Schlaufe zwischen dem Glycan und dem C-Terminus durch die DG-Rechnungen bestätigt.

### Constrained Moleküldynamiksimulation

Aus den distance geometry Rechnungen wurden jeweils die Konformationen mit den kleinsten Ziefunktionswerten als Startstrukturen für die constrained MD-Simulation ausgewählt. Die Startstruktur des Glycopeptids ergab sich aus der Rechnung mit den veränderten  $\phi$ -Winkeln. Das Disaccharid wurde an der entsprechenden Position in die Struktur eingefügt und die Winkel des Glycans so vordefiniert, dass die *constraints* bestmöglich erfüllt waren bzw. das Saccharid eine energiegünstige Konformation einnahm. Die in der Sequenz enthaltenen Glutaminsäuren wurden als Glutamate, die Aminogruppe der Lysinseitenkette sowie der N-Terminus als NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppe und der C-Terminus als Amid dargestellt. Anschließend wurden den Atomen nach der Gasteiger-Marsili-Methode Ladungen zugeordnet. Die distance range und torsion constraints wurden wie auch in den vorhergehenden DG-Rechnungen verwendet. Für das Glycopeptid wurden zusätzlich die Distanzeinschränkungen eingesetzt, die sich auf die Saccharid-Einheit beziehen (vgl. Abstände 43 und 44 in Tabelle 6). Das Strafpotential für die Abstandseinschränkungen wurde jeweils auf 20 kcal/molÅ<sup>2</sup>, das Potential für die Winkelbeschränkungen des Referenzpeptids auf 0.05 kcal/mol[°]<sup>2</sup> gesetzt. Aufgrund der vorhergehenden MD-Simulation des Glycopeptids, in der sich die ø-Winkel im Verlauf der Simulation teilweise stark änderten, wurden die torsion constraints von 32 mit einem Strafpotential von 0.1 kcal/mol<sup>o</sup><sup>2</sup> belegt. Die Strukturen wurden im Vakuum energieminimiert und in Wasser solvatisiert. Für das Referenzpeptid ergab sich eine Wasserbox eines Volumens von 30124 Å<sup>3</sup> mit 1315 Wassermolekülen. Die resultierende Wasserbox des Glycopeptids enthielt 1558 Wassermoleküle mit einem Volumen von 36422 Å<sup>3</sup>. Nach einer Energieminimierung der gesamten Box über 1000 Iterationsschritte wurde jeweils eine Simulation einer Dauer von 20 ps zur Relaxation der Wasserbox durchgeführt. Die Endstrukturen dieser Simulationen zeigten jeweils keine deutlichen Abweichungen von den ursprünglichen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Solvation nicht zu starken Konformationsänderungen der Moleküle führte. Die Endstrukturen der kurzen Rechnungen konnten daher jeweils als Startstrukturen für eine längere MD-Simulation über einen Zeitraum von 300 ps eingesetzt werden. Die Auswertung der Simulationen erfolgte anhand der

Trajektorien aller  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel, der Änderungen der interatomaren Abstände und der potentiellen Energien der Strukturen.

Während der Simulation des Referenzpeptids **31** änderte sich die potentielle Energie des Systems um ca. 1000 kcal/mol. Nach 270 ps schien die Energie einigermaßen stabil (Abbildung 44).



Abbildung 44: Verlauf der potentiellen Energie während der MD-Simulation des Referenzpeptids 31.

Die  $\phi$ -Winkel streuten um ca.  $\pm 10^{\circ}$ , ihre Durchschnittswerte blieben aber im Verlauf der MD-Simulation konstant und wichen nur wenig ( $\pm 1^{\circ}$ - 7°) von den vorgegebenen Winkeln ab. Die  $\psi$ -Winkel wiesen mit  $\pm 15 - 20^{\circ}$  eine etwas größere Streuung auf. Auch hier blieben die Durchschnittswerte während der Simulation recht konstant. Hervorzuheben sind allerdings der  $\psi$ -Winkel von N197, der sich von 0° auf -20° änderte, und der  $\psi$ -Winkel des C-terminalen T201, welcher um ca. 70° streute. Betrachtet man die Trajektorie der Strukturen so sind keine offensichtlichen Strukturänderungen zu beobachten. Keiner der interatomaren Abstände veränderte sich deutlich. Demnach scheint die Struktur des Referenzpeptids durch die Winkelund Abstandvorgaben recht gut definiert zu sein. Das Ergebnis lässt weiterhin darauf schließen, dass die aus der DG-Rechnung hervorgehende Startstruktur energiegünstig ist. Die Endstruktur der MD-Simulation von 31 ist mit den distance range constraints in Abbildung 46 gezeigt. Lediglich der intraresiduale Abstand zwischen dem NH-Proton und dem HB-Proton von E196 ist stark verletzt. Dabei ist aber zu bedenken, dass Methylenprotonen und Methylprotonen nicht absolut zugeordnet werden konnten, so dass die distance range constraints teilweise zu NMR-Pseudoatomen definiert werden mussten. In dem Fall von E196 ist der genannte constraint erfüllt, wenn man den Abstand zu dem H
ß1-Proton definiert. Die sich ergebenden  $\phi$ -,  $\psi$ - und  $\omega$ -Winkel der energieminimierten Endstruktur sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

**Tabelle 9:** Die  $\phi$ -,  $\psi$ - und  $\omega$ -Winkel der energieminierten Endstruktur des Referenzpeptids **31**. Für die  $\phi$ -Winkel sind ebenfalls die experimentell bestimmten Werte aufgeführt.  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel sind bezogen auf die schweren Atome angegeben, der  $\omega$ -Winkel wurde vom H $\alpha$ -Atom ausgehend entlang der Seitenkette bestimmt.

|      | $\phi_{soll}$ / ist [°] | ψ <sub>ist</sub> [°] | ω <sub>ist</sub> [°] |
|------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| T193 | -89 / -88               | -152                 | 170                  |
| K194 | -77 / -75               | 18                   | 169                  |
| G195 | -167 / -164             | 52                   | -                    |
| E196 | -83 / -81               | -4                   | -164                 |
| N197 | -89 / -84               | -17                  | 99                   |
| F198 | -83 / -80               | -20                  | 76                   |
| T199 | -90 / -89               | -26                  | -171                 |
| E200 | -83 / -83               | 36                   | -164                 |
| T201 | -92 / -83               | -33                  | 55                   |

Das Energieprofil der MD-Simulation des Glycopeptids **32** zeigt, dass sich die potentielle Energie ab ca. 200 ps einem Grenzwert annäherte (Abbildung 45). Sie sank um ca. 700 kcal/mol.



Abbildung 45: Verlauf der potentiellen Energie während der MD-Simulation des Glycopeptids 32.

Die Trajektorien der Winkel und der Strukturen deuten auch für **32** darauf hin, dass die Struktur durch die *constraints* gut vordefiniert ist. Die  $\phi$ -Winkel wiesen im Vergleich zum Referenzpeptid eine etwas geringere Varianz auf (ca.  $\pm 5$ ), was aber vermutlich mit dem für **32** höheren Strafpotentialen der Winkelbeschränkungen zu begründen ist. Die Durchschnittswerte wichen um  $\pm 1^{\circ}$ - 3° von den Winkelvorgaben ab. Die Streuung der  $\psi$ -Winkel ist mit der des Referenzpeptids vergleichbar. Die sich ergebenden  $\phi$ -,  $\psi$ - und  $\omega$ -Winkel der energieminimierten Endstruktur sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

|        | $\phi_{soll}$ / ist [°] | ψ <sub>ist</sub> [°] | ω <sub>ist</sub> [°] |
|--------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| T193   | -151 / -152             | -127                 | 167                  |
| K194   | -77 / -75               | -42                  | -83                  |
| G195   | -163 / -162             | 114                  | -                    |
| E196   | -81 / -81               | -148                 | -172                 |
| N197   | -90 / -88               | 176                  | -172                 |
| F198   | -86 / -85               | 150                  | 73                   |
| T199   | -89 / -88               | -46                  | -101                 |
| E200   | -83 / -82               | 159                  | 56                   |
| T201   | -153 / -152             | -68                  | 60                   |
| GlcNAc | - / 56                  | -                    |                      |
| GlcNAc | - / -59                 | -121                 |                      |

**Tabelle 10:** Die  $\phi$ -,  $\psi$ - und  $\omega$ -Winkel der energieminierten Endstruktur des Glycopeptids **32**. Für die  $\phi$ -Winkel sind ebenfalls die experimentell bestimmten Werte aufgeführt.  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel sind bezogen auf die schweren Atome angegeben, der  $\omega$ -Winkel wurde vom H $\alpha$ -Atom ausgehend entlang der Seitenkette bestimmt.

In Abbildung 47 ist die Endstruktur der MD-Simulation von **32** gezeigt. Die Saccharid-Einheit ist rot gekennzeichnet. Die Struktur des Glycopeptids zeigt vier stark verletzte *upper limits*. Allerdings sind diese Abstandsvorgaben wiederum zu Pseudoatomen von Methylenprotonen definiert. Die Pseudoatome weisen dabei in allen Fällen eine größere räumliche Distanz zum jeweiligen Abstands-Partner auf als das nähergelegene der beiden Methylenprotonen. Man kann daher auch diese *distance constraints* als erfüllt annehmen. Die Abstände von dem NH-Proton des GlcNAc-Monomers und dem Hδ-Proton von N197 zu den Hγ-Protonen von T201 stimmen recht gut mit den Distanzen überein, die sich aus der Auswertung der NOE-Aufbaukurven ergaben. Auffällig ist die normalerweise unübliche *cis*-Konformation der Peptid-Saccharid-Bindung. Sie wird allerdings bestätigt durch einen schwachen NOE-Kontakt zwischen den β-Protonen von N197 und dem H2-Proton der GlcNAc-Einheit. Der φ- und  $\psi$ -Winkel der glycosidischen Bindung variiert im Verlauf der MD-Simulation jeweils um ca. 40°, der Durchschnittswert bleibt aber verhältnismäßig konstant.



**Abbildung 46:** Energieminimierte Endstruktur der MD-Simulation des Peptids **31** (*crossed eyes*). Die Abstandsvorgaben sind verschieden farbig gekennzeichnet. Stark verletzte *upper limits* (rot); schwach verletzte *upper limits* (violett); erfüllte *constraints* (grün); schwach verletzte *lower limits* (blau).



**Abbildung 47:** Energieminimierte Endstruktur der MD-Simulation des Glycopeptids **32** (*crossed eyes*). Die Abstandsvorgaben sind verschieden farbig gekennzeichnet. Stark verletzte *upper limits* (rot); schwach verletzte *upper limits* (violett); erfüllte *constraints* (grün); schwach verletzte *lower limits* (blau).



**Abbildung 48:** Die Struktur des Referenzpeptids **31** (rot) ist mit der des Prionproteins<sup>29</sup> übereinander gelegt.



Abbildung 49: Überlagerung der Struktur des Glycopeptids 32 (rot) mit der des Prionproteins<sup>29</sup>.

Die Endstrukturen der MD-Simulationen wurden jeweils mit der NMR-Struktur des unglycosylierten, humanen Prionproteins<sup>29</sup> überlagert (Abbildung 48 und Abbildung 49). Die Struktur des Referenzpeptids scheint sich N-terminal gut an die Proteinstruktur anzupassen. In Richtung C-Terminus werden die Abweichungen zum Proteinrückgrat etwas größer (rmsd: 2.3 Å).

Der Fit der *backbones* von Protein und Glycopeptid ergibt eine etwas größere Abweichung (rmsd: 2.6 Å). Vor allem im Bereich der Glycosylierungsstelle sind die strukturellen Unterschiede deutlich. Auch im Vergleich zu der Abbildung 48 in der der Fit des Referenzpeptids dargestellt ist, wird an dieser Stelle die Verschiedenheit der Strukturen von **31** und **32** besonders offensichtlich. Das Saccharid steht aus der Ebene, die durch die Helices  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und die Loop aufgespannt wird, heraus, ist aber in Richtung der Helices geneigt.

Die konformellen Diversitäten von **31** und **32** lassen die Frage aufkommen, inwieweit sich die Struktur des nativen, glycosylierten hPrP<sup>C</sup>s von der von Zahn *et al.* veröffentlichen 3D-Struktur des in *E.coli* exprimierten, unglycosylierten rhPrP<sup>C</sup>s unterscheidet. Zuegg *et al.* konnten in vergleichenden MD-Simulationen von Homologiemodellen des glycosylierten und unglycosylierten hPrP<sup>C</sup>s zeigen, dass die Flexibilität der Aminosäurereste in der Umgebung um die Glycosylierungstelle an N197 durch das Saccharid eingeschränkt zu sein scheint<sup>63</sup>, was die strukturelle Bedeutung der Glycosylierungsstelle unterstreicht (vgl. Abschnitt 1.1.3).

In Abschnitt 4.5.1 konnte gezeigt werden, dass die Glycosylierungsstelle eine Bindungsspezifität des Peptidfragmentes T192-T201 gegenüber rhPrP(23-231) hervorruft. Die Spezifität kann dadurch zustande kommen, dass das Saccharid Teil des Bindungsepitopes ist, oder die aktive Konformation des Peptids durch die Kohlenhydrat-Einheit stabilisiert wird. Die Konformationsanalyse des Glycopeptids und des entsprechenden Referenzpeptids zeigt einen starken Einfluss des Saccharids auf die Struktur des Peptidfragments T192-T201. Das Glycopeptid weist im Vergleich zum Referenzpeptid eine deutlich gestrecktere Konformation auf. Es ist vorstellbar, dass sich die Aminosäureseitenketten dadurch besser in die Bindungstasche des Proteins einpassen.

Die Substanzmenge des Glycopeptids war weder für sich anschließende STD NMR-Experimente noch für Aggregationsuntersuchungen ausreichend.

### 4.5.3 Untersuchung zur Aggregation des Prionproteins

Die folgenden Untersuchungen sollen klären, inwieweit die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Liganden in der Lage sind, Einfluss auf die Aggregation des Prionproteins zu nehmen. Die Größe der gebildeten Aggregate wurde dabei mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Eine quantitative Analyse des Aggregationsvorgangs erfolgte durch Konzentrationsbestimmung des Proteins, das sich nach Zentrifugation der großen Aggregate noch in der überstehenden Lösung befand. Für die Experimente wurden die Peptide mit den besten Bindungseigenschaften (8 und 9), das daraus zusammengesetzte 12er Peptid 29 sowie das unglycosylierte Referenzpeptid 31 ausgewählt. Die Verbindung 3, die in den SPR-Untersuchungen negative Sensorgramme lieferte, sollte ebenfalls untersucht werden. Die Messungen wurden in 5 mM Acetat-Puffer bei pH 5 durchgeführt.

Um eine Selbstaggregation der Peptide auszuschließen, wurden zunächst die Teilchengrößen der in den betreffenden 5 mM Stammlösungen befindlichen Partikel bestimmt. Die gemessene Intensität des gestreuten Lichtes erwies sich jedoch als so gering, dass für die Peptide **8**, **9** und **31** keine sinnvollen hydrodynamischen Radien berechnet werden konnten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Peptide keine Neigung zur Selbstaggregation aufweisen. Die Peptide **3** und **29** zeigten eine messbare, jedoch ebenfalls geringe, zeitabhängige Fluktuation der Streuintensität. Aufgrund der schlechten Messdaten konnte ebenfalls keine Teilchengröße bestimmt werden.

Um zu testen, ob die Verbindungen eine Aggregation des Prionproteins hervorrufen bzw. diese beschleunigen, wurde zu einer 300  $\mu$ M Lösung des Proteinfragments rhPrP(90-231) äquimolar Peptid hinzugegeben und über einen Zeitraum von 19 h bei 37 °C inkubiert. Die Testreihe wurde für jedes der fünf Peptide durchgeführt. Als Referenz diente eine entsprechende Proteinblindprobe, die auf analoge Weise behandelt wurde. Die Blindprobe zeigte Partikel mit einem Radius von 107 ± 9 nm. Die Messung für das Peptid **8** ergab ein vergleichbares Ergebnis (112 ± 20 nm), was darauf hindeutet, dass dieses Peptid die Aggregation des zellulären Prionproteins nicht beeinflusst. Die Lösungen der vier anderen Peptide zeigten im Vergleich zur Proteinblindprobe zusätzlich weitere Partikel größerer räumlicher Ausdehnung (200 -600 nm).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration zur quantitativen Analyse des Aggregationsprozesses erfolgte jeweils vor und nach der Inkubationszeit. Dazu wurden die Lösungen zentrifugiert und dann die Proteinkonzentration in der überstehenden Lösung mittels UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden relativ zueinander in Beziehung gesetzt. Es wurden Schwankungen der Konzentration zwischen 2% und 7% festgestellt. Diese Abweichungen liegen im Rahmen der Messgenauigkeit, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keines der untersuchten Peptide die Aggregation des Proteins fördert.

Die Aggregation des zellulären Prionproteins kann durch metallkatalysierte Oxidation induziert werden (vgl. Abschnitt 1.1.2).<sup>52</sup> Um zu untersuchen, inwiefern die Peptide in der Lage sind, die induzierte Aggregation zu inhibieren, wurde das Protein zunächst über einen Zeitraum von 30 min mit dem betreffenden Peptid in äquimolarer Menge preinkubiert, und anschließend durch Zugabe von Cu<sup>0</sup> die Aggregation eingeleitet. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde zum Abbruch der Aggregation das Kupfer aus der Lösung entfernt. In allen Proben war deutlich ein weißer Niederschlag zu erkennen, was auf die Bildung von Aggregaten hinweist. Die Proben wurden zentrifugiert und die in den überstehenden Lösungen befindlichen Aggregate mittels DLS untersucht. Da die Kupferionen die Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm stört, wurde die Proteinmenge mit Hilfe des Bradford-Assays photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11:** Messergebnisse des Aggregations-Inhibitions-Assays. Für die DLS-Experimente sind die Streuintensitäten als Zählraten sowie die sich ergebenden hydrodynamischen Radien aufgeführt. Die Proteinkonzentration in der überstehenden Lösung nach Zentrifugation der Aggregate ist jeweils prozentual bezogen auf die der Proteinblindprobe angegeben (Kontrolle); n.b. nicht bestimmbar.

|                          | Kontrolle | Peptid 3 | Peptid 8 | Peptid 9 | Peptid 29 | Peptid 31 |
|--------------------------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| Zählrate                 | 18        | 4        | 10       | 30       | 50        | 9         |
| hydrodynamische          | 7 ± 2     | n.b.     | 4 ± 0.5  | 8 ± 1    | 43 ± 3    | 5 ± 0.5   |
| Radien [nm]              | 37 ± 3    |          | 20 ± 2   | 53 ± 5   |           | 28 ± 6    |
| Proteinkonzentration [%] | 100       | 83       | 101      | 126      | 126       | 97        |

Für die Verbindungen 9 und 29 wurden im Vergleich zur Proteinblindprobe höhere Intensitäten des gestreuten Lichts und größere hydrodynamische Radien der in der Lösung befindlichen Partikel beobachtet. Die DLS-Daten sprechen daher dafür, dass diese Peptide einen Einfluss auf die Aggregation des Prionproteins haben. Die Peptide 8 und 31 scheinen keinen Effekt zu zeigen, während die Ergebnisse der Verbindung 3 auf eine erhöhte Aggregationstendenz hindeuten. Die gemessene Proteinkonzentration steht im Einklang mit diesen Beobachtungen. Durch Zugabe äquimolarer Mengen von 9 bzw. 29 kann demnach die Aggregation zu 25% verhindert werden.

Da die Ergebnisse des Bradford-Assays allerdings große Schwankungen aufwiesen, wurden die Messungen für die potentiellen Inhibitoren (9 und 29) wiederholt werden. Für die zweite Messreihe wurden die Peptide abweichend zur ersten im siebenfachen Überschuss eingesetzt, um das Prionprotein mit den Verbindungen abzusättigen. Das Resultat der Messungen ist in Tabelle 12 zusammengefasst. Um auszuschließen, dass der hohe Peptidüberschuss die Daten des Bradford-Assays stört, wurden zusätzlich die entsprechenden Peptidblindproben vermessen (Tabelle 12B und C). Eine Probe bestehend aus rhPrP<sup>C</sup> in Gegenwart von 7 eq des Peptids 9, bei der im Gegensatz zu den anderen Proben die Aggregation nicht durch Zugabe von Kupfer eingeleitet wurde, gibt den maximal möglichen Messwert für die Proteinkonzentration im Überstand an (Tabelle 12D). Die Konzentrationen der anderen Proben wurden auf diesen Wert bezogen.

**Tabelle 12:** Resultate des Aggregations-Inhibitions-Assays, bei dem die Peptide in siebenfachem Überschuss eingesetzt wurden. <sup>1</sup>Die Proteinkonzentration in der nach Zentrifugation der Aggregate überstehenden Lösung ist dabei jeweils prozentual bezogen auf den Wert von 12D angegeben. <sup>2</sup>Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. <sup>3</sup>Die gemessene Absorption lag unter der des Bradford-Reagenz und ist somit gleich 0.

|                         | Probe  | Zählrate | hydrodynamischer Radius<br>[nm] | Proteinkonzentration <sup>1</sup><br>[%] |
|-------------------------|--|----------|---------------------------------|--|
| <b>A</b> ) <sup>2</sup> | rhPrP in Gegenwart von Cu <sup>0</sup>                             | 2-3      | ca. 100                         | 6 ± 1.4                                  |
| B)                      | Blindprobe von Peptid 9  | -        | -                               | 0 <sup>3</sup>                           |
| C)                      | Blindprobe von Peptid 29   | -        | -                               | 0 <sup>3</sup>                           |
| D) <sup>2</sup>         | rhPrP + 7 eq Peptid <b>9</b> in<br>Abwesenheit von Cu <sup>0</sup> | -        | -                               | 100 ± 5                                  |
| E) <sup>2</sup>         | rhPrP + 7 eq Peptid <b>9</b> in<br>Gegenwart von Cu <sup>0</sup>   | 5-6      | 3 ± 0.7                         | 84 ± 6                                   |
| F)                      | rhPrP + 7 eq Peptid <b>29</b> in<br>Gegenwart von Cu <sup>0</sup>  | 4        | ca. 100                         | 3 ± 3                                    |

Das Peptid **9** N153-Q160 mit der Sequenz NMHRYPNQ scheint einen deutlichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des Proteins auszuüben (Tabelle 12E). Durch die Zugabe dieser Verbindung im siebenfachen Überschuss kann die Aggregation zu ca. 80% verhindert werden. Der ermittelte hydrodynamische Radius der im Überstand befindlichen Partikel entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit dem des Monomers. Das Peptid **9** inhibiert demnach unter den gegebenen Bedingungen nahezu vollständig die Aggregation des zellulären, humanen Prionproteins und stellt somit einen potentiellen anti-CJK Wirkstoff dar. Das Ergebnis für das 12er-Peptid **29** deutet hingegen darauf hin, dass diese Verbindung im Gegensatz zu den Resultaten der vorhergehenden Messreihe hier keinen Effekt zeigt (Tabelle 12F).

In Abbildung 50 sind die Proben des Aggregations-Inhibitions-Assays in An- und Abwesenheit des Peptids **9** gezeigt.



**Abbildung 50:** Aggregations-Inhibitions-Assay. Links: Durch Zugabe des Peptids **9** im siebenfachen Überschuss kann die Aggregation fast vollständig inhibiert werden. Rechts: Proteinblindprobe.

In einem weiteren Experiment, in dem die Verbindung 9 zu PrP-Aggregaten gegeben wurde, welche zuvor durch metallkatalysierte Oxidation induziert worden waren, war zu beobachten, dass sich die Aggregate nicht in Gegenwart von Peptid 9 auflösten.

# 4.6 Fluor-NMR-Experimente

## 4.6.1 Das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment

Auf der Grundlage des von Mayer und Meyer beschriebenen Pulsprogramms für das homonukleare <sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment, das zum *screening* von Substanzbibliotheken auf bindungsaktive Substanzen eingesetzt wird,<sup>96</sup> soll im Rahmen dieser Arbeit das entsprechende <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment entwickelt werden. Der theoretische Hintergrund der <sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H}-STD NMR Spektroskopie wurde in Kapitel 2.1.1 erläutert. Alle Pulsprogramme, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden, sowie diejenigen, aus denen die neuen Pulprogramme hervorgegangen sind, werden im Anhang wiedergegeben.

In dem heteronuklearen <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment soll die Sättigung des Proteins wie gewöhnlich über die Proteinprotonen durch Einstrahlung der Sättigungspulse außerhalb der spektralen Weite der Ligandresonanzen erfolgen. Im Falle einer Interaktion mit einem fluorierten Liganden soll die Sättigung auf die Fluorkerne des Liganden übertragen und nach der Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes in Lösung detektiert werden. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen *screening*-Verfahren, die auf der Detektion von Protonen basieren, ist, dass weder Protein noch protonierte Lösungsmittel (wie Wasser) störende Hintergrundsignale liefern, die die Interpretation der Spektren erschweren. Weiterhin führt die große spektrale Wreite der Fluorresonanzen zu wenig Signalüberlagerungen. In Kapitel 2.1.2 wurde gezeigt, dass das heteronukleare <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment theoretisch möglich ist.

### Entwicklung der Pulsprogramme

Fluor und Protonen besitzen sehr ähnliche Frequenzen. Beträgt die Magnetfeldstärke 11.67 Tesla, so ergibt sich eine Larmorfrequenz von 500 MHz für Protonen und 470 MHz für den Fluorkern. Bedingt durch die *hardware* des verwendeten 500 MHz-Spektrometers muss für beide Kerne über den 1H-50-Watt-Verstärker gesendet werden. Probleme tauchen also auf, wenn das Pulsprogramm die Einstrahlung auf beide Resonanzen erfordert, wie es in dem <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment der Fall ist. Hierzu kann ein sog. "Switch-Befehl" ("SWITO\_H" bzw. "SWITO\_F") verwendet werden, der im Verlauf des Pulsprogrammes zwischen den beiden Kernen hin- und herschaltet. Dieser "SWITO-Befehl" ist in dem Standard-Pulsprogramm des <sup>19</sup>F-zgig Experiments (*zgfhigqn*) enthalten. Von einer 5 mM

1-Deoxy-1-fluoro- $\alpha$ -*D*-galactose Probe wurde ein <sup>19</sup>F-zg (*zgflqn*) und ein entsprechendes <sup>19</sup>F-zgig-Spektrum aufgenommen. In letzterem wurde der *power level* für die Entkopplungsleistung auf 120 dB gesetzt; dies kommt einem Ausschalten der Entkopplung gleich. Der Vergleich der Spektren zeigte, dass im Fall des <sup>19</sup>F-zgig-Spektrums ein Intensitätsverlust von bis zu 50% zu beobachten war. Der Einbau eines <sup>19</sup>F-pass/<sup>1</sup>H-stop bzw. eines entsprechenden <sup>1</sup>H-pass/<sup>19</sup>F-stop-Filters sollte daraufhin die gegenseitige Beeinflussung der Schwingkreise (<sup>1</sup>H und <sup>19</sup>F) verringern und ein Übersprechen verhindern. Der zuvor beobachtete Intensitätsverlust konnte auf diese Weise eliminiert werden.

In der Abbildung 51 ist schematisch das Pulsprogramm für das  ${}^{19}F{}^{1}H$ -STD-Experiment dargestellt. Im Kanal F2 erfolgt die Sättigung durch eine Kaskade von Gausspulsen auf Protonen, im Kanal F1 werden dann nach dem 90°-Auslesepuls die Fluorkerne beobachtet.



Abbildung 51: Schematische Abbildung der Pulssequenz für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment.

Das zunächst geschriebene Programm *stdsp\_SWITO\_2.bc* unterscheidet sich von der herkömmlichen Pulssequenz für das homonukleare STD-Experiment *std19sp* nur durch das Wechseln zwischen Protonen und Fluor von Kanal 2 zu Kanal 1 während des Experiments. Als Testsystem diente zunächst einer Probe bestehend aus 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose (2 mM) und dem Lektin *ricinus communis agglutinin* RCA<sub>120</sub> (13 µM).

Bei der Aufnahme von Spektren mit dieser Probe zeigte sich, dass die Empfindlichkeit des Experiments aufgrund der hohen Multiplizität des <sup>19</sup>F-Signals sehr gering ist. Weiterhin liegt das Saccharid im Gleichgewicht zwischen dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Anomer in einem Verhältnis von 1:1.9 ( $\alpha$ : $\beta$ ) vor, was zusätzlich zu einem Intensitätsverlust bei gegebener Konzentration führt. Daher sollte die Empfindlichkeit des Experimentes durch eine Protonen-Breitbandentkopplung während der Akquisition erhöht werden.

Die Implementierung der *inverse gated* Entkopplung in das Pulsprogramm erwies sich anfangs als nicht trivial, da zunächst versucht wurde, sie im gleichen Kanal wie die Sättigung einzustrahlen. Die Einstrahlfrequenz für die Sättigung wird jedoch über eine Frequenzliste angegeben, die ihrerseits Priorität gegenüber dem *offset* (O1) besitzt, durch den zunächst versucht wurde, die Frequenz für die Entkopplung anzugeben. Auf der Suche nach dem Fehler wurde das vorläufige Pulsprogramm dahingehend verändert, dass *on-* und *off-resonance* Spektren in zwei Experimenten getrennt voneinander aufgenommen werden konnten (*stdspfhig\_off\_3.bc*; *stdspfhig\_on\_3.bc*). Der Vergleich der Signalintensitäten von *on-* und *off-resonance* Spektren zeigte, dass im *on-resonance* Fall entgegen der Erwartungen eine höhere Intensität beobachtet wurde. Es war daher notwendig, eine Methode zu finden, mit der sich die STD-Spektren hinsichtlich ihrer absoluten Phase analysieren lassen.

Dazu wurde das Pulsprogramm *stdsp\_SWITO\_2.bc* zu einem Pseudo-2D-Experiment umgeschrieben, in dem die FIDs von *on-resonance* und *off-resonance* während der Akquisition in unterschiedliche Puffer akkumuliert und in einen seriellen *File* geschrieben werden. Das neue Pulsprogramm *stdspfluor2d.bc* bietet den Vorteil, dass durch Splitten des seriellen *Files* nach der Aufnahme mit dem AU-Programm "*splitser*" sich *on-* und *off-resonance* Spektren getrennt betrachten lassen. Über den Phasenzyklus erhalten die FIDs von *on-* und *off-resonance* entgegengesetzte Vorzeichen, so dass ihre Summenbildung zum STD-Spektrum führt. Mit dem *off-resonance* Spektrum erhält man darüber hinaus eine ideale Referenz, da es mit exakt den gleichen Parametern aufgenommen wurde wie das aus dem Experiment resultierende STD-Spektrum. Die Aufnahme eines Referenzspektrums zur Bestimmung der STD% wird also unnötig, so dass die Pseudo-2D-Variante eine Einsparung von Messzeit bedeutet. Durch das Pseudo-2D-Experiment ist es weiterhin möglich, das *off-resonance* Spektrum zu phasen. Die Phasenwerte lassen sich auf das STD-Spektrum übertragen, so dass man als zusätzliche Information die absolute Phase des STD-Spektrums und damit eine Aussage über das Vorzeichen der Signale erhält.

Ausgehend von der so erhaltenden Pseudo-2D-Pulssequenz für das nicht entkopplelte <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment (*stdspfluor2d.bc*) wurde eine Protonen-Breitbandentkopplung erzielt, in dem letztere über einen dritten Kanal eingestrahlt wurde (*stdspfhig\_5\_2d.bc*). Auf diese Weise lassen sich die herkömmlichen Frequenzlisten für die Sättigung unverändert verwenden. Die Pulssequenz für das verbesserte <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment ist schematisch in Abbildung 52 gezeigt.



**Abbildung 52:** Verbesserte Pseudo-2D-Pulssequenz für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment. Eine *inverse gated* Entkopplung erhöht die Empfindlichkeit. Mit dem Frequenzwechsel wird auch der *memory buffer* gewechselt.

Das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Pulsprogramm mit *inverse gated* Protonen-Entkopplung wurde mit der RCA<sub>120</sub> / 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose-Probe gestestet. Die <sup>19</sup>F-STD-Spektren lieferten zwei gut sichtbare, negative Signale für das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Anomer des Saccharids. Der Verdacht, dass die Signalintensitäten des *on-resonance* Spektrums größer als die im Falle einer *off-resonance* Einstrahlung sind, bestätigten sich damit. Um sicherzustellen, dass es sich bei den ungewöhnlichen, negativen Signalen nicht um Artefakte handelt, die von der Breitbandentkopplung hervorgerufen werden, wurde das entsprechende gering sensitive Experiment ohne Entkopplung *stdspfluor2d.bc* mit einer großen Anzahl von Scans (96k) aufgenommen. Abbildung 53 zeigt die <sup>19</sup>F-STD-Spektren mit den jeweiligen Referenzspektren. In der Darstellung sind die Multiplettstrukturen der Fluorsignale für beide Anomere im nicht entkoppleten Spektrum klar zu erkennen (Abbildung 53A und B). Tieffeldig verschoben bei - 230.57 ppm liegt das Signal des  $\beta$ -Anomers, das des  $\alpha$ -Anomers ist bei -230.72 ppm zu finden. Aus der Abbildung geht ebenfalls die deutlich höhere Empfindlichkeit des Experiments mit *inverse gated* Entkopplung hervor, welches mit einer knapp 200-fach geringeren Scanzahl aufgenommen wurde (Abbildung 53C und D).



**Abbildung 53:** A) 470 MHz-<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum von 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose (2 mM) und RCA<sub>120</sub> (13  $\mu$ M). Das Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm *stdspfluor2d.bc* bei einer Temperatur von 280 K mit 96k Scans aufgenommen. In B) ist das entsprechende Referenzspektrum gezeigt. C) <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum der gleichen Probe mit *inverse gated* Entkopplung (ns = 520; Pulsprogramm: *stdspflig\_5\_2d.bc*). In D) ist das entsprechende Referenzspektrum gezeigt.

Auch im nicht entkoppelten <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment sind negative Signale zu beobachten. Dies zeigt, dass die Breitbandentkopplung nicht im Zusammenhang mit der Signalverstärkung im *on-resonance* Spektrum steht.

Der Vergleich der Signalverstärkungen, die aus den Experimenten mit und ohne Entkopplung resultieren, ist in der Tabelle 13 zusammengestellt. Bei einem *prescan delay* von 1 ms wird im nicht entkoppelten Spektrum für das  $\alpha$ -Anomer eine Signalverstärkung von 1.8%, für das  $\beta$ -Anomer eine von 1.1% beobachtet. Die Verstärkungen im entkoppelten Fall sind mit 1.6% für das  $\alpha$ - und 1.2% für das  $\beta$ -Anomer sehr ähnlich. Damit ist gezeigt, dass auch die Größe der Signalverstärkungen nicht durch die Breitbandentkopplung während der Akquisition zusammenhängt.

**Tabelle 13:** Gemessene Verstärkung mit und ohne *inverse gated* Protonen-Entkopplung beiverschiedenen prescan delays d7.

|                           | d7 [s] | Verstärkung α-Anomer [%] | Verstärkung β-Anomer [%] |
|---------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|
| ohne Entkopplung          | 0.001  | 1.8                      | 1.1                      |
| inverse gated Entkopplung | 0.001  | 1.6                      | 1.2                      |
| inverse gated Entkopplung | 5      | 2.9                      | 2.4                      |
| inverse gated Entkopplung | 10     | 2.9                      | 2.2                      |

Für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment mit *inverse gated* Entkopplung wurde der *prescan delay* (d7) variiert. Die Verlängerung des *delays* auf 5 s bzw. 10 s führten zu deutlich größeren Signalverstärkungen. So wurde für das  $\alpha$ -Anomer ein Intensitätsgewinn um ca. 70% für das  $\beta$ -Anomer eine Signalverstärkung um etwa 100% erzielt. Der Zusammenhang zwischen der Länge des *prescan delays* und der Signalverstärkung ist noch nicht vollständig geklärt.

Um auszuschließen, dass die unerwarteten, negativen Signale nicht doch Artefakte sind, die durch die neu entwickelten Pulsprogramme hervorgerufen wurden, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden.

Das erste Experiment sollte sicherstellen, dass in dem Fall, dass keine Sättigungspulse eingestrahlt werden, auch keine Signale im STD-Spektrum zu beobachten sind. Dazu wurde einerseits die Leistung der Sättigungspulse (sp1) auf 120 dB gesetzt, was einem Ausschalten der Sättigung gleichkommt. In einem anderen Versuch wurde der sp1 im Pulsprogramm auskommentiert, in einem weiteren die Sättigungsloop aus dem Pulsprogramm entfernt. In allen aufgenommenen Spektren waren keine Signale zu beobachten. Dies beweist, dass die in Abbildung 53C gezeigten Signale auf dem Vorhandensein des Sättigungspulses basieren.

In einem weiteren Experiment sollte gezeigt werden, dass in Abwesenheit des Proteins keine Signale im <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum vorzufinden sind. Dazu wurde eine Ligandblindprobe bestehend aus 2 mM 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose mit dem gleichen Datensatz gemessen. Tatsächlich wies das Spektrum keine Signale auf. Somit erfodern die Signale des STD-Spektrums der Protein-Ligand-Probe die Gegenwart des Proteins. Um zu testen, ob das negative Vorzeichen der Signale fehlerhaft aus der Prozessierung der Pseudo-2D-Methode hervorgehen, wurde das entsprechende homonukleare Pseudo-2D-<sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H}-STD-Pulsprogramm geschrieben (*stdw5sp2d.bc*) und damit ein Spektrum der RCA<sub>120</sub> / 6-Deoxy-6-fluoro-*D*galactose-Probe aufgenommen. Die analoge Prozessierung führte jedoch zu positiven Signalen, so dass das negative Vorzeichen ein Phänomen des <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiments blieb.

## Überlegungen zum Vorzeichen der Signale

Es stellte sich die Frage, wie sich die negativen Signale des Experiments erklären lassen. Eine Möglichkeit ist, dass die Sättigung des Proteins zunächst auf die Protonen des Liganden übertragen werden und dann nach der Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes ein NOE von den Ligandprotonen zum Fluor erfolgt. Dieser intramolekulare NOE würde zu einer Signalverstärkung im *on-resonance* Spektrum und damit zu negativen Signalen im Differenzspektrum führen. Diese Situation ist in einem System denkbar, in dem der Abstand der Proteinprotonen zum Fluoratom des Liganden verhältnismäßig groß ist (> 4 Å). Ist der

intermolekulare Protonenabstand deutlich kleiner, so ist wahrscheinlich, dass der Sättigungstransfer zwischen den Proteinprotonen und dem Fluoratom des Liganden nicht direkt, sondern indirekt über die Ligandprotonen erfolgt. Der geminale Abstand des Protons an H6 der Galactose zum Fluor beträgt nur 1.8 Å. Die Situation ist in Abbildung 54A schematisch dargestellt.

Somit ergibt sich die Fragestellung nach dem Bindungsmodus, den das Saccharid zum Protein einnimmt. Die Arbeiten von Lomas und Brewer, die die Hydroxyl-Gruppen der Galactose durch Fluor austauschten, zeigen, dass die OH-Gruppen an C3 und C4 der Galactose als Donoren in einer Wasserstoffbrückenbindung zum Protein fungieren. Die Hydroxyl-Gruppe an C6 kann als Akzeptor und Donor wirken. Demnach ist die Hydroxyl-Gruppe an C6 an dem Bindungsepitop beteiligt. Jedoch zeigt die 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose im Vergleich zu β-GalOMe eine vierfach schlechtere Bindung.<sup>134;135</sup> Mayer untersuchte die Bindungsepitope von β-GalOMe und α-GalOMe der Bindung an RCA<sub>120</sub> mittels STD NMR.<sup>98</sup> Um diese Daten mit den Bindungsepitopen des α- und β-Anomers der 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose zu vergleichen, wurde ein <sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum der RCA<sub>120</sub> / 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose-Testprobe aufgenommen. Die relativen STD% der Fluorderivate und der Galactoside sind in Abbildung 54B in einem Balkendiagramm dargestellt. Die STD% der Protonen, die jeweils die größte Sättigung erfuhren, wurden dabei auf 100% gesetzt und die Daten der anderen Protonen jeweils darauf bezogen.



**Abbildung 54:** A) Mögliche Situation der interatomaren Abstände. B) Relative <sup>1</sup>H-STD% der Galactose-Derivate zeigen leicht unterschiedliche Bindungsmodi hinsichtlich ihrer Bindung an RCA<sub>120</sub>.

Dem Balkendiagramm ist zu entnehmen, dass sich der Bindungsmodus der Fluorderivate nicht deutlich von dem der Methylgalactoside unterscheidet. Auffällig ist, dass dem H1-Proton der

Fluorgalactose-Derivate verglichen mit dem H1-Proton der Galactoside ein wenig mehr Bedeutung bei der Bindung zukommt, während die räumliche Nähe der Protonen H3, H4, H5 und H6 zum Protein ein wenig geringer im Vergleich erscheint. Diesen Daten zufolge scheinen sich die H6-Protonen der Fluorderivate verglichen mit dem Bindungsmodus der Galactoside ein wenig aus der Bindungstasche herauszudrehen, dennoch weisen sie einen deutlichen, absoluten STD-Effekt von ca. 13% auf. Aufgrund von Signalüberlagerungen der H6-Protonen der beiden Anomere lässt sich hier nur ein Durchschnittswert angeben. Ein direkter Sättigungstransfer zwischen den Proteinprotonen und dem Fluoratom des Liganden müsste also doch möglich sein.

Generell beobachtet man als Effekt der Sättigung des Proteins auf den Liganden die Summe aus dem Sättigungstransfer, dem transferred NOE im Protein-Ligand-Komplex und dem intramolekularen NOE im Ligand selbst. Einzig der letztere Effekt führt zu einer Signalverstärkung. Sowohl der Sättigungstransfer als auch der transferred NOE resultiert in einer Abschwächung der Signalintensität verglichen mit einem Referenzspektrum. Das Vorzeichen des Signals wird demnach dadurch entschieden, welcher Effekt überwiegt. Werden die negativen Signale im <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum tatsächlich durch einen positiven intramolekularen NOE nach der Dissoziation des Protein-Ligandkomplexes hervorgerufen, so könnte sich dies durch eine Verkürzung der Sättigungszeit zeigen lassen. Der intramolekulare NOE kann sich erst dann aufbauen, wenn nach der Sättigung des Liganden über das Protein der Rezeptor-Ligand-Komplex zerfallen ist. Das bedeutet, dass bei kurzen Sättigungszeiten der Effekt des Sättigungstransfers überwiegen müsste, da sich der intramolekulare NOE noch nicht aufgebaut haben kann. Idealerweise wäre dann bei kurzen Sättigungszeiten ein positives Signal im <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum zu beobachten, dass dann mit größer werdender Sättigungszeit kleiner und schließlich negativ wird. Entsprechende Experimente mit der RCA120 / Galactose-Test-Probe, in denen die Sättigungszeit zwischen 200 ms und 2000 ms variiert wurde, ergaben allerdings bei kleinen Sättigungszeiten (bis zu 1200 ms) gar kein Signal. Erst ab einer Sättigungszeit von 1400 ms wurden negative Signale sichtbar, die mit steigender Sättigungszeit einen größeren Betrag annahmen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie groß der NOE-Effekt ist, der von den Ligandprotonen intramolekular auf das Fluor übertragen wird. Die Protonen an H6 der Fluorgalactose erfahren eine Sättigung von gemittelt 13% (s.o.). Um den NOE-Effekt, der tatsächlich von den Protonen auf das Fluor übertragen wird, experimentell zu bestimmen, wurde ein entsprechendes Pulsprogramm für ein <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Experiment geschrieben. Ausgehend von dem <sup>19</sup>F-zg Pulsprogramm (*zgflqn*) wird eine Protonen-Breitbandentkopplung

vor dem 90°-Auslesepuls eingeführt (*gated decoupling*). In dem resultierenden Pulsprogramm *zgflqn\_noe\_cpd.bc* erfolgt die Entkopplung über ein *composite pulse decoupling*-Schema (cpd). Pulssequenzen, die hierfür allgemein verwendet werden, sind das *garp*- und das *waltz16*-Entkopplungsschema, wobei die *garp*-Sequenz zu einer im Vergleich etwas breiteren Anregung führt.<sup>136</sup> Das Pulsprogramm für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Experiment ist in der Abbildung 55 schematisch dargestellt.



**Abbildung 55:** Schematische Abbildung der Pulssequenz für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Experiment.

In der Abbildung 56 sind die Spektren des  ${}^{19}F{}^{1}H$ -HOE-Experiments bei verschiedenen Entkopplungsleistungen gezeigt. Das Spektrum, das mit einer Entkopplungsleistung von 120 dB aufgenommen wurde, stellt dabei die Referenz dar, da 120 dB einem Ausschalten der Entkopplungsleistung entspricht, und das Spektrum dem eines nicht entkoppelten gleicht.



**Abbildung 56:** Spektren von 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose in Abhängigkeit von der Entkopplungsleistung in einem 1D-<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Experiment (Pulsprogramm: *zgflqn\_noe\_cpd.bc*). Für die Entkopplung wurde die *waltz16*-Pulssequenz verwendet.

Bei der Betrachtung der Spektren fällt zunächst auf, dass bei den hohen Entkopplungsleistungen 17 und 25 dB im Vergleich zur Referenz eine Abschwächung der Signale zu beobachten ist. Dies ist ungewöhnlich, da die *gated*-Entkopplung aufgrund des NOEs eher zu einer Linienverstärkung führen sollte. Bei Entkopplungsleistungen von 28-40 dB wird tatsächlich ein *enhancement* beobachtet. Kleinere Leistungen (ab 80 dB) zeigen keinen Effekt mehr.

Betrachtet man eine einzelne Linie und vergleicht die Linienintensitäten dieser Linie in den verschiedenen Spektren, beobachtet man, dass die Intensitäten stark differieren. Um die Intensität einer Linie in Abhängigkeit von der Entkopplungsleistung besser darstellen zu können, wurden die FIDs der Experimente mit dem AU-Programm "*fidtoser*" in einen seriellen *file* geschrieben. Mit einer weiteren Serie von <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Experimenten, in der anstelle des *waltz16*-Entkopplungsschemas die *garp*-Pulssequenz verwendet wurde, wurde analog verfahren. Mit der Routine zur Bestimmung der T<sub>1</sub>-Relaxationszeiten, die in dem Programm XWINNMR der Firma Bruker implementiert ist, lassen sich dann die Spektren automatisch auswerten, und man erhält eine Tabelle, die die Linienintensitäten bei den einzelnen Leistungen auflistet. In Abbildung 57 ist das Ergebnis dieser Auswertung für die *garp*- und die *waltz16-cpd*-Sequenz gezeigt.

Aus der Abbildung wird zum einen deutlich, dass die Intensitäten der einzelnen Linien sehr stark mit der Entkopplungsleistung schwanken und nicht dem erwarteten, mit der Leistung abfallenden Kurvenverlauf folgt. Weiterhin zeigen alle Linien eine unterschiedliche Abhängigkeit von der Leistung. Vergleicht man die Linienintensitäten, die sich durch die verschiedenen Entkopplungsschemata ergeben, untereinander, so fällt auf, dass sich auch hier Unterschiede ergeben.

All diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Entkopplung nicht fehlerfrei verläuft. Gründe hierfür sind gegebenenfalls in der *hardware* des Spektrometers zu suchen. Um letzteres auszuschließen, sollte die Messung des <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-Spektrums der 6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose / RCA<sub>120</sub>-Testprobe an einem anderen Spektrometer wiederholt werden. Hierfür stand ein 250 MHz Spektrometer entsprechend einer Larmorfrequenz von 235 MHz für Fluor in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Peters in der Medizinischen Universität zu Lübeck zur Verfügung. Mit diesem Experiment sollte weiterhin geprüft werden, ob die geringere Frequenzdifferenz zwischen den Larmorfrequenzen von Fluor und Protonen zu einem effektiveren, heteronuklearen Sättigungstransfer führt. (Beim 500 MHz Spektrometer beträgt die Frequenzdifferenz 30 MHz, bei einem 250 MHz-Spektrometer hingegen nur 15 MHz.)



**Abbildung 57:** Linienintensität in Abhängigkeit von der Entkopplungsleistung in einem 1D-<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Experiment. Blau: *garp*-Sequenz; margenta: *waltz16*-Entkopplungsschema.

Die *hardware* des 250 MHz-Spektrometers gibt ebenfalls vor, dass für Fluor und Protonen gleichermaßen über den 1H-50-Watt-Verstärker gesendet werden muss und dementsprechend das gleiche Pulsprogramm (*stdspfhig\_5\_2d.bc*), das den "SWITO-Befehl" zum Umschalten in der Switchbox enthält, verwendet werden kann. Das aufgenommene Spektrum zeigt allerdings ebenfalls negative Signale mit einer Signalverstärkung von 3.1% für das  $\alpha$ - und 2.1% für das  $\beta$ -Anomer bei einem *prescan delay* von einer Sekunde. Die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Spektrometern erzielt wurden, sind also vergleichbar (vgl. Tabelle 13). Das bedeutet, dass die Spektrometer entweder den gleichen *hardware*-Fehler aufweisen, oder das Problem der Messung hier nicht zu suchen ist.

### 4.6.2 Weitere Testsysteme

Eine mögliche Erklärung für das negative Vorzeichen der Signale im <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum könnte sein, dass kein direkter Sättigungstransfer zwischen den Proteinprotonen und dem Fluoratom des Liganden aufgrund von zu großen intermolekularen Abständen möglich ist. Ein intermolekularer NOE zwischen den Protonen und dem Fluor des Liganden würde nach der Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes zu einer Signalverstärkung im *on-resonance*-Spektrum führen. Daher sollte untersucht werden, ob in einem Testsystem, in dem der Fluor-Protein-Abstand geringer ist, ein direkter, heteronuklearer Sättigungstransfer stattfindet, so dass im <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum ein positives Signal resultiert.

Aus der Abbildung 54B, in der das *epitope mapping* der Galactose-Derivate dargestellt ist, ist ersichtlich, dass das H3-Proton der Galactose tiefer in die Bindungstasche von RCA<sub>120</sub> zeigt als das Proton an C6. Daher sollte als weiteres Testsystem 3-Deoxy-3-fluoro-*D*-galactose mit RCA<sub>120</sub> als Rezeptor untersucht werden. Die Arbeiten von Lomas und Brewer ergaben allerdings, dass die OH-Gruppe an C3 als Donor in einer Wasserstoffbrückenbindung zum Protein fungiert. Die Substitution dieser Hydroxygruppe durch Fluor führt demzufolge zu einer deutlich schlechteren Dissoziationskonstante des Fluorderivats.<sup>134;135</sup> Im Vergleich zu β-GalOMe ist die Bindung > 65-fach schlechter. <sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H}-Spektren dieses Systems lieferten STD-Effekte im Bereich zwischen 2% und 6%. Das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum, das in Abbildung 58 gezeigt ist, weist zwei negative Signale für das α- und das β-Anomer auf. Demnach wird auch für dieses Testsystem eine Signalverstärkung bei *on-resonance*-Einstrahlung beobachtet (α-Anomer 0.3% und β-Anomer 0.5%).



**Abbildung 58:** A) 470 MHz-<sup>19</sup>F{1H}-STD-Spektrum von 13 µM RCA<sub>120</sub> und 2 mM 3-Deoxy-3-fluoro-*D*-galactose. Das Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm *stdspfhig\_5\_2d.bc* mit 10k Scans aufgenommen. B) Entsprechendes Referenzspektrum.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob in einem System, in dem eine deutlich festere Protein-Ligand-Bindung vorliegt, und somit die Verweildauer des Liganden in der Bindungstasche länger ist, der Sättigungstransfer zwischen den Proteinprotonen und dem Fluoratom des Liganden effektiver ist. Daher sollte die Interaktion zwischen *bovine serum albumin* (BSA) und 6-Fluortryptophan untersucht werden. In diesem Fall liegt die Dissoziationskonstante im unteren mikromolaren Bereich;<sup>104</sup> die Bindung von Tryptophan an BSA ist also deutlich fester als die der Saccharide an Lektine und sollte sich somit als Testsystem für dieses Experiment eignen. Das  ${}^{1}H{}^{1}H{}-STD-Spektrum zeigt mit bis zu 55\%$  einen deutlichen absoluten STD-Effekt. Allerdings weist das  ${}^{19}F{}^{1}H{}-STD-Spektrum dieser Probe ebenfalls ein negatives Signal auf, das darauf hindeutet, dass auch hier kein Sättigungstransfer stattgefunden haben kann (Abbildung 59).$ 



**Abbildung 59:** A) 470 MHz-<sup>19</sup>F{1H}-STD-Spektrum von 400 µM BSA und 4 mM 6-Fluortryptophan. Das Spektrum wurde mit dem Pulsprogramm *stdspfhig\_5\_2d.bc* mit 2k Scans aufgenommen. B) Referenzspektrum.
Die entsprechenden Spektren der jeweiligen Liganden in Abwesenheit des Proteins zeigten keine Signale.

#### 4.6.3 Schlussbetrachtungen zum <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment

Die <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektren aller Testsysteme lieferten negative Signale entsprechend einer Signalverstärkung bei on-resonance-Einstrahlung. Die Entstehung des negativen Vorzeichens ist bislang unklar, eine mögliche Erklärung könnte aber ein dominanter intramolekularer HOE im Liganden nach der Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes sein. <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-HOE-Spektren der 6-Deoxy-6-fluoro-D-galactose Probe, die mit verschiedenen Entkopplungsleistungen aufgenommen wurden, deuten allerdings auf eine fehlerhafte Entkopplung hin. Auch hier könnte die Herkunft des unerwarteten Vorzeichens der <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Signale zu suchen sein. Andererseits wurde das gleiche Ergebnis mit dem 250 MHz-Spektrometer erzielt. Es bleibt aber zu erwähnen, dass bei beiden Spektrometern die Pulse in dem Fluor- und Protonen-Kanal über den gleichen Verstärker gesendet werden, was ein Umschalten in der switchbox erforderlich macht. Es ist daher möglich, dass hier ein prinzipielles Problem bei beiden Spektrometern vorliegt, da gegebenenfalls das Umschalten zwischen den Kernen (<sup>19</sup>F und <sup>1</sup>H) mit dem "SWITO-Befehl" nicht einwandfrei funktioniert. Um dies zu testen, müsste das gleiche Experiment an einem Spektrometer durchgeführt werden, bei dem für Fluor und Protonen über verschiedene Verstärker gesendet werden kann, so dass der "SWITO-Befehl" nicht notwendig ist.

Allerdings zeigen die Versuche, dass ein Signal nur in Anwesenheit des Proteins beobachtet wird. Ohne Einstrahlung von Sättigungspulsen weisen die Spektren der Protein-Ligand-Proben ebenfalls keine Signale auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den im  ${}^{19}F{}^{1}H$ -STD-Experiment beobachteten Signalen nicht um Artefakte handelt, die durch das Pulsprogramm hervorgerufen werden. Demnach kann das Experiment für das *screening* von bindungsaktiven Substanzen verwendet werden, auch wenn die Signalintensität im Vergleich zum homonuklearen  ${}^{1}H{}^{1}H$ -STD-Experiment bei allen untersuchten Testsystemen deutlich geringer ist. Dennoch sind die Spektren leichter interpretierbar. Die Leistungsfähigkeit des  ${}^{19}F{}^{1}H$ -STD-Experiments ist an weiteren Testsystemen zu prüfen.

### 4.6.4 NMR Messungen mit rhPrP<sup>c</sup> und fluorierten Peptiden

Als Anwendungsbeispiel für das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment sollte die Interaktion des Fluorderivats **9a**, das in den SPR-Messungen eine Dissoziationskonstante von 114  $\mu$ M aufwies, mit dem Prionprotein getestet werden. Das erhaltene <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum, das in Abbildung 60 gezeigt ist, weist ein negatives Signal auf. Das entsprechende Referenzspektrum in Abwesenheit des Proteins zeigte einen vernachlässigbaren Effekt. Die Protein-Ligand-Interaktion konnte also durch das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Experiment in diesem Fall visualisiert werden. Im Falle eines langsamen Austausches lassen sich im Idealfall in Gegenwart des Proteins separierte Signale für den freien und den gebundenen Zustand des Liganden im <sup>19</sup>F-*zg*-Spektrum beobachten. Auch eine Linienverbreiterung des Ligandsignals im Vergleich zu einem Referenzspektrum des Liganden in Abwesenheit des Proteins seine Signale nur erkennen sein. Daher wurde von einer Protein-Ligand-Probe, in der die Verbindung **9a** in zweifachem Überschuss eingesetzt wurde, und einer entsprechenden Ligandblindprobe ein <sup>19</sup>F-zgig-Spektrum akquiriert. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 60B bzw. Abbildung 60C dargestellt. Beim Vergleich der Spektren ist jedoch keine Linienverbreiterung zu beobachten.



**Abbildung 60: A)** 470 MHz-<sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum von Peptid **9a** (500  $\mu$ M) mit rhPrP<sup>C</sup> (8  $\mu$ M). Einstrahlung der Sättigungspulse erfolgte bei -0.3 ppm. **B)** Das <sup>19</sup>F-zgig-Spektrum von **9a** (16  $\mu$ M) mit hPrP<sup>C</sup> (8  $\mu$ M) zeigt weder separierte Signale für freien bzw. gebundenen Zustand noch ist eine Linienverbreiterung im Vergleich zum <sup>1</sup>H-Referenzspektrum von **9a** (500  $\mu$ M) zu beobachten, welches in **C)** dargestellt ist.

### 4.7 Ausblick

In einem *in vitro* Aggregations-Inhibitions-Assay konnte gezeigt werden, dass das Peptid **9** N153-Q160 mit der Sequenz NMHRYPNQ ( $K_D = 25 \mu M$ ) die Aggregation des zellulären, humanen Prionproteins bis zu 80% inhibiert. Die Verbindung kann demnach als Leitstruktur für potentielle anti-CJK Wirkstoffe verwendet werden. Zur Optimierung der Leistruktur ist ein genauerer Einblick in die Protein-Ligand-Wechselwirkung erforderlich. Aus den *shifts* der chemischen Verschiebung zwischen <sup>1</sup>H<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren in An- und Abwesenheit des Liganden ließe sich die Bindungstasche des Proteins identifizieren. Die Messungen erfordern die <sup>15</sup>N-Markierung des Proteins. Bei bekannter Bindungstasche sind *docking*-Experimente mit der von Zahn *et al.* veröffentlichten NMR-Struktur des humanen Prionproteins möglich. Gelingt eine Cokristallisation des Prionproteins mit Peptid **9** könnte die Röntgenkristallstruktur die Ergebnisse der *docking*-Studien absichern.

Hinweise auf das Bindungsepitop von Verbindung **9** sind über einen Alaninscan zugänglich. Letzterer könnte mit Hilfe von *docking*-Studien auch *in silico* durchgeführt werden. Bereits bekannt ist die Beteiligung des in der Sequenz enthaltenen Tyrosins an einer Wasserstoffbrückenbindung, bei der die Hydroxylgruppe als Protonendonor fungiert. Die Informationen über das Bindungsepitop und die Ergebnisse der *docking*-Experimente bzw. der Cokristallstruktur, geben einen Einblick in die 3D-Struktur pharmacophorer Gruppen. Auf dieser Grundlage könnten neue Liganden mit besserer Bindungseigenschaft und Bioverfügbarkeit entwickelt und synthetisiert werden.

Die SPR-Bindungsstudien, die mit dem Referenz- und dem Glycopeptid (**31** und **32**) durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass das Saccharid zur Spezifität der Bindung beiträgt. Einen Hinweis darauf, ob die Saccharid-Einheit direkt an der Bindung beteiligt ist, oder lediglich die aktive Konformation des Peptids stabilisiert, könnte durch SPR-Studien erhalten werden.

# **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Das Prionprotein (PrP) ist gemäß der Protein-*only*-Hypothese von Prusiner das infektiöse Agens der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Obwohl die Hypothese seit langem kontrovers diskutiert wird, ist allgemein anerkannt, dass eine Wechselwirkung der pathogenen und der zellulären Isoform des Proteins für den Ausbruch der Krankheit erforderlich ist.

Im Rahmen der Dissertation sollten peptidische Inhibitoren des Anlagerungsprozesses der beiden Konformationsisomere gefunden werden. Dazu wurde eine Bibliothek von 28 sich überlappenden Oktapeptiden aus dem globulären C-Terminus der humanen Sequenz parallel synthetisiert. Die Oktapeptide wurden hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität gegenüber rhPrP<sup>C</sup> mittels surface plasmon resonance (SPR) untersucht. Für die drei Regionen V121-R136 (a), Y149-R164 (b) und S231-L242 (c) konnte eine Interaktion mit dem Protein nachgewiesen werden. Anhand von Konzentrationsreihen wurden die Dissoziationskonstanten der entsprechenden Oktapeptide unter der Annahme eines one-site-binding Modells bestimmt. Die Peptide YYRENMHR (8), NMHRYPNQ (9) und YPNQVYYR (10) zeigten mit 21 µM, 25 µM und 164 µM die besten Dissoziationskonstanten. Die Sensorgramme deuten weiterhin auf eine recht langsame Bindungskinetik der Peptide hin. Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation wurde für das Peptid **9** auf 87 s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>, die der Dissoziation auf  $1 \cdot 10^{-2}$  s<sup>-1</sup> bestimmt. Demnach beträgt die mittlere Verweildauer des Liganden in der Proteinbindungstasche ca. 70 s. Die Zusammensetzung der sich überlappenden Peptidfragmente 8 und 9 zum 12er Peptid 29 führte zu keiner Verbesserung der Bindungseigenschaft. SPR-Studien der Peptide 9 und 29 mit den Proteinfragmenten PrP(23-231) und PrP(90-231) lieferten jeweils vergleichbare Affinitätsplots und Dissoziationskonstanten. Demnach ist das Bindungsepitop dieser Peptide auf dem verkürzten Proteinfragment PrP(90-231) lokalisiert.

Zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit wurde im Peptid 9 das Tyrosin durch 4-Fluorphenylalanin (9a) und 4-Trifluormethylphenyalanin (9b) ersetzt. Derivat 9a wies eine fünffach und 9b eine um den Faktor 34 schlechtere Dissoziationskonstante auf. Das Ergebnis zeigt, dass die Tyrosin-Seitenkette direkt mit dem Protein wechselwirkt, wobei das Tyrosin vermutlich als Donor in einer Wasserstoffbrückenbindung fungiert. Aus dem Experiment ist weiterhin abzuleiten, dass der große sterische Anspruch der Trifluormethylgruppe für die Interaktion hinderlich ist. In Peptid 10 wurden alle Tyrosine durch 4-Fluorphenylalanin substituiert (10a), dieses Derivat zeigte keine spezifische Bindung mehr. Mit Hilfe des Sättigungstransfer Differenz (STD) NMR Experimentes sollten die Bindungsepitope der besten Liganden untersucht werden. Die STD-Spektren zeigten generell nur sehr geringe STD-Effekte (< 3%) und kritische STD%/Artefakt-Verhältnisse. Lediglich für das Peptid 9a, das in den SPR-Experimenten eine im Vergleich zu 9 dreifach schnellere Bindungskinetik aufwies, konnte das Bindungsepitop charakterisiert werden. Das *epitope mapping* deutet auf eine Beteiligung der Sequenz RYP hin. Zur Bestätigung des Bindungsepitops wurde das Peptid RYP (30) synthetisiert, welches als *cis/trans*-Rotamerengemisch der Prolin-Einheit im Verhältnis 1:2.2 vorliegt. Die im Vergleich zu 9 deutlich schlechtere Dissoziationskonstante zeigt allerdings, dass die Sequenz RYP nur einen Teil des gesamten Epitops darstellt.

In einem *in vitro* Aggregation-Inhibitions-Assay, in dem die Aggregation von rhPrP(90-231) durch metallkatalysierte Oxidation eingeleitet wird, konnte gezeigt werden, dass die Aggregation durch die Zugabe von Peptid **9** im siebenfachen Überschuss zu 80% inhibiert werden konnte. Die Verbindung stellt somit einen potentiellen anti-CJK-Wirkstoff dar.

Um den Einfluss der Glycosylierungsstelle an N197 auf die Bindungsaktivität und die Struktur des Peptidfragmentes T192-T201 zu untersuchen, wurden das Glycopeptid **32** und das entsprechende unglycosylierte Referenzpeptid **31** dargestellt. Chitobiose wurde als Modellzucker verwendet. Der Einbau des Glycans in das Peptid erfolgte mit dem N $\gamma$ -Chitobiosylasparagin-Baustein, der in der laufenden Peptidsynthese eingesetzt wurde. Die SPR-Bindungsstudien mit rhPrP(23-231) wiesen auf eine spezifische Interaktion für das Glycopeptid (455±166 µM) und eine unspezifische Wechselwirkung des Referenzpeptids hin. Demzufolge nimmt der Zucker entweder direkt an der Bindung teil oder stabilisiert die aktive Konformation des Peptids.

Anhand von NMR-Daten wurde eine Konformationsanalyse von **31** und **32** durchgeführt. Aus NOE-Aufbau-Kurven wurden jeweils etwa 45 interatomare Abstände ermittelt. Aus  ${}^{3}J_{\text{NH,H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten wurden Winkelvorgaben berechnet, die zusammen mit den Abstandsbeschränkungen in DG-Rechnungen einflossen, die mit dem REDAC-Algorithmus des Programms DYANA durchgeführt wurden. Die *backbones* der zehn besten Strukturen wurden jeweils gefittet. Beide Peptide zeigten nur geringe konformelle Abweichungen der Peptidrückgrate (rmsd < 1.7 Å), die Strukturen sind demnach gut definiert. Der Vergleich ergibt, dass die Struktur des Glycopeptids deutlich gestreckter ist. Die Begründung hierfür ist vermutlich in dem großen sterischen Anspruch des Glycans zu suchen.

Im Verlauf der *constrained* MD-Simulationen von **31** und **32** blieben die  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel sowie die interatomaren Abstände in beiden Fällen recht konstant. In den energieminimierten

Endstrukturen sind die Abstands- und Winkelvorgaben gut erfüllt. Die Strukturen weisen deutliche konformelle Unterschiede insbesondere im Bereich der Glycosylierungsstelle auf, womit die unterschiedlichen Bindungsspezifitäten von **31** und **32** gegenüber rhPrP<sup>C</sup> erklärt werden könnten.

Ein zweiter Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines heteronuklearen STD Experiments zwischen Protonen und Fluor. Viele Arzneimittel enthalten als Heterokern Fluor, welches die Metabolisierbarkeit durch Proteasen herabsetzt und als Label für NMR-Messungen gut geeignet ist. Basierend auf dem schon bestehenden  $1D^{-1}H{}^{1}H{}-STD-NMR$  *screening*-Verfahren sollte das analoge  ${}^{19}F{}^{1}H{}-STD-Experiment entwickelt werden.$ 

Durch *inverse gated* Entkopplung der Protonen während der Akquisition wurde dabei eine Erhöhung der Signalintensität und damit der Empfindlichkeit des Experiments erreicht. Zur besseren Überprüfbarkeit der Messergebnisse wurde das Pseudo-2D-STD-Experiment entwickelt. Da durch die Aufnahme des Pseudo-2D-STD-Experiments ebenfalls das *off-resonance* Spektrum zugänglich ist, das als Referenz für die Auswertung der Daten erforderlich ist, bedeutet dieses Messverfahren eine Zeitersparnis um ca. 50%. Als zusätzliche Information erhält man die absolute Phase des STD-Spektrums und damit eine Aussage über das Vorzeichen der Signale. Das Pulsprogramm wurde an verschiedenen Rezeptor-Ligand-Systemen getestet: RCA<sub>120</sub>/6-Deoxy-6-fluoro-*D*-galactose bzw. 3-Deoxy-3-fluoro-*D*-galactose und BSA/Tryptophan. Alle drei Systeme zeigten negative Signale im <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD-Spektrum entsprechend einer Signalverstärkung im *on-resonance*-Spektrum. Dies könnte auf einen intramolekularen NOE nach der Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes hindeuten. Die Messergebnisse konnten dahingehend bestätigt werden, dass ohne selektiven Sättigungspuls keine Artefakte zu beobachten waren, und das entsprechende Spektrum der Ligandblindprobe in Abwesenheit des Proteins keine Signale aufwies.

Das <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD Spektrum einer Probe bestehend aus dem Fluor-Derivat **9a** und rhPrP<sup>C</sup> zeigte ebenfalls negative Signale. Der Vergleich der <sup>19</sup>F-zgig-Spektren der Probe von **9a** in Anund Abwesenheit des Prionproteins deutete auf keine Linienverbreiterung hin, die im Falle eines langsamen Austausches zu erwarten wäre.

# 6 SUMMARY

According to the "Protein-only-Hypothesis" of Prusiner the prion protein (PrP) is the infectious agent of transmissible spongiform encephalopathy. Although the hypothesis is discussed controversially it is generally accepted that the interaction of the abnormal and the cellular isoform is the crucial event for the pathogenesis.

In the course of this thesis peptide inhibitors for the interaction of the two conformational isomers should be found. Therefore, a library of 28 peptides of the C-terminal folded domain of the human prion protein was synthesized each sequence with an overlap of four amino acids. The octapeptides were analyzed with respect to their binding affinity to rhPrP<sup>C</sup> by surface plasmon resonance (SPR). Three regions V121-R136 (a), Y149-R164 (b) and S231-L242 (c) showed an significant interaction. Titration experiments allowed the determination of dissocation constants of the corresponding octapeptides assuming a one-site-binding model. The peptides YYRENMHR (8), NMHRYPNQ (9) and YPNQVYYR (10) showed the best dissociation constants of 21 µM, 25 µM and 164 µM, respectively. Furthermore, the sensorgrams of these peptides indicate slow binding kinetics. The association rate constant was determined to be 87 s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>, while the dissociation rate constant is  $1 \cdot 10^{-2}$  s<sup>-1</sup>. According to these data the average retention period of the ligand in the protein binding pocket is approximately 70 s. The dodecapeptide 29 which is composed of the overlapping peptides 8 and 9 does not indicate increased binding properties. SPR studies of the peptides 9 and 29 with the protein fragments PrP(23-231) and PrP(90-231) show similar affinity plots and dissociation constants. Thus, the binding epitope of these peptides is located on the shortened protein fragment PrP(90-231).

In order to enhance the bioavailability of peptide **9** the tyrosine in the sequence was substituted by 4-fluoro-phenylalanine (**9a**) or 4-trifluoromethyl-phenylalanine (**9b**). The derivative **9a** showed a fivefold and peptide **9b** a 34 fold inferior dissociation constant. The results suggest, that the tyrosine residue directly interacts with the protein as a hydrogen bond donor. Additionally it can be concluded, that the spacial demand of the 4-trifluoromethyl group is obstructive for the interaction. In the peptide **10** all tyrosine residues were substituted by 4fluoro-phenylalanine (**10a**). This derivative did not show any characteristics of specific binding.

By means of STD NMR spectroscopy the binding epitopes of the best ligands should be analyzed. In general, the STD spectra showed only marginal STD effects (< 3%) and critical

STD%/artefact ratios. Merely the binding epitope of peptide **9a** could be characterized, which showed a threefold faster binding kinetic than compound **9**. The epitope mapping suggests a contribution of the sequence RYP to the binding. In order to confirm the epitope the peptide RYP (**30**) was synthesized, which exhibits an equilibrium between the cis and the trans conformer at the proline moiety of a ratio of 1:2.2. The dissociation constant of **30** is clearly inferior to that of **9**, which suggests, that the sequence RYP represents only a part of the binding epitope.

In an in vitro aggregation-inhibition-assay, where aggregation of the prion protein was induced by metal-catalyzed oxidation, it could be shown, that aggregation could be inhibited up to 80% by addition of peptid **9** in a sevenfold excess. Hence, the compound is a potential anti-CJD drug.

In order to study the influence of the glycosylation site at N197 on the binding activity and the structure of the peptide fragment T192-T201 the glycopeptide 32 and the unglycosylated reference peptide 31 were synthesized. Chitobiose was used as a model glycan. The saccharide was introduced into the peptide by employing the Ny-chitobiosyl asparagine building block during the peptide synthesis. SPR binding studies with rhPrP(23-231) showed a specific interaction for the glycopeptide ( $K_D = 455 \pm 166 \mu M$ ), while the interaction of the reference peptide was found to be unspecific. Thus, the saccharide interacts directly with the protein or stabilizes the active conformation of the peptide. A conformational analysis of 31 and 32 was carried out based by analysis of NOE build-up curves, which yielded about 45 interatomic distances for both peptides. From  ${}^{3}J_{\rm NH,H\alpha}$  coupling constants dihedral angle constraints could be calculated. Both, the distance range and the angle constraints were incorporated in distance geometry calculations applying the REDAC algorithm of the software package DYANA. The ten best structures were selected and the backbones were fitted. Both peptides show only small conformational variations of their backbones (rmsd < 1.7 Å). Thus, the structures seem to be well defined. When comparing the structures of 31 and 32 it becomes evident, that the glycopeptide is more stretched, probably due to the large spacial demand of the saccharide.

During the constrained MD simulations of **31** and **32**  $\phi$  und  $\psi$  angles as well as interatomic distances remained relatively constant in both cases. The energy minimized final structures were in good agreement with the experimentally determined constraints. These structures clearly exhibit conformational differences especially for the residues in the neighborhood of the glycosylation site. This yields a possible explanation for their different binding specifities with respect to rhPrP<sup>C</sup>.

A second part of the thesis dealt with the development of a heteronuclear STD experiment between protones and fluorine. Many drugs contain fluorine to stabilize them against degradation through proteases and can be used as a NMR-label. Based on the existing 1D- ${}^{1}H{}^{1}H{}$ -STD NMR screening method the corresponding  ${}^{19}F{}^{1}H{}$ -STD NMR experiment should be developed.

The application of an inverse gated decoupling scheme for proton resonances lead to a higher signal intensity and thus to an enhanced sensitivity of the experiment. In order to get a more precise insight into the results of the spectra the pseudo-2D-STD experiment was developed. The acquisition of these experiments admits th access of the off-resonance spectrum which is required for the analysis of the STD data. Hence, this method reduces acquisition time by 50%. Additionally, the absolute phase of the STD spectrum is available. Thus, the sign of the STD signals can be deduced from the spectra as well. The novel pulse program was applied to various receptor ligand systems:  $RCA_{120}/6$ -desoxy-6-fluoro-*D*-galactose, 3-desoxy-3-fluoro-*D*-galactose and BSA/tryptophane. The spectra of each system showed negative signals, indicating an enhancement of the signal intensity in case of on-resonance irradiation. The data suggest an intramolecular NOE, that occurs after dissociation of the protein ligand complex. The results could be confirmed since no signals are observable in spectra which are recorded without selective saturation. Furthermore, the corresponding spectrum of the ligand in absence of the protein does not show any signals.

The <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD spectrum of a NMR sample of rhPrP in the presence of the fluorinated derivative **9a** showed a negative signal, too. When comparing the <sup>19</sup>F-zgig spectrum of **9a** in presence and absence of the prion protein no line broadening was observed. Thus, slow exchange processes could be excluded.

# 7 EXPERIMENTELLER TEIL

### 7.1 Chemikalien

 Tabelle 14: Hersteller und Chemikalien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

| Hersteller/Lieferant                                  | Chemikalien  |  |  |  |  |
|---|--|--|--|--|--|
| Advanced Chemtech,<br>(Giessen)                       | Fmoc- <i>L</i> -Ala-OH, Fmoc- <i>L</i> -Arg(Pbf)-OH, Fmoc- <i>L</i> -Asn(Trt)-OH,<br>Fmoc- <i>L</i> -Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc- <i>L</i> -Leu-OH, Fmoc- <i>L</i> -<br>Lys(Boc)-OH, Fmoc- <i>L</i> -Met-OH, Fmoc- <i>L</i> -Pro-OH, Fmoc- <i>L</i> -Ser(tBu)-<br>OH, Fmoc- <i>L</i> -Thr(tBu)-OH, Fmoc- <i>L</i> -Ile-OH, Fmoc- <i>L</i> -Trp(Boc)-OH,<br>Fmoc- <i>L</i> -Val-OH, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz |  |  |  |  |
| Applied Biosystems,<br>(Darmstadt)                    | Piperidin/DMF (1:4), <i>N</i> , <i>N</i> -Diisopropylethylamin (DIPEA),<br><i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-tetramethyluroniumtetrafluoro-<br>borat (TBTU), Fmoc-PAL-PEG  |  |  |  |  |
| Biacore AB, (Uppsala)                                 | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS), <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-<br>ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC), Ethanolamin (EA), HEPES-P<br>Puffer, CM5-Chip   |  |  |  |  |
| Cambridge Isotope Lab,<br>(Cambridge)                 | Tris-d <sub>11</sub>   |  |  |  |  |
| Deutero GmbH, (Kastelann)                             | Deuteriumoxid 99.9%, Essigsäure- <i>d</i> <sub>4</sub> 99.5%, NAOD   |  |  |  |  |
| J.T. Baker, (Deventer)                                | Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade)  |  |  |  |  |
| Lancaster (Windham)                                   | Triisopropylsilan (TIPS) 99%   |  |  |  |  |
| Merck, (Darmstadt)                                    | Aceton, Ammoniak, <i>tert</i> -Butylmethylether, α-Cyano-4-<br>hydroxyzimtsäure, Dichlormethan, Diethylether,<br>Dinatriumhydrogenphosphat, Essigsäure, Essigsäureanhydrid,<br>Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol,<br>Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid,<br>Phosporsäure 100%, 2-Propanol, Trifluoressigsäure   |  |  |  |  |
| Omicron Biochemicals, Inc,<br>(USA)                   | 3-Deoxy-3-fluoro- <i>D</i> -galactose  |  |  |  |  |
| Pierce (Rockford, USA)                                | Coomassie Plus Bradford Assay Kit  |  |  |  |  |
| Proligo, (Hamburg)                                    | DMF  |  |  |  |  |
| Toronto Research Chemicals,<br>Inc. (Toronto, Kanada) | 6-Deoxy-6-fluoro- <i>D</i> -galactose  |  |  |  |  |

#### Nγ-Chitobiosylasparagin-Baustein

Der Ny-Chitobiosylasparagin-Baustein wurde freundlicher Weise von Ilona Müller zur Verfügung gestellt.

#### Proteine und Antikörper

*Prionprotein*: Sowohl für die SPR- als auch für die STD-Messungen wurde das rekombinante humane Prionprotein rhPrP<sup>C</sup>(23-231), His*-tag*, der Firma Merck Biosciences GmbH, Bad Soden eingesetzt. Das Protein wurde geliefert als eine 83  $\mu$ M Lösung in 50 mM Acetat-Puffer, pH 4. Das rekombinant in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte Prionprotein Fragment rhPrP<sup>C</sup>(90-231) wurde von Dr. Lars Redecke für die SPR-Messungen zur Verfügung gestellt.

*Monoklonaler anti-human Prionprotein Antikörper*: Als Referenz für SPR-Messungen wurde der monoklonale anti-*human* Prionen Antikörper 15B6 der Firma Roboscreen, Leipzig verwendet, der das lineare Bindungsepitop zwischen den AS 160-170 der humanen Sequenz erkennt. Reaktivität zeigt der Antikörper sowohl mit dem humanen als auch mit dem bovinen Protein.

 $RCA_{120}$ : Das *ricinus communis agglutinin* wurde von der Firma Vector Labatories, Burlingame, USA bezogen. RCA\_{120} liegt als Lösung in 10 mM Phosphatpuffer bei pH = 7 vor.

*BSA:* Albumin aus Rinderserum wurde von der Firma Fluka, Buchs, Schweiz bezogen. Geliefert wird das Protein als kristallisierter, lyophyllisierter Feststoff.

#### Puffer

*PBS-Puffer:* 0.14 M NaCl, 0.002 M KCl, 0.008 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.002 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.008 M NaN<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O, pH = 7.4.

*HBS-P-Puffer:* 0.01M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005% Polysorbat P20, pH = 7.4.

*Acetat-Puffer:* 50 mM Acetat, 150 mM NaCl, 4 mM NaN<sub>3</sub> eingestellt mit NaOD auf pH = 4.5; bzw. 5 mM Acetat eingestellt mit NaOH auf pH 5.

TBS-Puffer: 0.01 M Tris-d<sub>11</sub>, 0.15 M, 0.004 M NaN<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O, pH 7.

### 7.2 Verwendete Geräte und Software

#### **Automatisierte Peptidsynthese**

*Pioneer Peptide Synthesis System*: Peptide **10a**, **29**, **31** und **32** wurden am Peptidsynthesizer Pioneer Peptide Synthesis System, Perseptive Biosystems, Framingham hergestellt. *Advanced ChemTech MOS 469*  $\Omega$ . Die Peptide **1-28** wurden am Syntheseroboter MOS 469  $\Omega$ der Firma Advanced ChemTech, Kentucky synthetisiert.

#### Chromatographie

*BioCAD Sprint Perfusions Chromatography System*: Die Aufreinigung der Peptide erfolgte mittels RP-HPLC an einer BioCAD Sprint HPLC Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden.

*HPLC-Säulen*: Als stationäre RP-Phase im präparativen Maßstab steht eine *VP 250/21mm NUCLEOSIL* 100 - 7  $\mu$ m C18-Säule (Flussrate 20 mL/min) zur Verfügung, im semipräparativen Maßstab wurde eine 218TP510-Säule (1.0 x 25 cm, 5  $\mu$ m) der Firma Vydac (Flussrate 5 mL/min) verwendet.

Fraktionssammler: Gilson FC205 "Fraction collector", Middleton, WI, USA.

#### Massenspektrometrie

#### LC-ESI-MS:

*MAT95XL*: Die Reinheitsbestimmung und Charakterisierung der Peptide **1-28** erfolgte mit einem Sektorfeld-Ionenfallen-MS-MS-Gerät vom Typ *MAT95XL* der Firma ThermoQuest. Durch eine HPLC vom Typ ConstaMetric 4100 wurden die Gemische aufgetrennt (Trennsäule: *LiChrospher 100* RP-18e (5  $\mu$ m), Länge 250 mm der Firma Merck). Mittels UV-Detektor vom Typ WellChrom Spectro-PhotometerK-2501 wurde dabei bei 280 nm detektiert. MALDI-TOF-MS:

*Bruker Biflex III*: HPLC-Chromatogramme wurden mit Hilfe eines MALDI-TOF Massenspektrometer Biflex III der Firma Bruker Daltonics, Bremen untersucht.

#### NMR-Spektroskopie

*Bruker Avanced 700 Spektrometer*: Der Magnet besitzt eine Feldstärke von 16.35 Tesla, was einer Resonanzfrequenz von 700.13 MHz für Protonen entspricht. Das Spektrometer ist ausgestattet mit einem inversen 5 mm Tripleresonanz-Cryo-Probenkopf mit z-Gradienten und

abgeschirmten Spulen sowie einem analogen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf ohne Cryo-Technologie.

*Bruker DRX 500 Spektrometer*: Die Feldstärke des Magneten beträgt 11.67 Tesla entsprechend einer Larmorfrequenz von 499.87 MHz für Protonen und 470 MHz für den <sup>19</sup>F-Kern. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet. Ein 5 mm <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H-QNP-Probenkopf wurde freundlicherweise von Dr. Volker Sinnwell zur Verfügung gestellt.

*Bruker Avance 250*: Einige der <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD NMR Messungen wurden am 250 MHz-Spektrometer der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Peters in der Medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt. Die Magnetfeldstärke beträgt 5.87 Tesla entsprechend einer Larmorfrequenz von 250 MHz für Protonen und 215 MHz für den <sup>19</sup>F-Kern. Das Spektrometer ist mit einem 5 mm <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H-QNP-Probenkopf mit z-Gradienten ausgestattet.

*NMR-Röhrchen*: Die NMR-Experimente wurden in 5 mm-Röhrchen des Typs Kontes 897240-0008 ("Typ240", Kontes, Vineland, New Jersey, USA) oder Wilmad 528-pp-8 (Wilmad, Buena, New Jersey, USA) durchgeführt. Für bessere Empfindlichkeit bei STD-Experimenten wurden Shigemi-NMR-Röhrchen vom Typ BMS-005TB mit 8 mm Bodendicke (Shigemi Corporation, Ltd., Tokyo, Japan) verwendet.

*Workstations*: Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte wahlweise an Silicon-Graphics Workstations (O<sub>2</sub>, Octane) oder am PC.

*NMR-Software*: Zur Auswertung der NMR-Spektren wurden die Programme XWINNMR (Version 3.1 und 3.0), TOPSPIN (Version 1.3) und AURELIA (Version 3.0.1) der Firma Bruker verwendet.

#### **SPR-Messungen**

*Biacore 3000*: Die SPR-Messungen erfolgten an einem Biacore 3000-Gerät der Firma Biacore, Uppsala, Schweden, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Peters in Medizinischen Universität zu Lübeck. Dabei wurde das Protein auf Sensorchips des Typs CM-5 der Firma Biacore immobilisiert.

*Biacore-Software*: Zur Aufnahme bzw. Auswertung der Messdaten wurden die Programme Biacore Control Software (Version 3.0) und BIAevaluation (Version 3.0.2) verwendet.

Der Fit der Datenpunkte an die Gleichung 13 erfolgte mit dem Programm ORIGIN 6.1.

#### **Dynamische Lichtstreuung:**

*Spectroscatter 204:* Die Bestimmung der Teilchengrößen in den Aggregationsuntersuchungen des Prionproteins erfolgte mit dem Spectroscatter 204 der Firma PLS-Design GmbH, Hamburg.

Software: Die Ergebnisse wurden mit dem Programm PHOTO CORRELATOR ausgewertet.

#### Photometer

*Shimadzu UV-160A*: Für die Bestimmung der Fmoc-Werte diente das UV-Visible Recording Photometer Shimadzu UV-160A der Firma Shimadzu, Duisburg.

*Küvetten:* Als Küvette diente die Präzisionsküvette des Typs *104-QS* (10 mm) der Firma Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim.

*ND-1000 Spektrophotometer:* Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Spektrophotometer des Typs *ND-1000* der Firma NanoDrop<sup>®</sup>, Wilmington, USA.

#### Zentrifugation

*Sigma 2K15*: Für das Umpuffern der RCA<sub>120</sub> bzw. des anti-Prionprotein Antikörpers wurde die Zentrifuge 2K15 von der Firma Sigma verwendet.

*Eppendorfzentrifuge 5804R*: Das Abzentrifugieren des Rückstandes nach der Fällung mit *tert*-Butylmethylether erfolgte mit der Eppendorfzentrifuge 5804R der Firma Eppendorf, Leipzig.

*Eppendorfzentrifuge 5415C*: Nicht lösliche Rückstande in NMR-Proben bzw. Proben für die HPLC wurden zur weiteren Verwendung mit einem Zentrifugenfilter mit Hilfe der Eppendorfzentrifuge 5415C abfiltriert. Als Filter wurden die Zentrifugenfilter SPIN-X der Firma Vitaris, Baar verwendet.

*Ultrafiltrationsmembran*: Zum Umpuffern der RCA<sub>120</sub> wurde das *Ultrafiltrationsröhrchen Centricon-10* (MWCO 10 kDa, regenerierte Zellulose) der Firma Millipore Corporation, USA, verwendet. Für den anti-Prionprotein Antikörper diente ein 4 mL-Ultrafiltrationsröhrchen Vivaspin (MWCO 30 kDa) der Firma Vivascience AG, Hannover.

#### Speedvac

*SpeedVac SC110*: Zur Gefriertrocknung von wässrigen Lösungen diente die SpeedVac SC110 der Firma Savant, New York.

*SpeedVac SPD121P*: Peptidlösungen, die TFA enthielten, wurden mit der SpeedVac SPD121P der Firma Savant, New York, USA, gefriergetrocknet.

### 7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV1: Fmoc-Abspaltung und Methylenfluoren-Monitoring

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das betreffende Harz in einer Glasfritte zweimal mit je 2 mL eines Piperidin/DMF (1:4) Gemisches (*deblock*) versetzt und über einen Zeitraum von je 15 min geschüttelt. Zur Bestimmung der Kupplungsausbeute wird anschließend achtmal mit je 2 mL DMF gewaschen und die vereinigten Phasen je nach Ansatzgröße 1:20, 1:10 oder 1:5 verdünnt. Die Menge des abgespaltenen Methylenfluorens lässt sich photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm ( $\epsilon$ =7950 L·cm<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>) ermitteln, so dass die Kupplungsausbeute bestimmt werden kann.<sup>137</sup>

#### **AAV2:** Acetylierung

Zur Acetylierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen (*cappen*) wird das Harz mit einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid und DMF im Verhältnis 1:9 bedeckt und über einen Zeitraum von ca. 30 min geschüttelt. Abschließend wird das Acetylierungsreagenz im Unterdruck entfernt und das Harz ausgiebig mit DMF gewaschen.

#### AAV3: Manuelle Kupplung der Aminosäurederivate

Nach der Trocknung des Harzes im Hochvakuum wird abs. DMF zum Quellen auf das Harz gegeben. Nach 10 min wird das DMF im Überdruck entfernt. Die Aminosäure wird, falls notwendig, mit Seitenkettenschutzgruppe als N-terminal geschütztes Fmoc-Derivat im vierfachen Überschuss eingesetzt. Als Aktivator wird TBTU, als Base DIPEA verwendet und jeweils im fünffachen Überschuss hinzugesetzt. Die Reagenzien werden dazu in wenig DMF gelöst und nach einer Voraktivierungszeit von ca. 5 min dem Harz zugesetzt. Der Schwierigkeit der jeweiligen Kupplung angepasst, wird die Reaktionsdauer variiert, und die Kupplung gegebenenfalls wiederholt. Nach Beendigung einer Kupplung wird die Reaktionslösung entfernt und mit DMF gewaschen.

#### AAV4: Abspaltung der Peptide von der Festphase und Entschützung der Seitenketten

Das Harz wird mit Isopropanol gewaschen, welches im Überdruck entfernt wird. Anschließend werden 4 mL Abspaltlösung bestehend aus TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2) auf das Harz gegeben und für eine Stunde geschüttelt. Die Lösung wird in einem Kolben aufgefangen. Der Vorgang wird einmal wiederholt. Der Rückstand wird in H<sub>2</sub>O aufgenommen und lyophyllisiert.

#### AAV5: Entschützung des Ny-Chitobiosylasparagin-Bausteines

Der Baustein wird eingewogen, mit 1 mL TFA/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 19:1 versetzt und über einen Zeitraum von 20 min geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Ölpumpenvakuum getrocknet, und nach zwei Stunden wird dreimal mit Toluol codestilliert.

#### AAV6: Kupplung des Ny-Chitobiosylasparagin-Bausteines

Zur Bausteinkupplung werden 1.2 eq frisch entschützter Baustein unter Stickstoffatmosphäre in wenig abs. DMF gelöst und im N<sub>2</sub>-Gegenstrom auf das zuvor im Ölpumpenvakuum getrocknete Harz gegeben. Getrennt davon werden TBTU und DIPEA in abs. DMF gelöst und dem Harz ebenfalls im Stickstoff-Gegenstrom hinzugesetzt. Dabei sollte das Verhältnis Baustein/Base/Aktivator 1:1.5:1.5 betragen. Es wird eine Zweifachkupplung durchgeführt, wobei die Reaktionszeit je Kupplung ca. 12 h beträgt.

#### AAV7: Deacetylierung des Chitobiosylrestes am Harz

Das im Ölpumpenvakuum getrocknete Harz wird mit einem Gemisch aus Hydrazinhydrat und abs. MeOH im Verhältnis (1:5) im Stickstoff-Gegenstrom bedeckt und über einen Zeitraum von sechs Stunden geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Harz gründlich mit DMF, 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und anschließend getrocknet.

#### AAV8: Aufreinigung der Peptide bzw. der Glycopeptide mittels RP-HPLC

Es werden max. 5-10 mg Rohsubstanz in 1 mL eines Gemisches aus H<sub>2</sub>O und MeCN (95:5) + 0.1% TFA suspendiert. Die Suspension wird über einen Zeitraum von 2 min gevortext und anschließend für 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Nichtlösliche Rückstände werden mittels Zentrifugenfilter abfiltriert.

Die klare Lösung wird über eine 1 mL Probenschleife auf die Trennsäule gegeben. Je nach Menge des aufzutrennenden Gemisches wird eine semipräperative oder präparative C18 Säule verwendet. Als Laufmittelsystem wird ein entgastes Gemisch aus 95% Reinstwasser + 5% MeCN + 0.1% TFA (Eluent A) und ein Gemisch aus 95% MeCN + 5% Reinstwasser + 0.1% TFA (Eluent B) verwendet. Die Gradienten der Elution lassen sich über die Anzahl der (column Säulenvolumina volume. CV) bestimmen. innerhalb derer sich ein Mischungsverhältnis der beiden Eluenten einstellen soll. Eluiert wird bei Raumtemperatur und einer Flussrate von 5 mL/min (semipräparative Säule) oder 20 mL/min (präparative Säule).

Die Detektion erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 215 oder 280 nm. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie werden die *peaks* des erhaltenen Chromatogramms den Massen der Produkte zugeordnet. Die getrennt gesammtelten Fraktionen der einzelnen Läufe,

die das gleiche Produkt enthalten, werden zusammengegeben. Die vereinten Phasen werden dann zunächst am Rotationsverdampfer eingeengt und abschließend gefriergetrocknet.

#### AAV9: CCA-Matrix

Es wird eine gesättigte Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure in H<sub>2</sub>O (bidest)/MeCN im Verhältnis (2:1) + 0.1% TFA hergestellt. Dazu wird die Suspension zwei Minuten gevortext, für fünf Minuten ins Ultraschallbad gestellt und abschließend zentrifugiert.

#### AAV10: DHB-Matrix

Zur Herstellung der DHB-Matrix werden 10 mg 3,5-Dihydroxybenzoesäure in 1 mL eines Gemisches aus Wasser (bidest) und Ethanol im Verhältnis (1:1) gelöst.

#### AAV11: Vorbereitung der Proben für die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren

Die zu untersuchende Substanz, deren Konzentration ca. 10 pmol/µL betragen sollte, wird zusammen mit der Matrix (siehe AAV9 und AAV10) auf dem Probenteller auskristallisiert.

#### AAV12: Vorbereitung der NMR-Proben

Zur Charakterisierung der Peptide wird eine Lösung der zu untersuchenden Substanz in  $H_2O/D_2O$  (9:1) hergestellt und auf pH 3-3.5 mit TFA eingestellt.

Die STD-Experimente mit dem Prionprotein wurden in einer deuterierten Acetat-Pufferlösung durchgeführt bei pH 4.5. Die  ${}^{19}F{}^{1}H{}$ -STD-Experimente erfolgten in einer TBS- oder PBS-Puffer-Lösung bei pH 7.4. Dazu wird das jeweilige Aliquot des Peptids im Puffer aufgenommen 2 min gevortext, über einen Zeitraum von ca. 10 min im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend mit einem Zentrifugenfilter filtriert.

Auf gleiche Weise wurde mit den Proteinen verfahren. Die Proteinlösungen wurden stets während der Bereitung der NMR-Proben unter Eiskühlung verwahrt.

Alle NMR-Proben wurden nach der Zusammengabe der Komponenten 2 min gevortext, für ca. 10 min im Ultraschallbad homogenisiert und abschließend mittels Zentrifugenfilter filtriert.

#### Umpuffern der RCA<sub>120</sub> und des anti-Prionen-Antikörpers

 $RCA_{120}$ : Die RCA<sub>120</sub> liegt herkömmlich als Lösung in PBS-Puffer in H<sub>2</sub>O vor, wobei die Protein-Konzentration 5 mg/mL beträgt. Zum Umpuffern der RCA<sub>120</sub> für NMR-Experimente wird ein PBS-Puffer in D<sub>2</sub>O angesetzt und auf den pH-Wert 7.4 eingestellt. Dieser Puffer dient als Basislösung. Für das Umpuffern der Proteinlösung wird ein Centricon-10 Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 10 kDa) zunächst über Nacht in H<sub>2</sub>O (bidest) belassen und anschließend zweimal bei 20 °C und 6000 Umdrehungen/min mit D<sub>2</sub>O danach dreimal mit der Basislösung gespült, um Glycerin aus der Membran zu entfernen. 500  $\mu$ L der kommerziell erwerblichen Proteinlösung werden dann bei 20 °C und 6000 Umdrehungen/min auf ein Retentatvolumen von 200-300  $\mu$ L konzentriert. Das Ultrafiltrationsröhrchen wird achtmal mit dem deuterierten PBS-Puffer auf 2 mL aufgefüllt und die Lösung jeweils auf 200-300  $\mu$ L konzentriert. Nach der letzten Zentrifugationsrunde verbleiben 700  $\mu$ L, die in ein *Eppendorftube* überführt wurden. Unter der Annahme, dass das gesamte Protein erhalten wurde, beträgt die Konzentration der auf diese Weise erhaltenen Stammlösung 30  $\mu$ M.

*Monoklonaler anti-PrP-Antikörper:* Der monoklonale anti-*human* Prionprotein Antikörper 15B6 liegt als eine Lösung von 100  $\mu$ g in 50  $\mu$ L PBS-Puffer vor. Zum Umpuffern des Antikörpers wird HEPES-P-Puffer angesetzt, der als Basislösung diente. Zunächst wird ein Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 30 kDa) achtmal mit je 3 mL H<sub>2</sub>O (bidest) bei 10 °C und 2500 Umdrehungen/min gespült. Abschließend wird der Vorgang zweimal mit der Basislösung wiederholt. 25  $\mu$ L der Antikörper-Lösung werden nun aufgegeben und das Volumen auf 3 mL mit HEPES-P-Puffer aufgefüllt. Bei 2500 Umdrehungen/min wird die Lösung auf 200-400  $\mu$ L konzentriert. Dieser Zyklus wird fünfmal wiederholt, bis schließlich 666  $\mu$ L der umgepufferten Lösung verbleiben. Unter der Annahme, dass der Antikörper vollständig zurückgewonnen wird, ergibt sich bei einem angenommenen Molekulargewicht von 150 kDa eine Antikörper-Konzentration von 500 nM.

### 7.4 Peptidsynthesen

#### 7.4.1 Automatisierte Peptidsynthesen

Die Peptidsynthese der im Verlauf der Arbeit dargestellten Peptide erfolgte weitestgehend vollautomatisch ausgehend vom C-Terminus an der Festphase nach Fmoc-Strategie. Als feste Phase wird dazu das Fmoc-geschützte Polyethylenglycol-Polystyrol-Harz (PEG-PS-Support) mit Peptidamid-Linker (PAL) verwendet. Als Aminosäuren dienen die Fmoc-geschützen L-Aminosäurederivate, die im vierfachen Überschuss eingesetzt werden, und deren funktionelle Gruppen an den Seitenketten durch entsprechende Schutzgruppen blockiert sind (siehe Abkürzungsverzeichnis). Als Aktivator dient TBTU, und als Base wird DIPEA verwendet. Sowohl Aktivator als auch Base werden jeweils im fünffachen Überschuss eingesetzt.

Die Synthese beginnt mit dem Quellvorgang des Harzes, wobei DMF als Quellmedium dient. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt innerhalb von 10 min mit einem Gemisch aus Piperidin/DMF (1:4). Anschließend wird gründlich mit DMF gewaschen. Es werden je drei Kupplungsschritte durchgeführt, wobei Aminosäure, Aktivator und Base als Lösung in DMF auf das Harz gegeben wird. Die Reaktionszeiten eines Kupplungsschrittes betragen im allgemeinen 30 min, 60 min und 90 min. Bei schwierigen Kupplungen, bei denen eine geringe Reaktionsausbeute bereits bekannt ist, werden die Reaktionszeiten gegebenenfalls auf dreimal 120 min verlängert. Im letzten Schritt des Synthesezyklus werden nicht umgesetzte, freie Aminofunktionen mit einer 10%-igen Essigsäureanhydrid-Lösung in DMF acetyliert (*capping*-Schritt). Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe leitet einen neuen Reaktionszyklus ein. Nach Beendigung der Peptidsynthese wird die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, der N-Terminuns aber nicht acetyliert. Die Abspaltung der Peptide vom Harz und die Entschützung der Aminosäureseitenketten wird in einer Lösung von Trifluoressigsäure/TIPS/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 95:5:2 durchgeführt.

#### 7.4.2 Synthese am Syntheseroboter Advanced ChemTech MOS 469 Ω.

#### Parallelsynthese und Reinigung der Peptide 1-28

Die Peptide **1-28** wurden im Parallelsynthesesystem vollautomatisch in 20 µmol Ansätzen dargestellt. Das Harz wird in äquivalenter Menge in einen Reaktionsblock eingewogen. Von den Aminosäuren, Aktivator und Base wird je eine 0.5 M Lösung in DMF hergestellt und den dafür vorgesehenen Behältern bereit gestellt. Sowohl Fmoc-Abspaltung als auch Wasch-, Kupplungsschritt und Acetylierung der nicht umgesetzten, freien Aminofunktionen erfolgen nach einem Standard-Reaktionsprotokoll, das im Anhang beispielhaft aufgeführt ist. Auf eine Bestimmung des Fmoc-Wertes zur Ermittlung der Rohausbeute wurde zugunsten der Einfachheit der vollautomatischen Abspaltung verzichtet. Für den Abspaltvorgang der Peptide vom Harz wird das Harz in einen speziellen Abspalt-Reaktionsblock überführt. Die synthetisierten Peptide werden in dem Abspaltblock als TFA-Lösung in Nalgenfläschen aufgefangen. Auch für die TFA-Abspaltung ist im Anhang ein Standardprotokoll angegeben. Die TFA wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt lyophyllisiert.

Auf das lyophyllisierte Rohprodukt werden je 3 mL *tert*-Butylmethylether gegeben, 2 min gevortext und 5 min im Ultraschallbad verweilt. Die Lösungen werden über Nacht bei -18 °C auskristallisiert. Dann wird bei –9 °C und 5000 U/min zentrifugiert. Der organische Überstand wird vorsichtig entfernt, und der Vorgang wiederholt. Auf den zurückbleibenden, vorgereinigten Feststoff wird nun je 1 mL eines Gemisches aus H<sub>2</sub>O (bidest), Acetonitril und TFA im Verhältnis 95:5:0.1 gegeben, 2 min gevortext und 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Es wird bei 20 °C und 5000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird abgenommen, lyophillisiert und die Ausbeute ermittelt. Die Bestimmung der Reinheit der auf

diese Weise aufgereinigten Produkte erfolgt mittels LC-ESI-MS. Sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit der Peptide sind in Tabelle 15 angegeben.

**Tabelle 15:** Ausbeuten, Reinheiten und Molekulargewichte der parallel synthetisierten Peptide **1-28** nach dem Ausschütteln mit *tert*-Butylmethylether und anschließender Aufnahme in H<sub>2</sub>O/MeCN (95:5) + 0.1% TFA. <sup>1</sup>Die Ausbeuten sind in bezug auf die ermittelten Reinheiten angegeben. n.b. nicht bestimmt.

| Peptide | Sequenz  | Fragment  | Reinheit | Reinheit Ausbeute |      | Molmasse |
|---------|----------|-----------|----------|-------------------|------|----------|
|         |          |           | [%]      | [mg]              | [%]' | [g/mol]  |
| 1       | VVGGLGGY | V121-T128 | 100      | 12.7              | 88   | 719.39   |
| 2       | LGGYMLGS | L125-S132 | 93       | 10.8              | 53   | 795.38   |
| 3       | MLGSAMSR | M129-R136 | 60       | 17.3              | 61   | 850.41   |
| 4       | AMSRPIIH | A133-H140 | 73       | 9.2               | 36   | 922.51   |
| 5       | PIIHFGSD | P137-D144 | 42       | 2.0               | 5    | 883.45   |
| 6       | FGSDYEDR | F141-R148 | n.b      | 11.5              | n.b. | 986.41   |
| 7       | YEDRYYRE | Y145-E152 | 49       | 14.5              | 30   | 1191.52  |
| 8       | YYRENMHR | Y149-R156 | 47       | 20.8              | 36   | 1166.53  |
| 9       | NMHRYPNQ | N153-Q160 | 88       | 4.5               | 19   | 1057.48  |
| 10      | YPNQVYYR | Y157-R164 | 86       | 13.9              | 54   | 1100.53  |
| 11      | VYYRPMDE | V161-E168 | 71       | 6.3 21            |      | 1070.48  |
| 12      | PMDEYSNQ | P165-Q172 | 41       | 1.3 3             |      | 981.38   |
| 13      | YSNQNNFV | Y169-V176 | 97       | 8.7 43            |      | 983.44   |
| 14      | NNFVHDSV | N173-V180 | 68       | 11.1              | 41   | 929.44   |
| 15      | DSVNITIK | D178-K185 | >95      | 10.8              | 61   | 887.51   |
| 16      | ITIKQHTV | l182-V189 | 83       | 10.4              | 46   | 937.58   |
| 17      | QHTVTTTT | Q186-T193 | 4        | 15.4              | 3    | 886.47   |
| 18      | TTTTKGEN | T190-N197 | 45       | 16.5              | 44   | 849.43   |
| 19      | FTETDVKM | F198-M205 | 93       | 9.1               | 44   | 968.48   |
| 20      | DVKMMERV | D202-V209 | 77       | 9.0               | 34   | 1005.52  |
| 21      | MERVVEQM | M206-M213 | 92       | 5.3               | 24   | 1019.49  |
| 22      | VEQMSITQ | V210-Q217 | 86       | 8.6               | 40   | 933.46   |
| 23      | ITQYERES | l215-S222 | 83       | 5.3               | 22   | 1023.49  |
| 24      | ERESQAYY | E219-Y226 | 19       | 4.7               | 4    | 1043.46  |
| 25      | QAYYQRGS | Q223-S230 | 40       | 9.3               | 19   | 970.46   |
| 26      | QRGSSMVL | Q227-L234 | n.b.     | 13.3              | n.b. | 875.46   |
| 27      | SMVLFSSP | S231-P238 | 95       | 5.1               | 28   | 865.43   |
| 28      | FSSPPVIL | F235-L242 | 91       | 5.8               | 31   | 857.49   |

Für die ESI-MS-Analyse wird eine Lösung von 100 pg/ $\mu$ L zu untersuchende Substanzmenge in H<sub>2</sub>O/MeCN (95:5) + 0.02% TFA hergestellt. 20  $\mu$ L der klaren Lösung werden über eine Probenschleife auf eine analytische C18 Säule gegeben. Als Lösungsmittelsystem wird ein

entgastes Gemisch aus 95% Reinstwasser + 5% MeCN + 0.02% TFA (Eluent E) und ein Gemisch aus 95% MeCN +5% Reinstwasser + 0.02% TFA (Eluent F) verwendet. Das Peptidgemisch wird mittels HPLC aufgetrennt und ein Teil der Eluats wird zum ESI-Massenspektrometer weitergeleitet, so dass die *peaks* des HPLC-Chromatogramms den Massen zugeordnet werden können. Zur Bestimmung der Reinheit werden die Ionenströme der Massen der verschiedenen Komponenten integriert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

Diejenigen Peptide, die eine Reinheit von unter 80% aufwiesen, sowie Peptid **15** wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt (AAV8). Die Ausbeuten der Produkte nach der Reinigung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

|    | Ausbeute<br>[mg] | Ausbeute<br>[%] |  |  |
|----|------------------|-----------------|--|--|
| 3  | 5.15             | 30              |  |  |
| 4  | 2.72             | 15              |  |  |
| 5  | 0.51             | 3               |  |  |
| 6  | 1.43             | 7               |  |  |
| 7  | 0.10             | 0.4             |  |  |
| 8  | 1.04             | 4               |  |  |
| 11 | 1.94             | 9               |  |  |
| 14 | 0.29 2           |                 |  |  |
| 15 | 10.8             | 61              |  |  |
| 18 | 1.03             | 6               |  |  |
| 20 | 0.35             | 2               |  |  |
| 24 | 0.04 0           |                 |  |  |
| 25 | 0.26             | 1               |  |  |

Tabelle 16: Ausbeute der Peptide nach der Aufreinigung mittels RP-HPLC.

#### 7.4.3 Synthesen am Peptidsynthesizer Pioneer Peptide Synthesis System

Für den Peptidsynthesizer wird das Harz in eine Stempelsäule gegeben, und die Aminosäuren werden je nach Kupplungszahl gegebenenfalls mehrfach in Reagenzgläser im vierfachen Überschuss abgewogen. Aktivator und Base werden als 0.5 M Lösung bereitgestellt. Zum Quellen des Harzes wird DMF über einen Zeitraum von einigen Minuten kontinuierlich durch die Säule gepumpt. Es wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, wobei die Fmoc-Werte *online* während der Synthese photometrisch gemessen werden. Anschließend wird die im nächsten Schritt zu kuppelnde Aminosäure in DMF gelöst und zyklisch mit Aktivator und Base durch die Säule gepumpt. Zum Abschluss des Kupplungszyklus wird ein *capping*-Schritt

durchgeführt. Da die Fmoc-Werte relativ unpräzise sind, wird die Fmoc-Gruppe der N-terminalen Aminosäure am Peptid belassen und manuell abgespalten (AAV1). Die Abspaltung des Peptids vom Harz und die Entschützung der Aminosäureseitenketten mit 95%-iger TFA erfolgt ebenfalls manuell (AAV4).

#### Synthese des 12er Peptids YYRENMHRYPNQ (29)

Die Darstellung des 12er-Peptids erfolgte beginnend beim C-Terminus vollautomatisch in einem 50 µmol Ansatz am Festphasenpeptidsynthesizer. Es wurden Dreifachkupplungen durchgeführt, bei denen die Reaktionszeiten der ersten Kupplung 30 min, die der zweiten 60 min und die der letzten 90 min betrug. Nach Beendigung der Synthese am Synthesizer wurde das Harz in eine Glasfritte überführt und die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten. Der Fmoc-Wert der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Rohausbeute von 38 µmol entsprechend einer Rohausbeute von 78%. Das Peptid sowie die Seitenkettenschutzgruppen wurden mit TFA abgespalten, und das Rohprodukt lyophyllisiert. Nach der Aufreinigung des Peptids mittel RP-HPLC wurden 9.5 mg (5.7 µmol) gereinigtes Produkt erhalten. Die Gesamtausbeute betrug damit 11%. (AAV1/4/8)

#### Synthese von des unglycosylierten Referenzpeptids TTKGENFTET (31)

Die Synthese des Peptids wurde vom C-Terminus ausgehend an einem vollautomatischen Festphasenpeptidsynthesizer durchgeführt. Die Ansatzgröße betrug 50 µmol. Jede Aminosäure wurde dreimal gekuppelt, wobei jeder Kupplungsschritt 120 min betrug. Aminosäure, Aktivator und Base wurden in den unter Abschnitt 7.4.1 beschriebenen Überschüssen eingesetzt. Die Fmoc-Wertbestimmung der N-terminalen Schutzgruppe ergab eine Stoffmenge von 35 µmol entsprechend 70% Ausbeute bezogen auf einen 50 µmol Ansatz. Anschließend wurde das Peptid vom Harz und die Seitenkettenschutzgruppen mit TFA abgespalten und das Produkt gefriergetrocknet (AAV1/4). Die Aufreinigung des Lyophyllisats erfolgte mittels HPLC (AAV8). Es wurden 33.2 mg gereinigtes Produkt erhalten. Dies entspricht bei einer Molmasse von 1125.53 g/mol einer Stoffmenge von 29.5 µmol und damit einer Ausbeute von 58% bezogen auf die theoretische Ausbeute eines 50 µmol-Ansatzes.

#### Synthese des Glycopeptids TTKGEN[β-D-GlcNAc-(1-4)-β-D-GlcNAc]FTET (32)

Vom C-Terminus ausgehend erfolgten die Kupplungen der ersten vier Aminosäuren bis zur Glycosylierungsstelle am vollautomatischen Festphasenpeptidsynthesizer. Dabei wurde ein auf 50 µmolAnsatz gewählt. Jede Aminosäure wurde dreimal mit den üblichen Überschüssen gekuppelt, wobei jeder Kupplungsschritt 120 min betrug. Nach Beendigung der ersten

Teilsynthese wurde das Harz in eine Glasfritte überführt und das Harz über mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Rohausbeute von 45 µmol entsprechend 90% bezüglich eines 50 µmol Ansatzes (AAV1).

Für die Kupplung des Fmoc-geschützten N $\gamma$ -Chitobiosylasparagin-Bausteins wurde letzterer mit TFA entschützt (AAV5) und dann direkt im Anschluss manuell nach Arbeitsvorschrift AAV6 unter N<sub>2</sub>-Bedingungen an das Peptid geknüpft. Nach der Acetylierung nicht umgesetzter Aminofunktionen ergab die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe eine noch verbleibende Stoffmenge von 13.1 µmol (AAV2/1) entsprechend einer Ausbeute dieses Kupplungsschrittes von 90%.

Die Kupplungen der restlichen Aminosäuren wurden am Peptidsynthesizer in gewohnter Weise durchgeführt. Es wurde dreimal mit einer Reaktionszeit von jeweils 120 min. gekuppelt. Die Deacetylierung der Hydroxyl-Gruppen des Zuckers wurde nach AAV7 durchgeführt. Die Fmoc-Wert Bestimmung ergab eine Ausbeute von 7 µmol entsprechend 54%. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC (AAV8) wurden 9 mg entsprechend einer Gesamtausbeute von 11% gereinigtes Produkt **32** erhalten.

#### Synthese des Fluorderivats (10a)

Das Peptid **10a** wurde vollautomatisch am Peptidsynthesizer in einem 50 µmol-Ansatz dargestellt. Es wurden im allgemeinen Dreifachkupplungen vorgenommen, wobei die Kupplungszeiten jeweils 30 min, 60 min und 90 min betrugen. Lediglich die Anknüpfung von 4-Fluorphenylalanin erfolgte über eine Zweifachkupplung mit jeweils 120 min Reaktionsdauer. Nach der Reinigung des Peptids mittels RP-HPLC (AAV8) wurden 15.9 mg gereinigtes Produkt **10a** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 29%.

#### Manuelle Synthese des 3er Peptids RYP (30)

Das 3er Peptid **30** wurde in einem 50 µmol Ansatz manuell synthetisiert. Es wurden jeweils Zweifach-Kupplungen durchgeführt, wobei die Reagenzien in den üblichen Überschüssen eingesetzt wurden. Die Reaktionsdauer des jeweils ersten Kupplungszyklus betrug ca. 4 h, die des zweiten 12 h. Freie, nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden *gecappt*. Vor jedem Kupplungszyklus wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, der Fmoc-Wert aber nicht bestimmt (AAV1/2/3). Die Abspaltung des Peptids vom Harz und der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mittels TFA (siehe AAV4). Nach der Aufreinigung des Peptids mittels RP-HPLC (AAV8) wurden 17.7 mg (41 µmol) entsprechend einer Gesamtausbeute von 82% erhalten.

#### Manuelle Synthese des Fluorderivats (9a)

Die Darstellung des Peptids **9a** erfolgte in einem 30 µmol-Ansatz analog zu der oben beschriebenen Synthese von **30**. Es wurden 15.6 mg (entsprechend einer Gesamtausbeute von 49% gereinigtes Produkt **9a** erhalten.

#### Manuelle Synthese des Fluorderivats (9b)

Das Peptid **9b** wurde in einem 30  $\mu$ mol-Ansatz analog zu der oben beschriebenen Synthese von **30** synthetisiert. Es wurden 15.1 mg gereinigtes Produkt **9b** erhalten, was einer Gesamtausbeute von 45% entspricht.

### 7.5 SPR-Experimente

#### Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip

Die SPR-Messungen erfolgten an einem *BIACORE 3000* Gerät mit einem CM5-Chip. Als Puffer diente der kommerziell erhältliche HEPES-P-Puffer, der jeweils vor Beginn der Messreihe über einen Zeitraum von 10 min entgast wurde.

Für die SPR-Studien wurde das Prionprotein rhPrP(23-231) der Firma *Calbiochem* immobilisiert. Dazu wurde der Chip über einen Zeitraum von 7 min bei einer Flussrate von 5  $\mu$ L/min mit einer frisch angesetzten Lösung aus 0.05 M NHS und 0.2 M EDC (1:1) aktiviert (Befehl: *Quickinject*). Zur Immobilisierung des Proteins wurde die handelsübliche PrP-Lösung von 5  $\mu$ g/mL (ca. 83  $\mu$ M) in 10 mM Acetatpuffer (pH 4,5) so verdünnt, dass eine 1  $\mu$ M Proteinlösung resultierte. Die Belegung des Chips erfolgte mit dem Befehl *Manual Inject* portionsweise in 1  $\mu$ L-Schritten auf der Messzelle oder wahlweise mit dem Befehl *Quickinject* mit 5  $\mu$ L bei einer Flussrate von 5  $\mu$ L/min. Nach Beendigung der Belegung wurden verbliebene, nicht belegte Carboxymethylgruppen der Mess- und Referenzzelle *gecappt*. Dazu wurden die Flusszellen für 7 min mit einer 1 M Ethanolamin-Lösung bei einer Flussrate von 5  $\mu$ L/min überströmt. Die Belegung des Chips wurde über die Differenzbildung der RU-Werte nach der Aktivierung mit NHS und EDC und nach dem *capping* mit Ethanolamin ermittelt.

Um zu überprüfen, ob die synthetisierten Peptide an dem globulären oder am flexiblen Teil des Prionproteins binden, wurde ein Chip (Chip 3) auf der Messzelle 2 mit rhPrP(23-231) und auf der Messzelle 3 mit dem Protein-Fragment rhPrP<sup>C</sup>(90-231) belegt. In der folgenden Tabelle sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chips mit ihren Belegungen aufgeführt:

|        | RU-Wert                                | Bindungsstellen [fmol ] | Durchgeführte Messungen   |
|--------|--|-------------------------|---|
| Chip 1 | 3427 <sup>1</sup>                      | 143                     | -Screening der Bibliothek   |
|        | 2758 <sup>2</sup>                      | 115                     | -Konzentrationsreihen von 1-3, 8-10 und 28  |
| Chip 2 | 3587                                   | 149                     | Konzentrationsreihen von 9a, 9b, 10a, 31 und 32   |
| Chip 3 | 6760 <sup>1</sup><br>2197 <sup>2</sup> | 280<br>129              | -Konzentrationsreihen von <b>29</b> und <b>30</b><br>-Vergleich zwischen den verschiedenen PrP-<br>Fragmenten PrP(23-231) und PrP(90-231) |

**Tabelle 17:** Chips und deren Belegungen. <sup>1</sup>Belegung der Flusszelle 2; <sup>2</sup>Belegung der Flusszelle 3.

#### **SPR-Messungen**

Für alle Messungen wurden die Peptidlösungen im jeweils für die Messungen verwendeten HEPES-P-Puffer hergestellt. Nicht lösliche Rückstände wurden über einen Zentrifugenfilter abfiltriert. Für jeden Messzyklus wurden die Peptidlösungen über einen Zeitraum von 5 min und einer Flussrate von 10  $\mu$ L/min mit dem Befehl *Quickinject* injeziert. Nach der Injektion wurde gewartet, bis die Basislinie wieder erreicht war.

Für das *screening* der Peptidbibliothek wurden von den Peptiden 500  $\mu$ M Lösungen hergestellt. Die Messungen erfolgten mit dem Chip 1 bei einer Belegung von 115 fmol. Die Konzentrationsreihen der Peptide 1, 2, 3, 8, 9, 10 und 28 wurden mit dem gleichen Chip durchgeführt. Vor der Messung wurde die Aktivität des Chips mit der Verbindung 10 bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M auf 48% der vorherigen Aktivität bestimmt. Die Konzentrationsreihen der Fluorderivate 9a, 9b und 10a sowie die des unglycosylierten Referenzpeptids 31 und des Glycopeptids 32 erfolgten mit dem Chip 2 bei einer Belegung 149 fmol. Die Untersuchungen der Peptide 29 und 30 hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber den Fragmenten PrP(23-231) und PrP(90-231) wurden mit dem Chip 3 vorgenommen. In der Tabelle 18 sind die Konzentrationen, die für die einzelnen Peptide vermessen wurden, zusammengestellt.

| Peptid | Konzentrationen [µM]   |
|--------|--|
| 1      | 50, 100, 250, 500  |
| 2      | 50, 100, 250, 500  |
| 3      | 20, 50, 100, 250, 500  |
| 8      | 10 <sup>1</sup> , 20 <sup>1</sup> , 50 <sup>1</sup> , 100 <sup>1</sup> , 250 <sup>1</sup>                    |
| 9      | 2, 5, 10, 20, 50, 100  |
| 9a     | 10 <sup>1</sup> , 20 <sup>1</sup> , 50 <sup>1</sup> , 100 <sup>1</sup> , 250 <sup>1</sup> , 400 <sup>1</sup> |
| 9b     | 100, 120, 175, 250 <sup>1</sup> , 375  |
| 10     | 20 <sup>1</sup> , 50 <sup>1</sup> , 100 <sup>1</sup> , 250 <sup>1</sup> , 500                                |
| 10a    | 50 <sup>1</sup> , 100 <sup>1</sup> , 250 <sup>1</sup> , 500  |
| 28     | 100, 250, 500  |
| 29     | 25 <sup>1</sup> , 50 <sup>1</sup> , 100 <sup>1</sup> , 150 <sup>1</sup> , 250, 500 <sup>1</sup>              |
| 30     | 150, 350, 500, 750, 1000 <sup>1</sup>  |
| 31     | 500 <sup>1</sup> , 750 <sup>1</sup> , 1000 <sup>1</sup> , 2000 <sup>1</sup>                                  |
| 32     | 10, 50 <sup>1</sup> , 100, 250 <sup>1</sup> , 500, 750, 1000, 1500   |

**Tabelle 18:** Peptide und die jeweils untersuchten Konzentrationen. <sup>1</sup>Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Da nach der Injektion der Peptide **9b** und **10a** die Basislinie auch nach längerer Wartezeit nicht wieder erreicht wurde, wurde die Chipoberfläche mit einer wässrigen Lösung aus 100 mM  $H_3PO_4$  regeneriert. 5 µL der Regenerationslösung wurden bei einer Flussrate von 10 µL/min mit dem Befehl *Quickinject* injeziert.

### 7.6 Aggregationsassays

#### 7.6.1 DLS-Messungen

Es wurden 5 mM Stammlösungen der zu untersuchenden Peptide in Acetat-Puffer (5 mM, pH 5) angesetzt und die Lösungen steril filtriert. Die DLS-Messungen erfolgten mit einem Probenvolumen von  $30 \ \mu$ L über einen Zeitraum von 20 - 40 s.

Für alle Messungen in Gegenwart des Proteins wurde die Proteinstammlösung zunächst über einen Zeitraum von 45 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert und die überstehende Lösung anschließend entnommen. Für alle Untersuchungen wurde das verkürzte Fragment rhPrP<sup>C</sup>(90-231) verwendet.

Die Selbstaggregation der Peptide wurde jeweils anhand einer 5 mM Peptidlösung untersucht.

In den Aggregations-Amplifikations-Tests, betrug die Konzentration des Protein 300  $\mu$ M. Das Peptid wurde äquimolar hinzugegeben, wobei das gesamte Probenvolumen 60  $\mu$ L betrug. Das Gemisch wurde bei 37 °C für 19 h inkubiert und anschließend vermessen.

Für die ersten Aggregations-Inhibitionsversuche wurde jeweils zu einer 300  $\mu$ molaren Proteinlösung äquimolar Peptid hinzugegeben (zu einem Probenvolumen von 60  $\mu$ L). Nach einer Preinkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurden dem Gemisch 15 - 20 mg Cu<sup>0</sup> zugesetzt und somit die Aggregation eingeleitet. Die Proben wurden erneut bei 37 °C über einen Zeitraum von 3 h inkubiert. Mit einer Proteinblindprobe wurde auf gleiche Weise verfahren. In zweiten Inhibitionsassay wurden zu einer 210  $\mu$ molaren Proteinlösung 7 eq Peptid

(Probenvolumen 60  $\mu$ L) gegeben und ansonsten die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt wie in den ersten Untersuchungen. Als zusätzliche Referenz diente eine Probe, in der zu dem Protein Peptid **9** im siebenfachen Überschuss gegeben, die Aggregation aber nicht durch Zugabe von Cu<sup>0</sup> eingeleitet wurde.

#### 7.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in den Aggregations-Amplifikations-Versuchen durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm jeweils vor und nach der Inkubationszeit. Für die Konzentrationsbestimmung nach der Inkubationszeit wurde die Probe über einen Zeitraum von 45 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert und 2 µL der überstehenden Lösung gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dabei nicht absolut bestimmt, sondern die erhaltenen Daten relativ zueinander in Beziehung gesetzt.

Die Proteinkonzentration nach den Aggregations-Inhibitions-Versuchen wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Dazu wurden die Proben wie gewohnt zentrifugiert und von den überstehenden Lösungen 5-, 10-, 20- und gegebenenfalls 40-fache Verdünnungen in H<sub>2</sub>O hergestellt. Zu jeweils 10  $\mu$ L Lösung wurden 300  $\mu$ L des Bradford-Reagenzes gegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die UV-Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Zuordnung der Proteinkonzentrationen erfolgte über Eichkurven von BSA und Lysozym. Aus den Konzentrationen, die sich auf diese Weise ergaben, wurde dann jeweils der Mittelwert gebildet.

### 7.7 NMR-Experimente

Alle NMR Proben wurden entsprechend der Arbeitsvorschrift AAV12 vorbereitet.

#### 7.7.1 STD-Experimente mit dem Prionprotein

Die STD-Bindungsstudien mit dem Prionprotein wurden im Acetat-Puffer pH 4.5 bei 305 K am 500 MHz-Spektrometer mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf durchgeführt. Die Ligandenkonzentration betrug jeweils 500  $\mu$ M, die des Proteins 5  $\mu$ M. Es wurde ein Probenvolumen von 250  $\mu$ L im 5 mm Shigemi-Röhrchen mit 8 mm Bodendicke vermessen.

Die Spektren der Prion Protein-Blindprobe zur Ermittlung der erreichten Sättigung wurden mit dem Pulsprogramm stdw52s2d.bc aufgenommen, das die Unterdrückung von zwei Lösungsmittelsignalen ermöglicht. Die Sättigung erfolgt dabei über eine Kaskade von Gausspulsen über einen Zeitraum von 4 s mit einer Abschwächung der Pulsleistung von 40 dB, wobei der Einstrahlpunkt der Sättigungspulse im Bereich von -0.1 bis -1 ppm variiert wurde. Die Wasserunterdrückung wird über eine DPFGSE-Pulssequenz (double pulsed field gradient spin echo) erzielt. Die Unterdrückung des Acetat-Signals erfolgt über einen zusätzlichen, selektiven 180° Puls in den Gradientenechos. Für den selektiven 180°-Impuls wurde eine Gaussfunktion verwendet, die beidseitig bei 20% der Amplitude trunkiert war. Der Puls wurde mit einer Dauer von 4 ms und mit einer Abschwächung der Pulsleitung von 42 dB eingestrahlt. Die Protein-Ligandproben wurden mit dem analogen Pulsprogramm stdw52ssl2d.bc vermessen. Die Unterdrückung der Proteinsignale wird hier über einen zusätzlichen T<sub>10</sub>-Filter erreicht. Der Spinlock-Puls wurde in den STD-Experimenten über einen Zeitraum von 15 ms bei einer Abschwächung der Pulsleistung von 20 dB eingestrahlt. Bei einer spektralen Weite von 10 - 14 Hz wurden 16k - 32k Datenpunkte aufgenommen. Die Daten wurden mit einer Linienverbreiterung von 1-3 Hz prozessiert. Die Bestimmung der absoluten STD% erfolgte durch den Vergleich des STD-Spektrums mit dem durch das Pseudo-2D-Experiment zugänglichen off-resonance Spektrum. Letzteres kann direkt als Referenzspektrum verwendet werden, da es unter exakt den gleichen Bedingungen wie das STD-Spektrum aufgenommen wurde.

#### <sup>19</sup>F{<sup>1</sup>H}-STD Experimente

Alle <sup>19</sup>F-NMR Spektren wurden mit dem <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F QNP-Probenkopf am 500 MHz Spektrometer bei 280 K aufgenommen. Das Probenvolumen war jeweils 550 µL. Die Experimente mit dem RCA<sub>120</sub> / Galactose-Testsystem 1 wurden in 10 mM PBS-Puffer, diejenigen mit dem BSA/Tryptophan-Testsystem 2 in 10 mM Tris-*d*<sub>11</sub>-Puffer durchgeführt. Die Sättigung der Proteinprotonen erfolgte wie gewohnt mit einer Kaskade von Gausspulsen, die mit einer Abschwächung der Pulsleistung von 40 dB im Testsystem 1 bei +0.2 ppm und im Testsystem 2 bei -1.1 ppm eingestrahlt wurden. Die Sättigungszeit betrug im allgemeinen 2 s. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten <sup>19</sup>F-Pulsprogramme (*stdsp\_SWITO\_2.bc*, *stdspfhig\_off\_3.bc*, *stdspfluor2d.bc*, *stdspfhig\_5\_2d.bc*, *zgflqn\_noe\_cpd.bc*) sind im Anhang aufgeführt.

#### NMR-spektroskopische Charakterisierung der synthetisierten Peptide

Die NMR-Spektren zur Charakterisierung der synthetisierten Peptide wurden wahlweise am 500 MHz-Spektrometer mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz Probenkopf oder am 700 MHz-Spektrometer mit einem 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit bzw. ohne Cryo-Technologie aufgenommen. Dazu wurden die Peptide in 550 - 600uL H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O im Verhältnis 9:1 aufgenommen, und der pH-Wert mit verdünnter TFA auf 3.5 - 4 eingestellt. Die Zuordnung der einzelnen Spinsysteme erfolgte mit einem 2D-TOCSY-Spektrum, das mit dem Standard-Pulsprogramm *mlevgpph19* akquiriert wurde. Die TOCSY-Mischzeit betrug dabei 115 ms. Für die sequenzielle Zuordnung wurde ein 2D-NOESY-Spektrum mit dem Pulsprogramm ngptp19v9.mm aufgenommen, das über den variablen delav v9 (5% der jeweiligen Mischzeit) eine effektive Nullquantenunterdrückung erzielt.. Die Wasserunterdrückung wurde durch die WATERGATE-Pulssequenz erreicht. Die 2D-Spektren wurden mit 256 Inkrementen in der F1-Dimension aufgenommen. Bei einer spektralen Weite von 10 - 14 ppm wurden 4k Datenpunkte pro Inkrement akkumuliert. Zur Prozessierung der Spektren wurde der FID mit einer um 30 -45° verschobenen, quadratischen Sinusfunktion multipliziert. Zur Integration wurde weiterhin ein 1D-<sup>1</sup>H-Presat-Spektrum mit dem Standard-Pulsprogramm zgpr aufgenommen, bei dem die Wasserunterdrückung durch eine Vorsättigung des Wasser erreicht wird.

### 7.8 Konformationsanalyse

#### 7.8.1 NOESY-Spektren und Berechungen der NOE-Aufbaukurven

Die NOESY-Spektren des unglycosylierten Referenzpeptids **31** und des Glycopeptids **32** wurden mit dem Pulsprogramm *ngptp19v9.mm* aufgenommen. Für beide Peptide wurden NOESY-Spektren bei den Mischzeiten 50, 100, 200, 400, 800 und 1200 ms bei 276 K am 700 MHz-Spektrometer mit inversem 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf ohne Cryo-Technologie aufgenommen. Die Konzentration des Referenzpeptids betrug 20 mM, die des Glycopeptids war 10 mM. Der pH-Wert beider Proben lag bei 4.

Zur Erstellung der NOE-Aufbauraten von **31** und **32** wurde das Programm AURELIA verwendet. Die Multiplettmaxima jedes auszuwertenden Kreuzsignale wurden in den sechs Spektren manuell gesetzt. Das *segmentation level* der Integration lag bei 0.7, d.h. nur die oberen 30% jedes NOE-Kreuzsignals wurden berücksichtigt. Die Feinheit der Segmentierung wurde von 30 auf 50 erhöht. Die Startwerte für den anschließenden doppeltexponentiellen Fit wurden auf p0 = 1.00, p1 = 0.1 und p2 = 2.0 gesetzt.

Die Berechnung der Protonendistanzen erfolgte aus den Anfangssteigungen der Aufbaukurven durch Vergleich mit dem Referenzprotonenpaar F198- $\beta/\beta'$ . Der Abstand dieser beiden  $\beta$ -Protonen wurde auf 1.8 Å festgelegt. Abstände, die sich aus Kreuzsignalen ergaben, die mehr als zwei Protonen zuzuordnen waren, wurden mit einem Korrekturfaktor (Tabelle 2) berichtigt. Es ergaben sich 42 interatomare Distanzen für das Referenzpeptid und 44 Interprotonenabstände für das Glycopeptid Tabelle 5 und Tabelle 6.

#### 7.8.2 Berechnung der φ-Winkel

Für die Berechnung der  $\phi$ -Winkel wurden für **31** und **32** 1D-<sup>1</sup>H-*Presat*-Spektren mit dem Standardpulsprogramm *zgpr* bei einer spektralen Weite von 10 ppm aufgenommen. Aus den Spektren wurden die <sup>3</sup>J<sub>NH,Hα</sub>-Kopplungskonstanten des Fragments T192-T201 ermittelt. Da die N-terminale Aminogruppe von T192 bedingt durch schnellen Austausch im Spektrum kein Signal aufwies, konnte für diese Aminosäure kein  $\phi$ -Winkel bestimmt werden. Mit dem Programm Excel wurden aus den Kopplungskonstanten über die Gleichung 9 Winkel berechnet, wobei sich für eine Kopplungskonstante bis zu vier Winkel ergaben. Der Vergleich der Winkel mit dem Ramachandran Plot ergab für jeden  $\phi$ -Winkel zwei mögliche Werte. Lediglich für G195, dessen NH-Proton im <sup>1</sup>H-presat-Spektrum ein Triplett zeigte, konnte ein  $\phi$ -Winkel von -167° für **31** und -163° für **32** eindeutig bestimmt werden.

#### 7.8.3 DG-Rechnungen

Die aus den NOE-Aufbauraten berechneten *distance range constraints* wurden dem Programm DYANA in Form von unteren und oberen Limits vorgegeben. Dazu wurde der für ein Protonenpaar bestimmte Abstand jeweils um 5% vergrößert (*upper limit*) bzw. um 5% vermindert (*lower limit*) (Tabelle 5 und Tabelle 6). Für Protonenpaare, zwischen denen keine NOE-Kontakte bestanden, wurden keine negativen *constraints* gesetzt, d.h. auch für diese Protonenpaare waren Abstände unterhalb von 5 Å erlaubt. Methylenprotonen wurden nicht stereospezifisch zugeordnet, weswegen die Abstände wie auch für Methylprotonen- und nicht dispergierte Methylenprotonen zu NMR-Pseudoatomen definiert wurden. Die Winkelbeschränkungen wurden in einem Bereich von  $\pm 15^{\circ}$  um den tatsächlich über die Kopplungskonstanten ermittelten Wert angegeben (Tabelle 7). Da eine Nomenklatur für die Zuckerprotonen im Programm nicht implementiert ist, wurden die Strukturen für das Glycopeptid ohne die Saccharid-Einheit gerechnet.

Es wurden jeweils 500 Strukturen unter Berücksichtigung der *distance* und der *dihedral angle constraints* berechnet. Aus diesen 500 Strukturen wurden jeweils die 100 besten ausgewählt und unter Verwendung der REDAC-Strategie erneut berechnet. Für beide Peptide wurden drei REDAC-Zyklen durchgeführt, welche jeweils 150, 400 und 800 Schritte beinhalteten. Im ersten Zyklus wurden dabei *redundant dihedral angle constraints* erzeugt, wenn die lokale Abweichung kleiner als 0.4 Å<sup>2</sup> war. Für die weiteren Zyklen wurden keine *redundant dihedral angle constraints* generiert. Mit dem Programm SYBYL wurden dann jeweils die zehn besten Strukturen übereinander gelegt, wobei die *Peptidbackbones* als Ausrichtungsachse dienten.

#### 7.8.4 Constrained MD-Simulation

Alle Moleküldynamik-Berechnungen wurden auf einer Octane-Workstation der Firma Silicon Graphics mit dem SYBYL-Softwarepaket von Tripos durchgeführt. Die DYANA-Strukturen, mit der jeweils kleinsten *target function* dienten als Startstrukturen für eine MD-Simulation. Im Falle des Glycopeptids wurde das Saccharid nachträglich manuell mit N197 so verknüpft, dass die *constraints* zwischen Peptid- und Saccharid-Einheit bestmöglich erfüllt waren.

Die bestehenden Atomtypen wurden überprüft und korrigiert. Weiterhin wurde der C-Terminus als Amid, der N-Terminus als NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppe, E196 und E200 als Glutamat und die Aminogruppe der Seitenkette von K194 als NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppe dargestellt. Anschließend wurden die Ladungen mit Hilfe der Methode, die von Gasteiger und Marsili beschrieben wurde, zugewiesen.<sup>138;139</sup> Die Strukturen wurden in 1000 Iterationsschritten im Vakuum energieminimiert, und anschließend in Wasser (wat) mit dem Silverware-Algorithmus

solvatisiert. Dabei wurde sichergestellt, dass die Wassermoleküle Ladungen trugen. Das gesamte System wurde jeweils in 1000 Iterationsschritten energieminimiert. Vor der eigentlichen *constrained* MD-Simulation wurden für beide Peptide zur Relaxation der Wasserbox kurze *constrained* MD-Rechnungen (20 ps bei 300 K) vorgeschaltet. Die Endstrukturen fungierten dann ihrerseits als Startstrukturen einer weiteren MD-Simulation über einen Zeitraum von 300 ps bei 300 K. Das Integrationsintervall wurde auf 1 fs gesetzt, und alle 100 fs wurden die charakteristischen Daten der Simulation aufgezeichnet (Druck, Temperatur, Dichte, Volumen, potentielle, kinetische und Gesamtenergie des Systems sowie Atomabstände und Torsionswinkel des Peptids).

Die Berechnungen erfolgten unter Berücksichtigung der gleichen *distance* und *angle constraints*, die schon für die DYANA-Berechnungen verwendet wurden. Die Abstände wurden dabei wie gewohnt als Bereich angegeben. Für die *torsion constraints* wurden Gleichgewichtswinkel eingesetzt. Das Strafpotential für die Abstandsbeschränkungen wurde auf 20 kcal/molÅ<sup>2</sup> gesetzt, das der Winkelbeschränkungen betrug 0.05 oder 0.1 kcal/mol[°]<sup>2</sup>. Die Anfangsgeschwindigkeiten waren nach Boltzmann gewichtet. Die Parameter der Simulation sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Abschließend wurden die Endstrukturen in 1000 Iterationsschritten im Vakuum energieminimiert.

| Tabelle 19: | Startwerte   | der | Molekulardynamik-Simulationen | und | Energien | der | jeweils | energie- |
|-------------|--------------|-----|-------------------------------|-----|----------|-----|---------|----------|
| minimierten | Endstrukture | en. |                               |     |          |     |         |          |

| Parameter  | MD des<br>Referenzpeptids | MD des<br>Glycopeptids |
|--|---------------------------|------------------------|
| Druck [atm]                                      | 8716                      | 7807                   |
| Temperatur [K]                                   | 308                       | 310                    |
| Dichte [g/ml]                                    | 1.34                      | 1.35                   |
| Volumen [Å <sup>3</sup> ]                        | 30124                     | 36422                  |
| Anzahl der Wassermoleküle                        | 1315                      | 1558                   |
| potentielle Energie [kcal/mol]                   | -22065                    | -26948                 |
| kinetische Energie [kcal/mol]                    | 3676                      | 4517                   |
| Gesamtenergie [kcal/mol]                         | -18389                    | -22432                 |
| Energie der minimierten Startstruktur [kcal/mol] | 44                        | 34                     |
| Energie der minimierten Endstruktur [kcal/mol]   | 20                        | 14                     |

# 7.9 Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

| Substanzname   | Gefahrensymbol     | R-Sätze                     | S-Sätze              |
|--|--------------------|-----------------------------|----------------------|
| Aceton   | F                  | 11                          | 9-16-23.2-33         |
| Acetonitril  | F, T               | 11-23/24/25                 | 16-27-45             |
| <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-<br>tetramethyluroniumtetrafluoro-<br>borat (TBTU) | Xi                 | 36/37/38                    | 26-36                |
| <i>tert</i> -Butylmethylether  | F                  | 11-66                       | 16-23.2-29-33        |
| Chloroform   | Xn                 | 22-38-40-<br>48/20/22       | 36/37                |
| α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure   | Xn                 | 20/21/22-<br>36/37/38       | 26-36                |
| Dichlormethan  | Xn                 | 40                          | 23.2-24/25/36/37     |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure   | -                  | -                           | 24/25                |
| <i>N</i> , <i>N</i> -Diisopropylethylamin  | F, C               | 11-22-34-52/53              | 16-26-36/37/39-45-61 |
| N,N-Dimethylformamid   | Т                  | 61-E20/21-36                | 53-45                |
| Dimethylsulfoxid   | Xi                 | 36/38                       | 26                   |
| Essigsäure   | С                  | 10-35                       | 23.2-26-45           |
| Essigsäureanhydrid   | С                  | 10-20/22-34                 | 26-36/37/39-45       |
| Ethanol  | F                  | 11                          | 7-16                 |
| Methanol   | F, T               | 11-23/24/25-<br>39/23/24/25 | 7-16-36/37-45        |
| Natriumazid  | T <sup>+</sup> , N | 28-32-50/53                 | 28.1-45-60-61        |
| Piperidin  | F, T               | 11-23/24-34                 | 16-26-27-45          |
| 2-Propanol   | F, Xi              | 11-36-67                    | (2-)7-16-24/25-26    |
| Salzsäure  | С                  | 34-37                       | 26-36/37/39-45       |
| Trifluoressigsäure   | С                  | 20-35-52/53                 | 9-26-27-28.1-45-61   |
| Triisopropylsilan  | Xi                 | 10-36/37/38                 | 26-36                |

### 7.10 Charakterisierung der Peptide

Die Charakterisierung der im Rahmen der Arbeit synthetisierten Verbindungen erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und NMR-spektroskopisch am 500 MHz-Spektrometer in  $H_2O/D_2O$  (9:1) bei den Peptiden, die sich als bindene Liganden des Prionproteins herausstellten.

#### Peptid 1: Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr; (V121-Y128)

 Molekulargewicht:
 719.39 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 720.60  $[M+H]^+$ 

**Tabelle 20:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **1** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Sonstige  |
|------|-------|-------|-------------|-------|---|
| V121 |       | 3.659 | 2.026       | 0.815 |   |
| V122 | 8.478 | 3.961 | 1.870       | 0.795 |   |
| G123 | 8.512 | 3.796 |             |       |   |
| G124 | 8.131 | 3.780 |             |       |   |
| L125 | 8.202 | 4.190 | 1.461       | 1.461 | Ηδ 0.724  |
| G126 | 8.409 | 3.741 |             |       |   |
| G127 | 8.052 | 3.687 |             |       |   |
| Y128 | 7.918 | 4.343 | 2.930/2.753 |       | Hδ 6.972; Hε 6.673; CONH <sub>2</sub> 7.423/6.970 |

#### Peptid 2: Leu-Gly-Gly-Tyr-Met-Leu-Gly-Ser; (L125-S132)

| Molekulargewicht:         | 795.38 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 796.60 [M+H] <sup>+</sup> |

**Tabelle 21:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **2** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ    | Ηγ    | Sonstige                      |
|------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|
| L125 |       | 4.681 | 1.621 | 1.621 | Ηδ 0.847                      |
| G126 | 8.653 | 3.909 |       |       |                               |
| G127 | 8.246 | 3.881 |       |       |                               |
| Y128 | 8.029 | 4.452 | 2.884 |       | Ηδ 7.017; Ηε 6.736            |
| M129 | 8.211 | 4.306 | 1.850 | 2.340 | Ηε 1.963                      |
| L130 | 8.063 | 4.213 | 1.535 | 1.535 | Ηδ 0.826                      |
| G131 | 8.358 | 3.880 |       |       |                               |
| S132 | 8.092 | 4.321 | 3.778 |       | CONH <sub>2</sub> 7.570/7.066 |

#### Peptid 3: Met-Leu-Gly-Ser-Ala-Met-Ser-Arg; (M129-R136)

| Molekulargewicht:         | 850.41 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 851.20 [M+H] <sup>+</sup> |

**Tabelle 22:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **3** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ    | Ηγ    | Sonstige  |
|------|-------|-------|-------|-------|---|
| M129 |       | 3.853 | 1.882 | 2.311 | Ηε 1.812  |
| L130 | 8.558 | 4.128 | 1.362 | 1.362 | Ηδ 0.626  |
| G131 | 8.443 | 3.691 |       |       |   |
| S132 | 8.048 | 4.154 | 3.592 |       |   |
| A133 | 8.305 | 4.018 | 1.118 |       |   |
| M134 | 8.106 | 4.155 | 1.753 | 2.296 | Ηε 1.807  |
| S135 | 8.080 | 4.130 | 3.581 |       |   |
| R136 | 8.182 | 4.020 | 1.611 | 1.420 | Hδ 2.923; Hε 6.951; CONH <sub>2</sub> 7.423 / 6.970 |

#### Peptid 8: Tyr-Tyr-Arg-Glu-Asn-Met-His-Arg; (Y149-R156)

 Molekulargewicht:
 1166.53 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 1168.00  $[M+H]^+$ 

**Tabelle 23:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **8** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Sonstige  |
|------|-------|-------|-------------|-------|---|
| Y149 |       | 3.872 | 2.817       |       | Ηδ 6.509; Ηε 6.804                                |
| Y150 | 8.358 | 4.225 | 2.595/2.679 |       | Ηδ 6.491; Ηε 6.787                                |
| R151 | 7.973 | 3.830 | 1.368       | 1.176 | Ηδ 2.845; Ηε 6.871                                |
| E152 | 8.075 | 3.816 | 1.681/1.592 | 2.135 |   |
| N153 | 8.375 | 4.308 | 2.506       |       | Ηδ 6.715/7.419                                    |
| M154 | 8.145 | 4.117 | 1.695/1.614 | 2.189 | Ηε 1.759  |
| H155 | 8.347 | 4.336 | 2.931       |       | Ηδ 8.325; Ηε 6.983                                |
| R156 | 8.191 | 3.984 | 1.456       | 1.342 | Hδ 2.899; Hε 6.942; CONH <sub>2</sub> 7.478/6.937 |

#### Peptid 9: Asn-Met-His-Arg-Tyr-Pro-Asn-Gln; (N153-Q160)

| Molekulargewicht:         | 1057.48 g/mol              |
|---------------------------|----------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1158.50 [M+H] <sup>+</sup> |

**Tabelle 24:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **9** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Sonstige                      |
|------|-------|-------|-------------|-------|-------------------------------|
| N153 |       | 4.023 | 2.653       |       | Ηδ 7.495/6.827                |
| M154 | 8.592 | 4.159 | 1.695       | 2.217 |                               |
| H155 | 8.444 | 4.269 | 2.791       |       | Ηδ 8.247; Ηε 6.696            |
| R156 | 8.134 | 3.994 | 1.342       | 1.156 | Ηδ 2.844; Ηε 6.896            |
| Y157 | 8.209 | 4.569 | 2.511/2.848 |       | Ηδ 6.909; Ηε 6.515            |
| P158 |       | 4.117 | 2.011       | 1.727 | Ηδ 3.559/3.445                |
| N159 | 8.382 | 4.349 | 2.544       |       | Ηδ 7.455/6.731                |
| Q160 | 8.110 | 3.996 | 1.697/1.860 | 2.079 | CONH <sub>2</sub> 7.336/6.650 |

#### Peptid 10: Tyr-Pro-Asn-Gln-Val-Tyr-Tyr-Arg; (Y157-R164)

 Molekulargewicht:
 1100.53 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 1101.94  $[M+H]^+$ 

**Tabelle 25:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **10** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ          | Sonstige   |
|------|-------|-------|-------------|-------------|--|
| Y157 |       | 4.242 | 2.766/2.934 |             | Ηδ 6.911; Ηε 6.575                                   |
| P158 |       | 4.172 | 2.035       | 1.703       | Ηδ 3.480/3.179                                       |
| N159 | 8.486 | 4.300 | 2.549       |             | Ηδ 7.431/6.736                                       |
| Q160 | 8.019 | 3.903 | 1.480/1.591 | 1.864       |  |
| V161 | 7.987 | 3.697 | 1.618       | 0.469/0.580 |  |
| Y162 | 8.088 | 4.245 | 2.604       |             | Ηδ 6.748; Ηε 6.462                                   |
| Y163 | 8.010 | 4.190 | 2.631       |             | Ηδ 6.802; Ηε 6.516                                   |
| R164 | 8.002 | 3.861 | 1.508       | 1.296       | Hδ 2.875; Hε 6.917;<br>CONH <sub>2</sub> 7.233/6.602 |
#### Peptid 28: Phe-Ser-Ser-Pro-Pro-Val-Ile-Leu; (F235-L242)

| Molekulargewicht:         | 857.49 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 858.80 [M+H] <sup>+</sup> |

**Tabelle 26:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **28** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ    | Ηγ          | Ηδ                                      |
|------|-------|-------|-------|-------------|---|
| F235 |       | 4.212 | 3.118 |             | Ηδ 7.289 Ηε,ζ 7.194                     |
| S236 | 8.493 | 4.441 | 3.702 |             |   |
| S237 | 8.317 | 3.798 | 3.680 |             |   |
| P238 |       | 4.587 | 1.953 | 1.798       | Ηδ 2.256                                |
| P239 |       | 4.332 | 1.897 | 1.738       | Ηδ 2.151                                |
| V240 | 8.136 | 3.944 | 1.893 | 0.825       |   |
| I241 | 8.224 | 4.071 | 1.744 | 1.365/1.069 | Ηδ 0.781                                |
| L242 | 8.304 | 4.247 | 1.561 | 1.478       | Hδ 0.798; CONH <sub>2</sub> 7.474/6.951 |

#### Peptid 9a: Asn-Met-His-Arg-4-F-Phe-Pro-Asn-Gln; (N153-Q160)

 Molekulargewicht:
 1059.50 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 1060.90  $[M+H]^+$ 

**Tabelle 27:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **9a** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|              | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Sonstige                      |
|--------------|-------|-------|-------------|-------|-------------------------------|
| N153         |       | 4.243 | 2.856       |       | Ηδ 7.623/6.969                |
| M154         | 8.703 | 4.371 | 1.909       | 2.438 |                               |
| H155         | 8.549 | 4.556 | 3.047       |       |                               |
| R156         | 8.230 | 4.195 | 1.575       | 1.403 | Ηδ 3.061; Ηε 7.077            |
| 4-F-F (Y157) | 8.339 | 4.828 | 2.804/3.120 |       | Ηδ 7.220; Ηε 6.987            |
| P158         |       | 4.347 | 2.222       | 1.950 | Ηδ 3.748/3.613                |
| N159         | 8.458 | 4.578 | 2.769       |       | Ηδ 7.565/6.864                |
| Q160         | 8.222 | 4.232 | 1.929/2.084 | 2.299 | CONH <sub>2</sub> 7.449/6.768 |

<sup>19</sup>F-chemische Verschiebung bei 470 MHz: 1.253 ppm (referenziert auf Trifluorethanol).

#### Peptid 9b: Asn-Met-His-Arg-4-CF<sub>3</sub>-Phe-Pro-Asn-Gln; (N153-Q160)

| Molekulargewicht:         | 1109.50 g/mol              |
|---------------------------|----------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1110.60 [M+H] <sup>+</sup> |

**Tabelle 28:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **9b** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7

|                             | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Sonstige                      |
|-----------------------------|-------|-------|-------------|-------|-------------------------------|
| N153                        |       | 4.243 | 2.866/2.868 |       | Ηδ 7.623/6.960                |
| M154                        | 8.700 | 4.370 | 1.909       | 2.436 |                               |
| H155                        | 8.517 | 4.528 | 3.023       |       |                               |
| R156                        | 8.237 | 4.175 | 1.379       | 1.559 | Ηδ 3.059; Ηε 7.072            |
| 4-CF <sub>3</sub> -F (Y157) | 8.414 | 4.919 | 2.905/3.220 |       | Ηδ 7.564; Ηε 7.408            |
| P158                        |       | 4.352 | 2.231       | 1.967 | Ηδ 3.755/3.648                |
| N159                        | 8.491 | 4.574 | 2.758       |       | Ηδ 7.566/6.861                |
| Q160                        | 8.213 | 4.243 | 1.919/2.074 | 2.290 | CONH <sub>2</sub> 7.446/6.765 |

<sup>19</sup>F-chemische Verschiebung bei 470 MHz: 1.131 ppm (referenziert auf Trifluorethanol).

#### Peptid 10a: 4-F-Phe-Pro-Asn-Gln-Val-4-F-Phe-4-F-Phe-Arg; (N157-Q164)

 Molekulargewicht:
 1106.50 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 1107.30  $[M+H]^+$ 

**Tabelle 29:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **10a** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|              | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ          | Sonstige   |
|--------------|-------|-------|-------------|-------------|--|
| 4-F-F (Y157) |       | 4.242 | 2.898/3.022 |             | Ηδ 7.139; Ηε 6.935                                   |
| P158         |       | 4.264 | 2.116       | 1.703/1.760 | Ηδ 3.563/3.222                                       |
| N159         | 8.494 | 4.430 | 2.633       |             | Ηδ 7.484/6.790                                       |
| Q160         | 8.165 | 4.074 | 1.671/1.744 | 2.008       |  |
| V161         | 8.027 | 3.806 | 1.733       | 0.569/0.672 |  |
| 4-F-F (Y162) | 8.194 | 4.372 | 2.767       |             | Ηδ 6.977; Ηε 6.821                                   |
| 4-F-F (Y163) | 8.118 | 4.313 | 2.789       |             | Ηδ 7.016; Ηε 6.878                                   |
| R164         | 8.085 | 3.961 | 1.588       | 1.382/1.444 | Hδ 2.984; Hε 7.017;<br>CONH <sub>2</sub> 7.335/6.703 |

<sup>19</sup>F-chemische Verschiebung bei 470 MHz: 1.119 ppm (referenziert auf Trifluorethanol).

#### Peptid 29: Tyr-Tyr-Arg-Glu Asn-Met-His-Arg-Tyr-Pro-Asn-Gln; (Y149-Q160)

| Molekulargewicht:         | 1668.74 g/mol              |
|---------------------------|----------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1669.90 [M+H] <sup>+</sup> |

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Ηδ                            |
|------|-------|-------|-------------|-------|-------------------------------|
| Y149 |       | 3.950 | 3.976       |       | Ηδ 6.842; Ηε 6.569            |
| Y150 | 8.374 | 4.293 | 2.691       |       | Ηδ 6.828; Ηε 6.551            |
| R151 | 8.006 | 3.909 | 1.402/1.501 | 1.226 | Ηδ 2.905; Ηε 6.915            |
| E152 | 8.100 | 3.901 | 1.636/1.753 | 2.179 |                               |
| N153 | 8.389 | 4.382 | 2.547       |       | Ηδ 7.436/6.748                |
| M154 | 8.142 | 4.155 | 1.655/1.771 | 2.243 |                               |
| H155 | 8.304 | 4.320 | 2.867       |       | Ηδ 8.298; Ηε 6.793            |
| R156 | 8.039 | 4.019 | 1.195       | 1.381 | Ηδ 2.867; Ηε 6.927            |
| Y157 | 8.157 | 4.624 | 2.554/2.887 |       | Ηδ 6.940; Ηε 6.560            |
| P158 |       | 4.159 | 2.052       | 1.785 | Ηδ 3.471/3.588                |
| N159 | 8.389 | 4.382 | 2.607       |       | Ηδ 7.444/6.751                |
| Q160 | 8.127 | 4.059 | 1.754/1.901 | 2.125 | CONH <sub>2</sub> 7.336/6.663 |

**Tabelle 30:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **29** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

#### Peptid 30: Arg-Tyr-Pro; (R156-P158)

 Molekulargewicht:
 433.24 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 434.60  $[M+H]^+$ 

Das Peptid **30** liegt als trans/cis- (**30a/30b**)-Isomerengemisch im Verhältnis 2.2/1 vor.

**Tabelle 31:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **30a** in ppm. Kalibriert wurde das Spektrum auf HDO bei 4.7.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Sonstige           |
|------|-------|-------|-------------|-------|--------------------|
| R156 |       | 3.735 | 1.331       | 1.626 | Ηδ 2.934; Ηε 6.977 |
| Y157 | 8.651 | 4.663 | 2.730/2.866 |       | Ηδ 6.984; Ηε 6.614 |
| P158 |       | 4.098 | 2.024       | 1.715 | Ηδ 3.609/3.257     |

 Tabelle 32: <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids 30b in ppm.

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Ηδ                 |
|------|-------|-------|-------------|-------|--------------------|
| R156 |       | 3.766 | 1.372       | 1.645 | Ηδ 2.962; Ηε 6.977 |
| Y157 | 8.595 | 4.366 | 2.651/2.768 |       | Ηδ 6.900; Ηε 6.626 |
| P158 |       | 3.395 | 1.636       | 1.479 | Ηδ 3.255/3.100     |

## Peptid 31: Thr-Thr-Lys-Gly-Glu-Asn-Phe-Thr-Glu-Thr; (T192-T201)

| Molekulargewicht:         | 1125.53 g/mol  |
|---------------------------|----------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1126.55 [M+H]⁺ |

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Ηδ                            |
|------|-------|-------|-------------|-------|-------------------------------|
| T192 |       | 3.832 | 3.637       | 0.956 |                               |
| T193 | 8.779 | 4.324 | 4.091       | 1.148 |                               |
| K194 | 8.643 | 4.203 | 1.718       | 1.356 | Ηδ 1.580; Ηε 2.889; Ηζ 7.521  |
| G195 | 8.596 | 3.875 |             |       |                               |
| E196 | 8.219 | 4.222 | 1.865       | 2.275 |                               |
| N197 | 8.533 | 4.609 | 2.619/2.703 |       | Ηδ 7.339/6.635                |
| F198 | 8.329 | 4.603 | 2.968/3.104 |       | Ηδ 7.265; Ηε,ζ 7.189          |
| T199 | 8.154 | 4.217 | 4.075       | 1.101 |                               |
| E200 | 8.444 | 4.363 | 1.951/2.098 | 2.440 |                               |
| T201 | 8.234 | 4.214 | 4.214       | 1.139 | CONH <sub>2</sub> 7.362/6.939 |

**Tabelle 33:** <sup>1</sup>H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids **31** in ppm, kalibiriert auf HDO bei 4.7.

# Peptid 32: Thr-Thr-Lys-Gly-Glu-Asn[β-D-GlcNAc-(1-4)-β-D-GlcNAc]-Phe-Thr-Glu-Thr; (T192-T201)

| (                         |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| Molekulargewicht:         | 1532.59 g/mol              |
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1533.70 [M+H] <sup>+</sup> |

| Tabelle 34: <sup>1</sup> H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids 32 in ppm, kalibriert auf HDO b | bei 4.7. |
|---|----------|
|---|----------|

|      | NH    | Ηα    | Ηβ          | Ηγ    | Ηδ                            |
|------|-------|-------|-------------|-------|-------------------------------|
| T192 |       | 4.113 | 3.934       | 1.240 |                               |
| T193 | 8.779 | 4.327 | 4.093       | 1.142 |                               |
| K194 | 8.631 | 4.205 | 1.708       | 1.339 | Ηδ 1.573; Ηε 2.880; Ηζ 7.517  |
| G195 | 8.579 | 3.877 |             |       |                               |
| E196 | 8.188 | 4.188 | 1.829       | 2.234 |                               |
| N197 | 8.575 | 4.619 | 2.607/2.744 |       |                               |
| F198 | 8.227 | 4.579 | 2.978/3.095 |       | Ηδ 7.179; Ηε,ζ 7.275          |
| T199 | 8.160 | 4.190 | 4.052       | 1.102 |                               |
| E200 | 8.430 | 4.328 | 1.943/2.081 | 2.411 |                               |
| T201 | 8.226 | 4.201 | 4.201       | 1.143 | CONH <sub>2</sub> 7.636/7.222 |

|        | NH    | NHAc  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6a    | 6b    |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GIcNAc | 8.672 | 8.255 | 4.932 | 3.778 | 3.587 | 3.656 | 3.452 | 3.730 | 3.566 |
| GIcNAc |       | 8.503 | 4.502 | 3.682 | 3.482 | 3.655 | 3.411 | 3.846 | 3.389 |

#### Peptid 4: Ala-Met-Ser-Arg-Pro-Ile-Ile-His; (A133-H140)

| Molekulargewicht:         | 922.51 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 923.51 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 5: Pro-Ile-Ile-His-Phe-Gly-Ser-Asp; (P137-D144)

 Molekulargewicht:
 883.45 g/mol 

 MALDI-TOF (m/z):
  $884.55 \text{ [M+H]}^+$ 

#### Peptid 7: Tyr-Glu-Asp-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Glu; (Y145-E152)

| Molekulargewicht:         | 1191.52 g/mol              |
|---------------------------|----------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1193.10 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 11: Val-Tyr-Tyr-Arg-Pro-Met-Asp-Glu; (V161-E168)

| Molekulargewicht:         | 1070.48 g/mol                 |
|---------------------------|-------------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1071.64.10 [M+H] <sup>†</sup> |

#### Peptid 12: Pro-Met-Asp-Glu-Tyr-Ser-Asn-Gln; (P165-Q172)

| Molekulargewicht:         | 980.38 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 981.38 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 13: Tyr-Ser-Asn-Gln-Asn-Asn-Phe-Val; (Y169-V176)

| Molekulargewicht:         | 983.44 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 984.73 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 14: Asn-Asn-Phe-Val-His-Asp-Ser-Val; (N173-H180)

 Molekulargewicht:
 929.44 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 930.34  $[M+H]^+$ 

#### Peptid 16: Ile-Thr-Ile-Lys-Glu-His-Thr-Val; (I182-H189)

| Molekulargewicht:         | 937.58 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 938.66 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 17: Glu-His-Thr-Val-Thr-Thr-Thr; (Q186-Thr193)

 Molekulargewicht:
 886.47 g/mol 

 MALDI-TOF (m/z):
  $887.70 \text{ [M+H]}^+$ 

#### Peptid 18: Thr-Thr-Thr-Lys-Gly-Glu-Asn; (T190-N197)

| Molekulargewicht:         | 849.43 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 850.60 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 19: Phe-Thr-Glu-Thr-Asp-Val-Lys-Met; (F198-M205)

| Molekulargewicht:         | 968.48 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 969.55 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 20: Asp-Val-Lys-Met-Met-Glu-Arg-Val; (D202-R209)

 Molekulargewicht:
 1005.52 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 1006.00  $[M+H]^+$ 

#### Peptid 21: Met-Glu-Arg-Val-Val-Glu-Gln-Met; (M206-M213)

| Molekulargewicht:         | 1019.49 g/mol |
|---------------------------|---------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1020.55 [M+H] |

#### Peptid 22: Val-Glu-Gln-Met-Ser-Ile-Thr-Gln; (V210-Q217)

| Molekulargewicht:         | 933.46 g/mol  |
|---------------------------|---------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 934.53 [M+H]⁺ |

#### Peptid 23: Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser; (T215-S222)

| Molekulargewicht:         | 933.46 g/mol              |
|---------------------------|---------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 934.53 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 24: Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr; (E219-Y226)

| Molekulargewicht:         | 1043.46 g/mol              |
|---------------------------|----------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m/z</i> ): | 1044.00 [M+H] <sup>+</sup> |

#### Peptid 25: GIn-Ala-Tyr-Tyr-Glu-Arg-Gly-Ser; (Q223-S230)

 Molekulargewicht:
 970.46 g/mol

 MALDI-TOF (m/z):
 971.80  $[M+H]^+$ 

#### Peptid 27: Ser-Met-Val-Leu-Phe-Ser-Ser-Pro; (S231-P238)

| Molekulargewicht:         | 865.43 g/mol             |
|---------------------------|--------------------------|
| MALDI-TOF ( <i>m</i> /z): | 866.8 [M+H] <sup>+</sup> |

### 8 ANHANG

#### 8.1 Syntheseprotokolle des Robotors Advanced

# ChemTech MOS 469 $\Omega$

In einem Hauptprogramm werden die unten aufgeführten Unterprogramme für den Ablauf der Synthese zusammengestellt. Die Darstelleung der Peptide **1-28** erfolgte nach folgenden Teilschritten:

- 1. Quellen des Harzes
- 2. Entschützung (Fmoc-Abspaltung)

- Entschutzung (Fmoc-Abspaltung)
   Waschen
   Kupplung
   Cappen
   Waschen
   Entschützung (Fmoc-Abspaltung)
   Waschen
   Abspaltung vom Harz und Abspalt
- 9. Abspaltung vom Harz und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Schritt 4. bis Schritt 8. wurden solange wiederholt, bis das komplette, gewünschte Peptid aufgebaut war. In einem Sequenz-File werden die Sequenzen der verschiedenen, zu synthetisierenden Peptide angegeben. Auf dieses Sequenz-File wird innerhalb des Unterprogramms "Kupplung" durch den Befehl "Dipense Matrix" zugegriffen.

#### Quellen

1 REM guellen 2

3 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 1000µl to Reaktionsblock[1-28]

4 Mix for 5.00 minutes at 600 rpm(s)

5 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

6

7 Dispense System Fluid ISOPROPANOL4 (4) 1000µLl to Reaktionsblock[1-28]

8 Mix for 5.00 minutes at 600 rpm(s)

9 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

10

11 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 1000µl to Reaktionsblock[1-28]

12 Mix for 5.00 minutes at 600 rpm(s)

13 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

14

15 Repeat from step 3, 1 times

16

17 Return

#### **Fmoc-Abspaltung**

1 REM Fmoc-Abspaltung

2

3 Transfer 1000µl from FlaschenLinks [1] (PIP/DMF) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2) 4 Mix for 10.00 minutes at 600 rpm(s)

5 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

6 Transfer 1000µl from FlaschenLinks [2] (PIP/DMF) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

- 7 Mix for 10.00 minutes at 600 rpm(s)
- 8 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

9

10 Return

Waschen

- 1 REM waschen
- 2
- 3 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 1000µl to Reaktionsblock[1-28]
- 4 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
- 5 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 6
- 7 Repeat from step 3, 4 times
- 8 Empty Reaktionsblock for 3.000 minute(s)
- 9 Return

#### Kupplung

1 REM 30 60 90

2

3 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 150µl to Reaktionsblock[1-28]

4<Dispense Matrix>

5 Transfer 1000µl from FlaschenMitte[3] (TBTU) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

6 Transfer 1000µl from Reagenzien[1] (DIPEA) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

7 Mix for 30.00 minutes at 600 rpm(s)

8 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

9 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 1500µl to Reaktionsblock[1-28]

10 Mix for 60 seconds at 600 rpm(s)

11 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)

12

13 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 150µl to Reaktionsblock[1-28]

14<Dispense Matrix>

15 Transfer 1000µl from FlaschenMitte[3] (TBTU) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

16 Transfer 1000µl from Reagenzien[2] (DIPEA) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

17 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)

18 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

19 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 1500µl to Reaktionsblock[1-28]

20 Mix for 60 seconds at 600 rpm(s)

21 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)

22

23 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 150µl to Reaktionsblock[1-28]

24<Dispense Matrix>

25 Transfer 1000µl from FlaschenMitte[3] (TBTU) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

26 Transfer 1000µl from Reagenzien[3] (DIPEA) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

27 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)

28 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

29 Dispense System Fluid DMF13\* (1,3) 1500µl to Reaktionsblock[1-28]

30 Mix for 60 seconds at 600 rpm(s)

31 Empty Reaktionsblock for 2.000 minute(s)

#### Capping

1 REM Capping

2

3 Transfer 1000µl from FlaschenMitte[1] (Ac2O) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

4 Mix for 5.00 minutes at 600 rpm(s)

5 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

6

7 Transfer 1000µl from FlaschenMitte[2] (Ac2O) to Reaktionsblock[1-28] using DMF2 (2)

8 Mix for 5.00 minutes at 600 rpm(s)

9 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

11

12 Return

#### Abspaltung des Peptids vom Harz und Entschützung der Aminosäureseitenketten 1 REM TFA-Abspaltung

2

4 Transfer 1500µl from Flaschenmitte[3](TFA) to Abspaltblock[1-28] using ISOPROPANOL4 (4)

5 Transfer 2.00ml from Reagenzien[4](TIPS) to Abspaltblock[1-28] using ISOPROPANOL4 (4)

6 Mix for 60 minutes at 600 rpm(s)

7 Empty Abspaltblock for 10.000 minute(s)

2

4 Transfer 1500µl from Flaschenmitte[3](TFA) to Abspaltblock[1-28] using ISOPROPANOL4 (4)

5 Transfer 2.00ml from Reagenzien[4](TIPS) to Abspaltblock[1-28] using ISOPROPANOL4 (4)

6 Mix for 60 minutes at 600 rpm(s)

7 Empty Abspaltblock for 10.000 minute(s)

# 8.2 NMR Pulsprogramme

### 8.2.1 Verwendete, bestehende Pulsprogramme

#### ngptp19v9.mm

;avance-version ;2D homonuclear correlation via dipolar coupling ;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange. ;phase sensitive using TPPI ;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients ;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992) ;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik \$ V. Saudek, J. Magn. Reson., ;Series A 102, 241 -245 (1993)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"d0=3u" "d12=20u" 1 ze 2 d1 3 d12 pl1:f1 p1 ph1 d0 p1 ph2 d8:r p1 ph3 d12 pl18:f1 50u UNBLKGRAD p16:gp1 d16 p28\*0.231 ph4 d19\*2 p28\*0.692 ph4 d19\*2 p28\*1.462 ph4 d19\*2 p28\*1.462 ph5 d19\*2 p28\*0.692 ph5 d19\*2 p0\*0.231 ph5 46u

p16:gp2 d16 4u BLKGRAD go=2 ph31 d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd lo to 3 times td1 exit ph1=0 2 ph2=000000022222222 ph3=0 0 2 2 3 3 1 1 ph4=0 ph5=2 ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate) ;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18 :use for fine adjustment ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse ;p16: homospoil/gradient pulse ;p28: f1 channel - 90 degree pulse at pl18 ;d0 : incremented delay (2D) [3 usec] ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d8 : mixing time with variable delay V9 ;d12: delay for power switching [20 usec] ;d16: delay for homospoil/gradient recovery ;d19: delay for binomial water suppression d19 = (1/(2\*d)), d = distance of next null (in Hz);in0: 1/(2 \* SW) = DW ;nd0: 2 ;NS: 8 \* n ;DS: 16 ;td1: number of experiments ;MC2: TPPI ;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 20: 20

#### w52sgp32.ro

;avance-version (03/11/2004)
;1D sequence
;water suppression using W5 pulse sequence with gradients
;using double echo (DPFGSE)
;second solvent (2s) suppression by shaped inversion pulse (p12)
;set O1 on first solvent resonance
;set spoffs2 to second solvent resonance (offset to O1, upfield = negative)
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
;Series A 102, 241 - 245 (1993)
;M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson & J. C. Lindon
;J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)
;gradient blanking according to bruker pulse program zgesgp
;long phase cycle (32 steps)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze 2 4u BLKGRAD d1 pl1:f1

p1 ph1 50u UNBLKGRAD p16:gp1 d16 pl0:f1 (p12:sp2 ph3:r):f1 20u pl18:f1 p27\*0.0867 ph3 d19\*2 p27\*0.2056 ph3 d19\*2 p27\*0.4133 ph3 d19\*2 p27\*0.7822 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph4 d19\*2 p27\*0.7822 ph4 d19\*2 p27\*0.4133 ph4 d19\*2 p27\*0.2056 ph4 d19\*2 p27\*0.0867 ph4 46u p16:gp1 d16 50u p16:gp2 d16 pl0:f1 (p12:sp2 ph5:r):f1 20u pl18:f1 p27\*0.0867 ph5 d19\*2 p27\*0.2056 ph5 d19\*2 p27\*0.4133 ph5 d19\*2 p27\*0.7822 ph5 d19\*2 p27\*1.4911 ph5 d19\*2 p27\*1.4911 ph6 d19\*2 p27\*0.7822 ph6 d19\*2 p27\*0.4133 ph6 d19\*2 p27\*0.2056 ph6 d19\*2 p27\*0.0867 ph6 46u p16:gp2 d16 go=2 ph31 wr #0 4u BLKGRAD exit

 $\begin{array}{c} ph1=\!0\ 2\ 0\ 2\$ 

ph4=2233001122330011223300112233001122330011 ph5=00000001111111122222222333333333 ;pl0: 120 dB ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl18: f1 channel - power level for w5-pulse (watergate) ;sp2: f1 - power level for shaped pulse (180 degree) ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p12: shaped inversion pulse (2-5ms) ;shape: gauss (trunc 20-40%), sine (1lobe) or sinc (1 lobe) ;p16: homospoil/gradient pulse (500-1000us) ;p27: 90 degree pulse at pl18 ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d16: delay for homospoil/gradient recovery (100-300us) ;d19: delay for binomial water suppression d19 = (1/(2\*d)), d = distance of next null (in Hz):NS: 32 \* n :DS: 16 ;use gradient ratio: gp 2 gp 1 34% 22% (c.f. zggpw5) 31% 11% (c.f. zgesgp) 7.5 G/cm 4.5 G/cm (e.g 20:12 or 30:18) 5.0 G/cm 3.5 G/cm (e.g 20:14 or 30:21) 1 ;;for z-only gradients: ;gpz1: 20% ;gpz2: 14% ;use gradient files: ;gpnam1: SINE.100 ;gpnam2: SINE.100

#### std19sp

;avance-version ;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list ;presaturation by shaped pulses ;frequency alternates after every scan, defined by fq1list ;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters ;define 1H on channel f2 in edasp

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze 2 20u pl1:f1 d7 fq1:f2 3 p11:sp1:f2 d11 lo to 3 times I7 p1 ph1 50u UNBLKGRAD p16:gp1 d16 pl18:f1 p28\*0.231 ph3 d19\*2 p28\*0.692 ph3 d19\*2 p28\*1.462 ph3 d19\*2 p28\*1.462 ph4 d19\*2

p28\*0.692 ph4 d19\*2 p0\*0.231 ph4 46u p16:gp2 d16 4u BLKGRAD go=2 ph31 wr #0 exit ph1=0 2 ph3=00112233 ph4=22330011 ph31=0 0 2 2 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB) ;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand ;;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18 ;use for fine adjustment ;p28: f1 channel - 90 degree pulse at pl18 ;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec) ;;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec] ;d11 : delay between shaped pulses [1msec] ;d16: delay for homospoil/gradient recovery ;d19: delay for binomial water suppression d19 = (1/(2\*d)), d = distance of next null (in Hz);d19 should be around 150-220 usec. ;presaturation = (p11 + d11) \* I7 (presaturation should be around 2 sec) ;fg1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) ;on frequency list f1. ;NS = 16\*n ;DS = 16 ;use gradient ratio gp1 : gp2 20 20

#### 8.2.2 Im Verlauf der Arbeit geschriebene oder variierte Pulsprogramme

#### t1irw5gp\_2.bc

;avance-version (04/11/11) ;T1 measurement using inversion recovery ;and w5 water suppression.

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"p2=p1\*2" "d11=30m" 1 ze 2 d1 30u pl1:f1 p2 ph1 vd p1 ph2

p16:gp1 d16 pl18:f1 p27\*0.0867 ph3 d19\*2 p27\*0.2056 ph3 d19\*2 p27\*0.4133 ph3 d19\*2 p27\*0.7822 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph4 d19\*2 p27\*0.7822 ph4 d19\*2 p27\*0.4133 ph4 d19\*2 p27\*0.2056 ph4 d19\*2 p0\*0.0867 ph4 46u p16:gp1 d16 4u BLKGRAD go=2 ph31 d11 wr #0 if #0 ivd lo to 1 times td1 exit ph1=0 2 ph2=0 0 2 2 ph3=0 0 1 1 ph4=2 2 3 3 ph31=0 0 0 0 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) :pl18 : power level for water supression ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;d19 : delay for binominal water supression ;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d11: delay for disk I/O [30 msec] ;vd : variable delay, taken from vd-list ;NS: 8 \* n :DS: 4 ;td1: number of experiments = number of delays in vd-list ;define VDLIST ; this pulse program produces a ser-file (PARMOD = 2D) ;\$Id: t1ir,v 1.2.6.5 2000/05/08 14:09:17 eng Exp \$

#### stdw5slsp2d.bc

;avance-version ;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list ;presaturation by shaped pulses ;frequency alternates after every scan, defined by fq1list ;spin lock for protein suppression ;using different memory buffers for on- and off-resonance irradiation ;water suppression by watergate, use w5 to optimize parameters ;define 1H on channel f2 in edasp

50u UNBLKGRAD

#include <Avance.incl> #include <Grad.incl> 1 ze 10u st0 2 20u pl1:f1 d7 fq1:f2 st 3 p11:sp1:f2 d11 lo to 3 times I7 p1 ph1 20u pl10:f1 p10 ph2 50u UNBLKGRAD p16:gp1 d16 pl18:f1 p27\*0.0867 ph3 d19\*2 p27\*0.2056 ph3 d19\*2 p27\*0.4133 ph3 d19\*2 p27\*0.7822 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph4 d19\*2 p27\*0.7822 ph4 d19\*2 p27\*0.4133 ph4 d19\*2 p27\*0.2056 ph4 d19\*2 p0\*0.0867 ph4 46u p16:gp1 d16 4u BLKGRAD go=2 ph31 30m wr #0 if #0 exit ph1=0 2 ph2=1 3 ph3=00112233 ph4=22330011 ph31=0 0 2 2 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB) ;pl10: f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB) ;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18 ;use for fine adjustment ;p28: f1 channel - 90 degree pulse at pl18 ;p10: f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)

;p11: f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)

;d1: relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d7: additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec] ;d11: delay between shaped pulses [1msec] ;d16: delay for homospoil/gradient recovery ;d19: delay for binomial water suppression d19 = (1/(2\*d)), d = distance of next null (in Hz);d19 should be around 150-220 usec. ;presaturation = (p11 + d11) \* I7 (presaturation should be around 2 sec) ;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) ;on frequency list f1. ;NBL = number of memory buffers with TD size = 2 for two irradiation frequencies :td1 = NBL = 2; this pulse program produces a ser file (PARMOD = 2D) ;NS" = NS+DS" :DS'' = DS/2;use gradient ratio gp1 : gp2 20 20

Das entsprechende Pulsprogramm *stdw5sp2d.bc* unterscheidet sich von dem oben aufgeführten Sequenz nur dadurch, dass der Spinlock-Puls aus der obigen Pulssequenz entfernt wurde. Es fehlen also die Zeilen "20u pl10:f1", "p10 ph2" und dementsprechend die Phase "ph2".

stdw52ssl2d.bc ;avance-version (15/02/2005) ;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list presaturation by shaped pulses ;frequency alternates after every scan, defined by fq1list ;spin lock for protein suppression ;using different memory buffers for on- and off-resonance irradiation ;water suppression using W5 pulse sequence with gradients ;using double echo (DPFGSE) ;second solvent (2s) suppression by shaped inversion pulse (p12) :set O1 on first solvent resonance ;set spoffs2 to second solvent resonance (offset to O1, upfield = negative) ;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992) ;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., ;Series A 102, 241 - 245 (1993) ;M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson & J. C. Lindon ;J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998) ;gradient blanking according to bruker pulse program zgesgp ;randomization of p12 (... :r) according to bruker pulse program zgesgp (v9=5% ?) ;long phase cycle (32 steps) #include <Avance.incl> #include <Grad.incl> 1 ze 10u st0 2 4u BLKGRAD 20u pl1:f1 d7 fq1:f2 st 3 p11:sp1:f2 d11

lo to 3 times 17

50u UNBLKGRAD

p1 ph1 20u pl10:f1 p10 ph2

p16:gp1 d16 pl0:f1

(p12:sp2 ph3:r):f1 20u pl18:f1 p27\*0.0867 ph3 d19\*2 p27\*0.2056 ph3 d19\*2 p27\*0.4133 ph3 d19\*2 p27\*0.7822 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph3 d19\*2 p27\*1.4911 ph4 d19\*2 p27\*0.7822 ph4 d19\*2 p27\*0.4133 ph4 d19\*2 p27\*0.2056 ph4 d19\*2 p27\*0.0867 ph4 46u p16:gp1 d16 50u p16:gp2 d16 pl0:f1 (p12:sp2 ph5:r):f1 20u pl18:f1 p27\*0.0867 ph5 d19\*2 p27\*0.2056 ph5 d19\*2 p27\*0.4133 ph5 d19\*2 p27\*0.7822 ph5 d19\*2 p27\*1.4911 ph5 d19\*2 p27\*1.4911 ph6 d19\*2 p27\*0.7822 ph6 d19\*2 p27\*0.4133 ph6 d19\*2 p27\*0.2056 ph6 d19\*2 p27\*0.0867 ph6 46u p16:gp2 d16 go=2 ph31 30m wr #0 if #0 4u BLKGRAD exit ph2=1 3 ph3=0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 ph4=2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1 2 2 3 3 0 0 1 1

;pl0: 120 dB ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl10: f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB) ;pl18: f1 channel - power level for w5-pulse (watergate) ;sp2: f1 - power level for shaped pulse (180 degree) ;p1: f1 channel - 90 degree high power pulse ;p10: f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein) ;p12: shaped inversion pulse (2-5ms) ;shape for second solvent supression: gauss (trunc 20-40%), sine (1lobe) or sinc (1 lobe) ;p16: homospoil/gradient pulse (500-1000us) ;p27: 90 degree pulse at pl18 ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d16: delay for homospoil/gradient recovery (100-300us) ;d19: delay for binomial water suppression d19 = (1/(2\*d)), d = distance of next null (in Hz);presaturation = (p11 + d11) \* I7 (presaturation should be around 2 sec) :fg1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) ;on frequency list f1. ;NBL = number of memory buffers with TD size = 2 for two irradiation frequencies ;td1 = NBL = 2 ; this pulse program produces a ser file (PARMOD = 2D) ;NS" = NS+DS" ;DS" = DS/2 ;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 34% 22% (c.f. zggpw5) 2 31% 11% (c.f. zgesgp) 1 7.5 G/cm 4.5 G/cm (e.g 20:12 or 30:18) : 5.0 G/cm 3.5 G/cm (e.g 20:14 or 30:21) : ;for z-only gradients: ;gpz1: 20% ;gpz2: 14% ;use gradient files: ;gpnam1: SINE.100 ;gpnam2: SINE.100

Das entsprechende Pulsprogramm *stdw5sp2d.bc* unterscheidet sich von dem oben aufgeführten Sequenz nur dadurch, dass der Spinlock-Puls aus der obigen Pulssequenz entfernt wurde. Es fehlen also die Zeilen "20u pl10:f1", "p10 ph2" und dementsprechend die Phase "ph2".

### <sup>19</sup>F-Pulsprogramme

stdsp\_SWITO\_2.bc
;avance-version
;19F-observe
;for QNP-operation (F-19 via X-QNP output of switchbox)
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list
;define 1H on channel f2 in edasp

#include <Avance.incl>

"d12=30m" "d13=20u" 30m QNP X 1 ze 20u pl1:f1 2 d7 fq1:f2 20u SWITO H 3 p11:sp1:f2 d11 lo to 3 times I7 20u SWITO\_F p1 ph1 go=2 ph31 wr #0 exit ph1=0220133120023113 ph31=0022113322003311 ;pl1: f1 channel - power level for pulse (default) ;sp1: f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 40 - 50 dB depending on protein and ligand ;p1: f1 channel - 90 degree high power pulse ;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec) ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec] ;d11 : delay between shaped pulses [1msec] ;d12 : switching delay [20u] ;presaturation = (p11 + d11) \* I7 (presaturation should be around 2 sec) ;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) ;on frequency list f1. :NS = 16\*n ;DS = 16

#### stdspfhig\_off\_3.bc

;avance-version ;19F-observe ;for QNP-operation (F-19 via X-QNP output of switchbox) ;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list ;presaturation by shaped pulses ;set frequency off-resonance in frequency list ;define 1H on channel f2 and f3 in edasp ;1H inversed gated decoupling on f3

#include <Avance.incl>

30m QNP\_X 1 ze 20u pl1:f1 2 d11 do:f3 d7 fq1:f2 3 20u SWITO H p11:sp1:f2 d11 lo to 3 times I7 20u SWITO\_F p1 ph1 20u SWITO H d11 pl12:f3 go=2 ph31 cpd2:f3 wr #0 d11 do:f3 exit ph1=0220133120023113 ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec) ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec] ;d11 : delay between shaped pulses [1msec] ;d12 : switching delay [20u] ;presaturation = (p11 + d11) \* I7 (presaturation should be around 2 sec) ;fq1 : define frequencies for off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) :on frequency list f1. ;cpd2: use garp-sequence for inverse gated decoupling ;NS = 16\*n ;DS = 16

Das entsprechende Pulsprogramm für den *on-resonance* Fall unterscheidet sich von dem *stdspfhig\_off\_3.bc* nur durch den Phasenzyklus. Im Pulsprogramm *stdspfhig\_on\_3.bc* sind *ph1* und *ph31* zueinander um 180° verschoben, so dass es im Verlgeich zu *stdspfhig\_off\_3.bc* das entgegengesetzte Vorzeichen erzeugt.

#### stdspfluor2d.bc

;avance-version ;19F-observe ;for QNP-operation (F-19 via X-QNP output of switchbox) ;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list ;presaturation by shaped pulses ;frequency alternates after every scan, defined by fq1list ;using different memory buffers for on- and off-resonance irradiation ;define 1H on channel f2 in edasp

#include <Avance.incl>

30m QNP\_X 1 ze 10u st0 20u pl1:f1 2 d7 fq1:f2 st 20u SWITO\_H 3 p11:sp1:f2 d11 lo to 3 times 17 20u SWITO F p1 ph1 go=2 ph31 30m wr #0 if #0 exit ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3 ph31=0022113322003311 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand :p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec) ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec] ;d11 : delay between shaped pulses [1msec] ;d12 : switching delay [20u] ;presaturation = (p11 + d11) \* I7 (presaturation should be around 2 sec) ;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) ;on frequency list f1. ;NBL = number of memory buffers with TD size = 2 for two irradiation frequencies ;td1 = NBL = 2 ;this pulse program produces a ser file (PARMOD = 2D) ;NS" = NS+DS" ;DS" = DS/2

#### stdspfhig\_5\_2d.bc

;avance-version ;19F-observe ;for QNP-operation (F-19 via X-QNP output of switchbox) ;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list ;presaturation by shaped pulses ;frequency alternates after every scan, defined by fq1list ;using different memory buffers for on- and off-resonance irradiation ;1H inversed gated decoupling on f3 ;define 1H on channel f2 and f3 in edasp

#include <Avance.incl>

"d12=30m"

30m QNP\_X 1 ze 10u st0 20u pl1:f1 d12 pl12:f3 2 d12 do:f3 d7 fq1:f2 st 3 p11:sp1:f2 d11 lo to 3 times l7 20u SWITO\_F p1 ph1 20u SWITO H

go=2 ph31 cpd2:f3 30m wr #0 if #0 d12 do:f3 exit ph1=0220133120023113 ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec) ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 ;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec] ;d11 : delay between shaped pulses [1msec] ;d12 : switching delay [20u] ; presaturation = (p11 + d11) \* 17 (presaturation should be around 2 sec) ;fg1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ) ;on frequency list f1 ;cpd2: use garp-sequence for inverse gated decoupling ;NBL = number of memory buffers with TD size = 2 for two irradiation frequencies ;td1 = NBL = 2 ;this pulse program produces a ser file (PARMOD = 2D) ;NS" = NS+DS" ;DS" = DS/2 zgflqn\_noe\_cpd.bc ;avance-version (00/02/07) ;1D sequence for F-19 observe :H-1 gated decoupling ;for QNP-operation (F-19 via X-QNP output of switchbox) ;define 1H on channel f2 in edasp #include <Avance.incl> 10m QNP X

1 ze 20u pl14:f2 2 d1 20u SWITO H d20 cpd2:f2 3u do:f2 20u SWITO\_F p1 ph1 go=2 ph31 wr #0 exit ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl14 : f2 channel - power level for cw decoupling ;p1 : f1 channel - high power pulse ;d1 : relaxation delay; 1-5 \* T1 :d20 : irradiation time ;\$Id: zgflqn,v 1.1.8.5 2000/05/08 14:09:29 eng Exp \$

# 9 LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Prusiner, S. B. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 13363-83, 1998.
- 2. Goodfield, J. Cannibalism and kuru. Nature, 387: 841, 1997.
- 3. Ironside, J. W. Prion diseases in man. J Pathol, 186: 227-34, 1998.
- 4. Porter, D. D., Porter, H. G. and Cox, N. A. Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. J Immunol, *111*: 1407-10, 1973.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. and Smith, P. G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet, 347: 921-5, 1996.
- 6. Department of Health: http://www.dh.gov.uk
- 7. World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/eng/info/en\_esb.htm
- Soto, C. and Castilla, J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. Nat Med, *10* 63-7, 2004.
- 9. Mestel, R. Putting prions to the test. Science, 273: 184-9, 1996.
- 10. Narang, H. A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. Exp Biol Med, 227: 4-19, 2002.
- 11. Griffith, J. S. Self-replication and scrapie. Nature, 215: 1043-4, 1967.
- 12. Cho, H. J. Is the scrapie agent a virus? Nature, 262: 411-2, 1976.
- 13. Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. and Clarke, M. C. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature, *214*: 764-6, 1967.
- 14. Alper, T., Haig, D. A. and Clarke, M. C. The exceptionally small size of the scrapie agent. Biochem Biophys Res Commun, 22: 278-84, 1966.
- 15. Bolton, D. C., McKinley, M. P. and Prusiner, S. B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. Science, *218*: 1309-11, 1982.
- Enari, M., Flechsig, E. and Weissmann, C. Scrapie prion protein accumulation by scrapieinfected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. Proc Natl Acad Sci U S A, 98: 9295-9, 2001.
- Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. and Prusiner, S. B. Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. Proc Natl Acad Sci U S A, 85: 6617-21, 1988.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R. and Prusiner, S. B. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature, *412*: 739-43, 2001.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B. and Hood, L. E. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell, *40*: 735-46, 1985.

- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L. and Keith, J. M. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. Nature, *315*: 331-3, 1985.
- 21. Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. and DeArmond, S. J. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. Am J Pathol, *122*: 1-5, 1986.
- 22. Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. and Oesch, B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. Neuron, *14*: 509-17, 1995.
- Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. and Bendheim, P. E. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. Cell, *61*: 185-92, 1990.
- 24. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell, *73*: 1339-47, 1993.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. and Weissmann, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature, *356*: 577-82, 1992.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. Cell, 77: 967-8, 1994.
- Tahiri-Alaoui, A., Gill, A. C., Disterer, P. and James, W. Methionine 129 variant of human prion protein oligomerizes more rapidly than the valine 129 variant: implications for disease susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease. J Biol Chem, 279: 31390-7, 2004.
- Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K. and Yee, V. C. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. Nat Struct Biol, 8: 770-4, 2001.
- 29. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G. and Wuthrich, K. NMR solution structure of the human prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A, *97*: 145-50, 2000.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J. and Cohen, F. E. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, *90*: 10962-6, 1993.
- 31. Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. and Cohen, F. E. Prion protein biology. Cell, 93: 337-48, 1998.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell, *83*: 79-90, 1995.
- 33. Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell, 73: 1055-8, 1993.
- 34. Aguzzi, A. and Heppner, F. L. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. Cell Death Differ, 7: 889-902, 2000.

- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. Nat Med, *4*: 1157-65, 1998.
- 36. Caughey, B., Raymond, G. J. and Bessen, R. A. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. J Biol Chem, *273*: 32230-5, 1998.
- Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T. and Caughey, B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. Nature, *375*: 698-700, 1995.
- 38. Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. and Caughey, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. Nature, *370*: 471-4, 1994.
- 39. Hill, A. F., Antoniou, M. and Collinge, J. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. J Gen Virol, *80*: 11-4, 1999.
- 40. Saborio, G. P., Permanne, B. and Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature, *411*: 810-3, 2001.
- 41. Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. and Soto, C. In vitro generation of infectious scrapie prions. Cell, *121*: 195-206, 2005.
- 42. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. and Prusiner, S. B. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell, *51*: 229-40, 1987.
- 43. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). Nature, *382*: 180-2, 1996.
- 44. Horwich, A. L. and Weissman, J. S. Deadly conformations-protein misfolding in prion disease. Cell, 89: 499-510, 1997.
- Aronoff-Spencer, E., Burns, C. S., Avdievich, N. I., Gerfen, G. J., Peisach, J., Antholine, W. E., Ball, H. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. and Millhauser, G. L. Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. Biochemistry, *39*: 13760-71, 2000.
- Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E. and Dyson, H. J. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 2042-7, 1999.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature, *390*: 684-7, 1997.
- 48. Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. and Jones, I. M. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. Biochem J, *344*: 1-5, 1999.
- 49. Pauly, P. C. and Harris, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. J Biol Chem, 273: 33107-10, 1998.
- 50. Calzolai, L. and Zahn, R. Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. J Biol Chem, *278*: 35592-6, 2003.
- 51. Apetri, A. C. and Surewicz, W. K. Atypical effect of salts on the thermodynamic stability of human prion protein. J Biol Chem, *278*: 22187-92, 2003.

- 52. Redecke, L., Bergen, M., Clos, J., Konarev, P. V., Svergun, D. I., Meyer-Klaucke, W., Fittschen, U. E., Broekaert, A. C., Bruns, O., Georgieva, D., Genov, N. and Betzel, C. Structural characterization of β-sheeted oligomers formed by metal-induced oxidation of human prion protein. submitted.
- 53. Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem, *272*: 20313-6, 1997.
- 54. Shiraishi, N., Inai, Y., Bi, W. and Nishikimi, M. Fragmentation and dimerization of copperloaded prion protein by copper-catalysed oxidation. Biochem J, 387: 247-55, 2005.
- Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertle, T. and Grosclaude, J. Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. J Mol Biol, *347*: 665-79, 2005.
- 56. Torrent, J., Alvarez-Martinez, M. T., Heitz, F., Liautard, J. P., Balny, C. and Lange, R. Alternative prion structural changes revealed by high pressure. Biochemistry, *42*: 1318-25, 2003.
- 57. Xiong, L. W., Raymond, L. D., Hayes, S. F., Raymond, G. J. and Caughey, B. Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. J Neurochem, *79*: 669-78, 2001.
- 58. Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. and Kobata, A. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. Biochemistry, *28*: 8380-8, 1989.
- 59. Stimson, E., Hope, J., Chong, A. and Burlingame, A. L. Site-specific characterization of the Nlinked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/ electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. Biochemistry, *38*: 4885-95, 1999.
- 60. Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. and Dwek, R. A. Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. Biochemistry, *40*: 3759-66, 2001.
- 61. Wormald, M. R. and Dwek, R. A. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. Structure Fold Des, 7: 155-60, 1999.
- 62. Korth, C., Kaneko, K. and Prusiner, S. B. Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(Sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. J Gen Virol, *81*: 2555-63, 2000.
- 63. Zuegg, J. and Gready, J. E. Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. Glycobiology, *10*: 959-74, 2000.
- 64. Bosques, C. J. and Imperiali, B. The interplay of glycosylation and disulfide formation influences fibrillization in a prion protein fragment. Proc Natl Acad Sci U S A, *100*: 7593-8, 2003.
- 65. Farquhar, C., Dickinson, A. and Bruce, M. Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. Lancet, *353*: 117, 1999.
- 66. Caughey, W. S., Raymond, L. D., Horiuchi, M. and Caughey, B. Inhibition of proteaseresistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 12117-22, 1998.

- 67. Priola, S. A., Raines, A. and Caughey, W. S. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. Science, 287: 1503-6, 2000.
- Soto, C., Kascsak, R. J., Saborio, G. P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kascsak, R., Mendez, E., Harris, D. A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R. I. and Frangione, B. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. Lancet, *355*: 192-7, 2000.
- 69. Chabry, J., Caughey, B. and Chesebro, B. Specific inhibition of in vitro formation of proteaseresistant prion protein by synthetic peptides. J Biol Chem, 273: 13203-7, 1998.
- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L. W. and Caughey, B. Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. J Biol Chem, 276: 15489-97, 2001.
- 71. Ettaiche, M., Pichot, R., Vincent, J. P. and Chabry, J. In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126. J Biol Chem, *275*: 36487-90, 2000.
- 72. Adessi, C., Halazy, S., Saborio, G. and Soto-Jara, C. Prion-inhibiting peptides and derivatives thereof for the treatment of transmissible spongiform encephalopathies. PCT Int Appl, 2003.
- 73. Sklaviadis, T., Panagiotides, C., Paspaltsis, J. and Karageorgis, B. Prion protein-binding peptides, and therapeutic and diagnostic use. PCT Int Appl, 2004.
- 74. Soto-Jara, C., Baumann, M. H. and Frangione, B. Peptides and pharmaceutical compositions thereof for treatment of disorders or diseases associated with abnormal protein folding into amyloid or amyloid-like deposits. U S, 2002.
- 75. Soto-Jara, C. Peptide analogs and mimetics suitable for in vivo use in the treatment of diseases associated with abnormal protein folding into amyloid, amyloid-like deposits or b-sheet rich pathological precursor thereof. PCT Int Appl, 2001.
- Chesebro, B. W., Caughey, B. W., Chabry, J. and Priola, S. Sequences of peptide inhibitors for formation of protease resistant prion proteins associated with transmissible spongiform encephalopathies. U S, 2001.
- 77. Prusiner, S. B., Kaneko, K. and Cohen, F. E. Prion protein peptides PrP and assays for PrPSc and inhibitors of PrPSc formation. PCT Int Appl, 1997.
- 78. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev, *46*: 3-26, 2001.
- 79. Maienfisch, P. and Hall, R. G. The importance of fluorine in the life science industry. Chimia, *58*: 93-9, 2004.
- 80. Park, B. K., Kitteringham, N. R. and O'Neill, P. M. Metabolism of fluorine-containing drugs. Annu Rev Pharmacol Toxicol, *41*: 443-70, 2001.
- 81. Meyer, B. and Peters, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. Angew Chem Int Ed Engl, *42*: 864-90, 2003.
- 82. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. and Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. Science, *274*: 1531-4, 1996.

- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. and Wuthrich, K. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. Proc Natl Acad Sci U S A, 94: 12366-71, 1997.
- Hajduk, P. J., Augeri, D. J., Mack, J., Mendoza, R., Yang, J., Betz, S. F. and Fesik S. W. NMR-based screening of proteins containing <sup>13</sup>C-labeled methyl groups. J Am Chem Soc, *122*: 7898-904, 2000.
- Meyer, B., Weimar, T. and Peters, T. Screening mixtures for biological activity by NMR. Eur J Biochem, 246: 705-9, 1997.
- Ni, F. Recent developments in transferred NOE methods. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 26: 517-606, 1994.
- 87. Chen, A. and Shapiro, M. J. NOE Pumping: A Novel NMR Technique for Identification of Compounds with Binding Affinity to Macromolecules. J Am Chem Soc, *120*: 10258-9, 1998.
- 88. Chen, A. and Shapiro, M. J. NOE Pumping. 2. A high-throughput method to determine compounds with binding affinity to macromolecules by NMR. J Am Chem Soc, *122*: 414-5, 2000.
- 89. Hajduk, P. J., Olejniczak, E. T. and Fesik, S. W. One-dimensional relaxation- and diffusionedited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules. J Am Chem Soc, *119*: 12257-61, 1997.
- 90. Carr, H. Y. and Purcell, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. Phys Rev, *94*: 630-8, 1954.
- 91. Meiboom, S. and Gill, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. Rev Sci Instrum, 29: 688-91, 1958.
- 92. Otting, G. NMR studies of water bound to biological molecules. Prog NMR Spectrosc, *31*: 259-85, 1997.
- 93. Dalvit, C., Fogliatto, G., Stewart, A., Veronesi, M. and Stockman, B. WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. J Biomol NMR, *21*: 349-59, 2001.
- 94. Hyde, E. I., Birdsall, B., Roberts, G. C., Feeney, J. and Burgen, A. S. Proton nuclear magnetic resonance saturation transfer studies of coenzyme binding to Lactobacillus casei dihydrofolate reductase. Biochemistry, *19*: 3738-46, 1980.
- Clore, G. M., Roberts, G. C., Gronenborn, A. M., Birdsall, B. and Feeney, J. Transfer of saturation NMR studies of protein-ligand complexes. Three site exchange. J Magn Reson, 45: 151-61, 1981.
- 96. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. Angew Chem Int Ed, *38*: 1784-8, 1999.
- 97. Mayer, M. and Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. J Am Chem Soc, *123*: 6108-17, 2001.
- 98. Mayer, M. STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Dissertation, Hamburg, 2001.

- 99. Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M. and Meyer, B. Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. J Am Chem Soc, *121*: 5336-7, 1999.
- 100. Meinecke, R. and Meyer, B. Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . J Med Chem, *44*: 3059-65, 2001.
- 101. Claasen, B., Axmann, M., Meinecke, R. and Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in native platelets than in liposomes. J Am Chem Soc, *127*: 916-9, 2005.
- 102. Hesse, M., Meier, H. and Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, 5. Auflage, Stuttgart, 1995.
- 103. Gerig, J. T. Fluorine NMR of proteins. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 26: 293-370, 1994.
- 104. Jenkins, B. G. Detection of site-specific binding and co-binding of ligands to macromolecules using 19F NMR. Life Sci, *48*: 1227-40, 1991.
- 105. London, R. E. and Scott, A. G. Fluorine-19 NMR Studies of Fluorobenzeneboronic Acids. 1. Interaction Kinetics with Biologically Significant Ligands. J Am Chem Soc, *116*: 2562-9, 1994.
- 106. Dalvit, C., Fagerness, P. E., Hadden, D. T., Sarver, R. W. and Stockman, B. J. Fluorine-NMR experiments for high-throughput screening: theoretical aspects, practical considerations, and range of applicability. J Am Chem Soc, *125*: 7696-703, 2003.
- 107. Dalvit, C., Flocco, M., Veronesi, M. and Stockman, B. J. Fluorine-NMR competition binding experiments for high-throughput screening of large compound mixtures. Comb Chem High Throughput Screen, *5*: 605-11, 2002.
- 108. Neuhaus, D. and Williamson, M. P. The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. Wiley-VCH, 2. Auflage, New York, 2000.
- Dalvit, C., Ardini, E., Flocco, M., Fogliatto, G. P., Mongelli, N. and Veronesi, M. A general NMR method for rapid, efficient, and reliable biochemical screening. J Am Chem Soc, *125*: 14620-5, 2003.
- 110. Wüthrich, K. NMR of proteins and nucleic acids. Wiley-Interscience, New York, 1986.
- 111. Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear nagnetic moments. J Chem Phys, *30*: 11-5, 1959.
- 112. Ramachandran, G. N. and Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. Adv Protein Chem, 23: 283-438, 1968.
- 113. Havel, T. and Wüthrich, K. A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular proton-proton proximities in solution. Bull Math Biol, 46: 673-98, 1984.
- 114. Guntert, P., Mumenthaler, C. and Wüthrich, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. J Mol Biol, *273*: 283-98, 1997.
- 115. Nemethy, G., Pottle, M. S. and Scheraga, H. A. Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids. J Phys Chem, 87: 1883-7, 1983.

- Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H. and Ronnberg, I. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. Biotechniques, *11*: 620-7, 1991.
- 117. Xing, L., Tjarnlund, K., Lindqvist, B., Kaplan, G. G., Feigelstock, D., Cheng, R. H. and Casasnovas, J. M. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. EMBO J, *19*: 1207-16, 2000.
- Holmes, S. D., May, K., Johansson, V., Markey, F. and Critchley, I. A. Studies on the interaction of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermis with fibronectin using surface plasmon resonance. J Micro Methods, 28: 77-84, 1997.
- Quinn, J. G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B. D. and O'Kennedy, R. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. Anal Biochem, *281*: 135-43, 2000.
- 120. Turbadar, T. Complete absorption of light by thin metal films. Proc Phy Soc, 73: 40-4, 1959.
- 121. Schmitz, K. An introduction to dynamic light scattering by macromolecules. Academic Press, New York, 1990.
- 122. Kullmann, J. Enzymatic peptide synthesis. CRC Press, Boca Raton, 1987.
- 123. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. and Boyer, H. W. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science, *198*: 1056-63, 1977.
- 124. Merrifield, R. B. Peptide synthesis on a solid polymer. Fed Proc Amer Soc Exp Biol, *21*: 412, 1962.
- 125. Carpino, L. A. and Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. J Org Chem, *37*: 3404-9, 1972.
- 126. Reid, G. E. and Simpson, R. J. Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1Hbenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tertbutyloxycarbonyl amino acids. Anal Biochem, *200*: 301-9, 1992.
- 127. Carpino L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. J Am Chem Soc, *115*: 4397-8, 1993.
- 128. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L. and Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoracetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. Tetrahedron Lett, *30*: 2739-42, 1989.
- 129. Dwek, R. A. Glycobiology: "towards understanding the function of sugars". Biochem Soc Trans, 23: 1-25, 1995.
- Bodanszky, M. and Kwei, J. Z. Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependence in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides. Int J Pept Protein Res, *12*: 69-74, 1978.
- 131. Piotto, M., Saudek, V. and Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. J Biomol NMR, *2*: 661-5, 1992.
- 132. Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. and Saudek, V. Gradient-tailored water suppression for <sup>1</sup>H
   <sup>15</sup>N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. J Magn Reson A, *102*: 241-5, 1993.

- 133. Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K. and Lindon, J. C. Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. J Magn Reson, 132: 125-9, 1998.
- 134. Bhattacharyya, L. and Brewer, C. F. Lectin-carbohydrate interactions. Studies of the nature of hydrogen bonding between D-galactose and certain D-galactose-specific lectins, and between D-mannose and concanavalin A. Eur J Biochem, *176*: 207-12, 1988.
- Solis, D., Fernandez, P., Diaz-Maurino, T., Jimenez-Barbero, J. and Martin-Lomas, M. Hydrogen-bonding pattern of methyl beta-lactoside binding to the Ricinus communis lectins. Eur J Biochem, *214*: 677-83, 1993.
- 136. Freeman, R. A handbook of nuclear magnetic resonance. Addison Wesley Longman Limited,2. Auflage, Edinburgh, 1997.
- 137. Eichler, J., Bienert, M., Stierandova, A. and Lebl, M. Evaluation of cotton as a carrier for solidphase peptide synthesis. Pept Res, *4*: 296-307, 1991.
- 138. Gasteiger, J. and Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. Tetrahedron, *36*: 3219-22, 1980.
- 139. Gasteiger, J. and Marsili, M. Prediction of proton magnetic resonance shifts: the dependence on hydrogen charges obtained by iterative partial equalization of orbital electronegativity. Organ Magn Reson, *15*: 353-60, 1981.

# **10 DANKSAGUNGEN**

Mein Dank gilt:

Robert für die wunderschönen letzten vier Jahre und unendlich viel mehr.

Meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Thomas Hackl (Thomasito estrella) für alles, was wir zusammen erlebt haben, in der Hoffnung, dass wir es schaffen, irgendwann den Triathlon von Barcelona zu absolvieren.

Boris Kröplien und Thomas Kühnemund für die schöne, gemeinsame Zeit in der 20, die hoffentlich am anderen Ort auf irgendeine Weise fortgeführt wird.

Marco Axmann für die tolle Zusammenarbeit, die nette Zeit in Aachen und dafür, dass er mich unermüdlich motiviert hat, diese Arbeit abzuschließen.

Mirko Lindner für sein biochemisches know how und dafür, dass er ein prima Kerl ist.

Ilona Müller für die Synthese einiger meiner Peptide und die Bereitstellung des Nγ-Chitobiosylasparagin-Bausteines.

Den Admins Boris Kröplien, Jan Westermann und Winrich Scherres für ihre Hilfe mit dem Programm SYBYL und dafür, dass sie diverse verlorene Dateien aus dem *backup* wieder ans Tageslicht förderten.

Thomas Hackl, Marco Axmann und Mirko Lindner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Praktikanten Sönke Jessel, Sven Martens, Thiemo Schreiber und Joachim Lauterwasser für ihre Hilfe bei der Synthese einiger Peptide und der Aufnahme verschiedener Affinitätsplots.

Volker Sinnwell für seine Tipps, Tricks und Ideen bezüglich der NMR-Messtechnik und für das Leihen des QNP-Probenkopfes.

Lars Redecke für das Proteinfragment rhPrP(90-231) und für sein Mitwirken bei den Aggregationstests.

Stefan Francke für die Hilfe mit dem Umgang des LC-ESI-MS-Spektrometers.

Außerdem danke ich:

Atillâ Çoksezen, Christian Flügge, Martin Hollinger, Britta Hünnefeld, Kolja Klein, Dirk Rehders, Svenja Scheid und Katharina Wallach für die nette Zeit im Arbeitskreis, sowie meinen Kommulitonen Björn Henninger, Jenny Haftmann, Matthias Plath, Björn Heuer, Tina Meyer und Stefan Müssig vor allem für aufmunternde Worte während dieser Arbeit.

# **11 LEBENSLAUF**

Geboren am 13. Juli 1975 in Hamburg, ledig.

# Ausbildung

| seit 02.2002    | Dissertation Forschungsgruppe Prof. Dr. B. Meyer                         |
|-----------------|--|
|                 | Institut für Organische Chemie,  |
|                 | Universität Hamburg  |
|                 | Titel: Inhibition der in vitro Aggregation des Prionproteins: Synthese   |
|                 | und Untersuchung von peptidischen Liganden des zellulären, humanen       |
|                 | Prionproteins.   |
|                 | Mitglied des Graduiertenkollegs 464 "Glycoconjugate: Darstellung,        |
|                 | Analyse, Struktur und Funktion"  |
| 04.1998-11.2001 | Hauptstudium Chemie  |
|                 | Diplomhauptprüfung: "sehr gut"   |
|                 | Universität Hamburg  |
|                 | Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. B. Meyer                  |
|                 | Titel: Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus dem TSE               |
|                 | verursachenden Prionprotein.   |
| 02.1999-07.1999 | Austauschstudentin innerhalb des ERASMUS-Programmes                      |
|                 | im Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Sevilla in der |
|                 | Gruppe von Prof. Dr. E. Carmona.   |
| 04.1996-03.1998 | Grundstudium Chemie  |
|                 | Diplomvorprüfung: "sehr gut"   |
|                 | Universität Hamburg  |
| 10.1995-03.1996 | Lehramtsstudium  |
|                 | Universität Hamburg  |
|                 | Fächer: Geographie, Spanisch   |
| 06.1995         | Hochschulreife am Gymnasium Heidberg                                     |
|                 | Hamburg, Langenhorn  |
|                 | Note: 1.1  |

#### Anstellungsverhältnisse:

| seit 02.2002    | Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Hamburg  |
|-----------------|---|
| 02.2002-03.2005 | Lehrtätigkeit im Grundpraktikum der Organischen Chemie für Chemie-<br>Studenten, Universität Hamburg                  |
| 11.2001-12.2001 | Lehrtätigkeit im Praktikum der Anorganischen Chemie für Medizin-<br>Studenten, Universität zu Lübeck                  |
| 06.2001-07.2001 | Lehrtätigkeit im Grundpraktikum der Organischen Chemie für Medizin-<br>und Zahnmedizin-Studenten, Universität Hamburg |
| 03.2001-10.2001 | Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Organische Chemie,<br>Universität Hamburg                                |
| 04.2000-06.2000 | Lehrtätigkeit im Praktikum für Lehramts-Studenten mit dem Fach<br>Chemie (Examensvorbereitung), Universität Hamburg   |
| 11.1999-12.1999 | Lehrtätigkeit im Praktikum der Organischen-Chemie für Biochemie-<br>Studenten, Universität Hamburg                    |
| 01.1999-02.1999 | Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für physikalische Chemie,<br>Universität Hamburg                             |
| 11.1998-12.1998 | Lehrtätigkeit im Grundpraktikum der Anorganischen Chemie für<br>Holzwirt-Studenten, Universität Hamburg               |
| 08.1998-09.1998 | Lehrtätigkeit im Physikpraktikum für Pharmazie-Studenten; Universität<br>Hamburg                                      |

## Veröffentlichungen

#### **Publikationen:**

Birgit Claasen, Marco Axmann, Robert Meinecke and Bernd Meyer Direct Observation of Ligand Binding to Membrane Proteins in Living Cells by a Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR Spectroscopy Method Shows a Significantly Higher Affinity of Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Native Platelets than in Liposomes J. Am. Chem. Soc. **2005**, *127*, 916-919.

Birgit Claasen, Lars Redecke, Dirk Rehders, Marko Silvestrić, Christian Betzel and Bernd Meyer Novel Inhibitor of the Aggregation of the Human Cellular Prion Protein (PrP<sup>C</sup>) In preparation

## Birgit Claasen and Bernd Meyer

Influence of Glycosylation on the Structure of the Prion Protein Fragment T192-T201 and on its Binding Specifity to the Human Cellular Prion Protein. In preparation

## Vortrag:

24. Diskussionstagung der GDCh-Fachgruppe Magnetische ResonanzspektroskopieBremen 2002*Titel:* 3D Structure of the Glycosylated and Unglycosylated Peptide TTKGENFTET of theHuman Prion Protein.

## Poster-Präsentationen:

26. Diskussionstagung der GDCh-Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie, Aachen 2004 *Titel:* Direct Observation of Ligand Binding to Membrane Proteins in Living Cells by Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR.

SFB 470: Symposium 2004-Glycostrukturen in biologischen Systemen, Hamburg 2004 *Titel:* The Role of Glycosylation in HIV Uptake by human CCR5 positive cells.

VI<sup>th</sup> European Symposium of The Protein Society, Barcelona 2005 *Titel:* Potential inhibitors of the Prion Protein: Peptides with binding affinity to hPrP<sup>C</sup>.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, im Dezember 2005