

Bindungsstudien mit humanen Zellrezeptoren für das SARS-Coronavirus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrads

Fachbereich Chemie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Anna-Winona Struck

aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2011

Für Gudrun, Klaus und Rhea

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke

Tag der Disputation: 24.06.2011

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von Juli 2007 bis Januar 2011 am Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Bernd Meyer, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die interessante Themenstellung und für die stets motivierende und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis.....	10
Aminosäuren.....	14
Kohlenhydrate	15
1 Einleitung	16
1.1 Das schwere akute respiratorische Syndrom	16
1.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus	17
1.3 Humane Zellrezeptoren für das SARS-CoV	20
1.3.1 <i>Angiotensin converting enzyme 2</i>	20
1.3.2 DC-SIGN und L-SIGN.....	21
1.4 Interaktionen zwischen dem S-Protein und den humanen Wirtsrezeptoren.....	22
2 Methoden.....	26
2.1 Molecular Modelling	26
2.2 Festphasenpeptidsynthese.....	27
2.3 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie.....	29
2.4 Immobilisierungsmethoden für Proteine	32
2.4.1 Kovalente Immobilisierung.....	32
2.4.2 <i>Antibody-based-capture</i> -Methode.....	33
2.4.3 Weitere Immobilisierungsmethoden	33
2.5 STD-NMR-Spektroskopie	34
2.6 Virusamplifikationsassay.....	37
2.7 Proteinchemische Methoden.....	37
2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.7.2 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen	38
2.7.3 Western Blot und Immunprinting	38
2.7.4 BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung.....	38
3 Aufgabenstellung.....	39

4	Ergebnisse und Diskussion	40
4.1	<i>Molecular-dynamic</i> -Simulationen zur Analyse der Interaktion der Leitstruktur 1 mit dem ACE2-Rezeptor	40
4.2	Alaninscan der Leitstruktur YKYRYL.....	43
4.2.1	Synthese der Peptide für den Alaninscan.....	43
4.2.2	SPR-Studien mit den Peptide aus dem Alaninscan.....	44
4.3	Weitere Punktmutationen der Leitstruktur 1 zur SPR-Analyse des Bindungsmodus zum ACE2.....	50
4.3.1	Synthese der Peptidbibliothek B2	50
4.3.2	SPR-Studien mit der Peptidbibliothek B2.....	52
4.3.3	Synthese und SPR-Messungen von weiteren S-Protein Peptiden als Negativkontrolle für die Interaktion zwischen ACE2 und Peptid 1.....	58
4.3.4	SPR-Studien mit einem Fusionsprotein aus dem S-Protein.....	59
4.4	STD-NMR-Experimente mit Peptid 1 und dem ACE2-Rezeptor	61
4.4.1	Bestimmung der Bindungsaffinität	61
4.4.2	Bestimmung des Bindungsepitops	64
4.4.3	Vergleich der STD-Effekte mit den Abständen aus der MD-Simulation	66
4.5	Bindungsstudien mit YKYRYL und dem S-Fusionsprotein	68
4.5.1	STD-NMR-Studien zur Analyse der Bindung von Peptid 1 an das S-Fusionsprotein.....	69
4.5.2	SPR-Studien von Peptid 1 mit den S-Fusionsprotein.....	75
4.6	Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von Peptid 1 auf Coronaviren.....	79
4.6.1	Synthese der Peptide für den Bioassay	80
4.6.2	<i>real-time</i> -RT-PCR-Reduktionsassay mit den TFA-haltigen Peptiden 1, 8 und 9	81
4.6.3	Entfernung von Trifluoracetat aus Peptiden.....	83
4.6.4	<i>real-time</i> -RT-PCR-Reduktionsassays mit dem TFA-freien Peptid 1 auf die inhibitorische Wirkung gegen das SARS-CoV	84

4.6.5	Assay mit dem TFA-freien Peptid 1 auf die inhibitorische Wirkung gegen das Coronavirus NL63.....	86
4.6.6	Inhibitionsassay mit dem TFA-freien Peptid 1 gegen das Alphavirus Sindbis..	88
4.7	Studien zur Interaktion des L-SIGN-Rezeptors mit dem S-Protein des SARS-CoV	89
4.7.1	Wahl von Kohlenhydratliganden für die CRD des L-SIGN	89
4.7.2	Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus dem S-Protein.....	90
4.7.3	Konzentrationsbestimmung, Umpuffern und Western Blot der CRD	92
4.7.4	Immobilisierung der CRD mittels Standard-Amid-Kupplung	95
4.7.5	Immobilisierung der CRD mittels der <i>antibody-based-capture</i> -Methode	95
4.7.6	Immobilisierung der CRD mittels doppelter <i>antibody-based-capture</i> -Methode	96
4.7.7	SPR- <i>screening</i>	97
4.8	STD-NMR-Studien mit CRD	101
4.9	Ausblick.....	104
4.9.1	ACE2.....	104
4.9.2	L-SIGN.....	106
5	Zusammenfassung.....	107
6	Summary	109
7	Experimenteller Teil	111
7.1	Chemikalien und Geräte	111
7.1.1	Chemikalien	111
7.1.2	Proteine und Antikörper	112
7.1.3	Materialien	113
7.1.4	Geräte	114
7.1.5	Puffer und Lösungen	115
7.1.6	Software	116
7.2	Molecular Modelling	116

7.3	Peptid- und Glycopeptidsynthesen	117
7.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)	117
7.3.2	Darstellung des Glycobausteins Asn-GlcNAc-OH	121
7.3.3	Synthese und Charakterisierung der Peptide.....	122
7.4	SPR-Experimente	138
7.4.1	Immobilisierung nach der Standard-Amid-Methode	138
7.4.2	SPR-Messungen mit dem rhACE2-Protein.....	139
7.4.3	SPR-Messungen mit dem S-Fusionsprotein.....	140
7.4.4	SPR-Messungen mit der CRD des L-SIGN	141
7.5	STD-NMR-Experimente	142
7.5.1	STD-NMR mit ACE2 und Peptid 1	143
7.5.2	STD-NMR-Experimente von Peptid 1 mit dem S-Fusionsprotein	147
7.5.3	STD-NMR-Experimente mit Peptid 1 und dem GST-tag.....	151
7.5.4	STD-NMR-Experimente mit der CRD des L-SIGN und α -MeMan.....	152
7.6	Proteinchemische Methoden.....	154
7.6.1	Dialyse von Proteinen	154
7.6.2	Zentrifugalkonzentratoren.....	154
7.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	155
7.6.4	Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen	155
7.6.5	Western Blot.....	155
7.6.6	Immunprinting.....	155
7.6.7	BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung.....	156
8	Toxikologie.....	157
9	Anhang	160
9.1	Proteinsequenzen.....	160
9.1.1	Proteinsequenz S-Protein des SARS-CoV	160

9.1.2	Proteinsequenz GST- <i>tag</i>	160
9.1.3	Proteinsequenz rekombinantes S-Fusionsprotein mit GST- <i>tag</i>	161
9.1.4	Proteinsequenz rhACE2 mit His- <i>tag</i>	161
9.1.5	Proteinsequenz L-SIGN	161
9.1.6	Proteinsequenz rekombinante CRD-FLAG des L-SIGN	162
10	Literatur	163
	Danksagung	170
	Lebenslauf	172
	Wissenschaftliche Publikationen	173
	Erklärung	175

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AM	<i>aminomethyl-polystyrene</i>
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchonin-Säure, <i>bicinchonin acid</i>
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
C-Typ Lektin	Calcium-abhängiges Lektin
CM	carboxymethyliert
CoV	Coronavirus
CV	Säulenvolumen, <i>column volume</i>
CRD	kohlenhydraterkennende Domäne, <i>carbohydrat recognition domain</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
<i>d</i> TBS	deuterierter TBS
E	<i>small envelope</i>
ECD	extrazelluläre Domäne
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
FLAG	Aminosäuresequenz DYKDDDDK
Fmoc	9 <i>H</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl
GST	Glutathion-S-Transferase

HE	<i>hemagglutinin-acetylerase</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR-C, HR-N	<i>heptad repeat region-C, -N</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecules</i>
IgG	Immunglobulin G
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k_{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing non-integrin</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MD	<i>molecular dynamic</i>
MeCN	Acetonitril
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPBS	Milchpulver-PBS
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
N-Protein	Nucleocapsid-Phosphoproteinen
NC	Nitrocellulose
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
n.d.	<i>not detected</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
PA	<i>polyacryl amide</i>

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	<i>peptide amide linker</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PS	<i>polystyrene</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAL	<i>rink amide linker</i>
RBD	<i>receptor binding domain</i>
RBM	<i>receptor binding motif</i>
rhACE2	<i>recombinant human angiotensin converting enzyme 2</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROESY	<i>rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-PCR</i>
RU	<i>resonance unit</i>
S	<i>spike</i>
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIGN	<i>specific intracellular adhesion molecules (ICAM)-3 grabbing non-integrin</i>
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis, <i>signal-to-noise ratio</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>

T_1, T_2	longitudinale-, transversale Relaxationszeit
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TM	<i>trans</i> -membrane Domäne
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPBS	Tween 20-PBS
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>world health organization</i>

Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Kohlenhydrate

Kohlenhydrat	IUPAC	Abkürzung
<i>N</i> -Acetylglucosamin	<i>N</i> -Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucopyranose	GlcNAc
Mannose	α -/ β -D-Mannopyranose	Man
α -Methylmannosid	Methyl- α -D-mannopyranosid	α -MeMan
3 α ,6 α -Mannopentaose	-	Man5

1 Einleitung

1.1 Das schwere akute respiratorische Syndrom

SARS steht für das schwere akute respiratorische Syndrom, eine Erkrankung der Atemwege, die erstmals im November 2002 in der chinesischen Provinz Guandong auftrat.¹ Im März 2003 wurde das bis dahin unbekannte Krankheitsbild von der WHO als schweres akutes respiratorisches Syndrom (*severe acute respiratory syndrome*, SARS) bezeichnet. Als Krankheitserreger konnte in SARS-infizierten Patienten ein neuartiges Coronavirus identifiziert werden, welches SARS-assoziiertes Coronavirus genannt wurde.²⁻⁸ Weltweit infizierten sich im Rahmen dieser Pandemie mehr als 8000 Menschen mit SARS, wobei etwa 10% der Krankheitsverläufe tödlich endeten (Abbildung 1). Bis auf einen deutlich schwächeren Ausbruch im Winter 2003/04 ist bis heute kein weiterer Fall eines SARS-Ausbruchs bekannt. Allerdings kann man wegen eines Reservoirs des Virus in Wildtieren, wie z. B. Fledermäusen und Schleichkatzen, nicht ausschließen, dass es zu einem erneuten Krankheitsausbruch kommen kann.⁹⁻¹¹

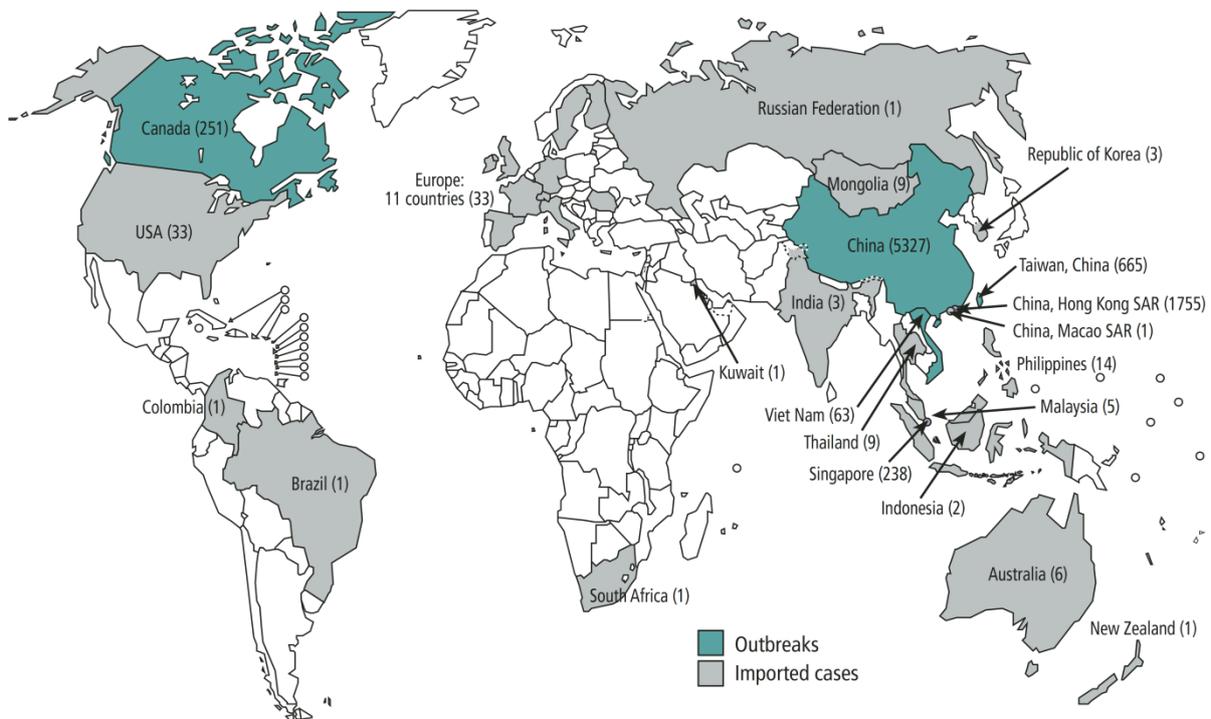


Abbildung 1: Globale Anzahl von SARS-Infektionen während der Pandemie 2003. Die Länder, in denen der Virus ausgebrochen ist, sind Grün markiert. Länder mit SARS-Erkrankten, die sich im Ausland infiziert haben, sind Grau markiert.¹

1.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus

Das SARS-assoziierte Coronavirus gehört zur Gruppe der Coronaviren, die im Jahre 1965 als Erreger von Erkältungskrankheiten entdeckt wurden.¹² Auf ihrer Oberfläche befinden sich keulenförmige Glycoproteine, die für die Namensgebung verantwortlich sind (*corona*, lat. Kranz). Der Aufbau eines Coronavirus ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

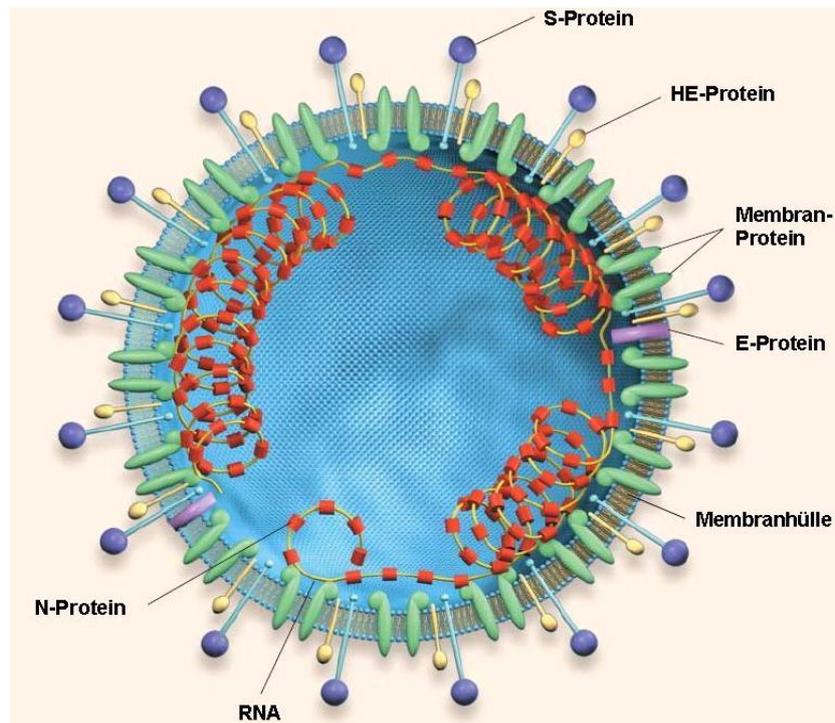


Abbildung 2: Aufbau eines Coronaviruspartikels. Im Innern des Partikels befindet sich das mit N-Proteinen komplexierte RNA-Genom als helikales Nucleocapsid. Es ist von einer Membranhülle umgeben, in welcher die Glycoproteine S-, E- und HE- sowie das nicht glycosylierte Membran-Protein eingelagert sind.⁴

Der Durchmesser von Coronaviren liegt zwischen 80 und 160 nm. Sie sind von einer Membranhülle umgeben, in der sich Membran- und Glycoproteine befinden. Die keulenförmigen Glycoproteine auf der Virusoberfläche werden als *spike*-Proteine (S-Proteine) bezeichnet. Sie liegen als Di- oder Trimere vor und ragen etwa 20 nm aus der Membranhülle heraus. Neben den S-Proteinen sind die Glycoproteine *hemagglutinin-acetyltransferase*-Protein (HE-Protein) und *small-envelope*-Protein (E-Protein) in die Membran eingelagert. Innerhalb des Virus befindet sich das einzelsträngige RNA-Genom in Plusstrangorientierung, welches mit Nucleocapsid-Phosphoproteinen (N-Proteinen) assoziiert als helikales Nucleocapsid vorliegt. Das RNA-Genom ist infektiös und mit einer Länge von etwa 30000 Basen das größte Genom aller bekannten RNA-haltigen Viren. Durch Protein-Protein-

EINLEITUNG

Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der N-Proteine mit der carboxyterminalen Domäne der Membranproteine ist das Nucleocapsid an der Innenseite der Membranhülle fixiert.¹³⁻¹⁵

Bis zum Auftreten des SARS-CoV waren nur zwei humane Coronaviren bekannt, HCoV-229E und HCoV-OC43, die beide harmlose Erkältungserkrankungen verursachen.^{12, 16-21}

Nach der Entdeckung des SARS-CoV wurden noch zwei weitere humane Coronaviren identifiziert. Das HCoV-NL63 verursacht schwere Atemwegserkrankungen bei Kindern und älteren Menschen.²²⁻²³ Das humane Coronavirus HKU1 infiziert ebenfalls den respiratorischen Trakt.²⁴⁻²⁵

Coronaviren infizieren humane Zellen, indem sie mit Rezeptoren auf den Zelloberflächen wechselwirken. Ein schematischer Überblick über die Infektion der humanen Zelle durch das SARS-CoV und mögliche Angriffspunkte für Wirkstoffe gegen das Virus sind in Abbildung 3 dargestellt.

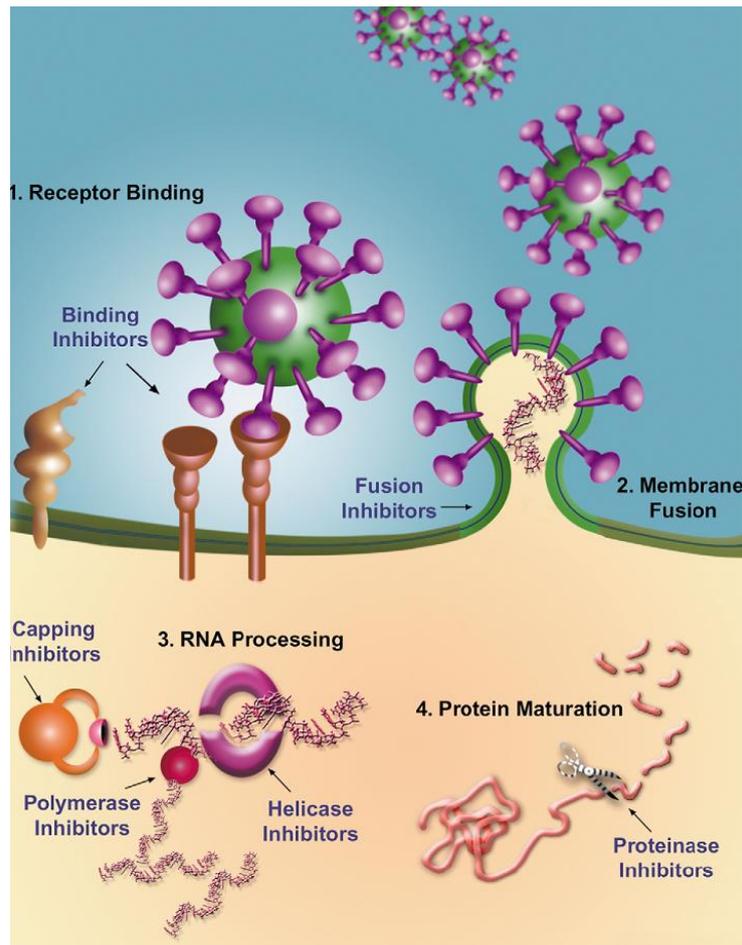


Abbildung 3: Replikationszyklus des SARS-CoV.²⁶ (1) Zunächst findet die Rezeptorbindung durch Wechselwirkung der S1-Domäne des S-Proteins mit Zellrezeptoren statt. (2) Anschließend erfolgt die Fusion des Virus mit der Zellmembran. (3) Die virale RNA wird durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase vermehrt. (4) Abschließend erfolgt durch Proteinmaturation die virale Vermehrung. Alle Schritte des Replikationszyklus stellen Angriffspunkt für potentielle SARS-Wirkstoffe dar.

Zunächst findet eine Bindung der Viren über die S1-Domäne des S-Glycoproteins an die Oberflächenrezeptoren der humanen Zelle statt. Als humaner Zellrezeptor konnte das Glycoprotein ACE2 identifiziert werden.²⁷ Neben dem ACE2 ist auch das Lektin L-SIGN als alternativer Rezeptor für das SARS-CoV postuliert worden.²⁸ Anschließend erfolgt die für eine Infektion nötige Zellverschmelzung des Viruspartikels mit der humanen Wirtszelle. Die Fusion wird von der S2-Domäne des S-Proteins induziert. Durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase findet eine Vermehrung der virale RNA statt. Es kommt es zur Bildung der viralen Proteine über die zelleigene Biosynthese und zur Proteinmaturation. Durch die abschließende Knospung neuer Viruspartikel werden Viren aus der Zelle freigesetzt.^{3, 29} Alle Schritte des Replikationszyklus bieten Angriffspunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen das SARS-CoV.^{26, 30} Im Rahmen dieser Arbeit soll die Bindung des viralen S-Proteins an die Zellrezeptoren untersucht werden. Kenntnisse über die Wechselwirkung zwischen

Virus und Rezeptor sind notwendig, um diese beispielsweise mit einem *entry*-Inhibitor zu blockieren.³¹

Das S-Protein ist ein 1255 Aminosäuren langes Glycoprotein, welches mit 23 *N*-Glycanen des hochmannosidischen Typs glycosyliert ist. Es gehört zur Klasse der viralen Typ-1-Fusionsproteine, welche sich in eine S1- und S2-Domäne unterteilen lassen. Über die S1-Domäne bindet das Virus an den humanen Zellrezeptor, um anschließend durch die S2-Domäne induziert, mit der Zellmembran zu verschmelzen. Die S2-Domäne des S-Proteins enthält zwei charakteristische Regionen, die so genannten *heptad repeat regions* (HR-N und HR-C), die im nativen Protein in einer *coiled-coil* Struktur vorliegen. Durch die Bindung des S-Proteins an den Rezeptor der Wirtszelle kann es in den HR-C und HR-N zu einer Konformationsänderung kommen, die zur Ausbildung eines 6-Helix-Bündels (Trimer von Dimeren) führt. Durch dieses Bündel wird die Fusion zwischen Virus und Rezeptor vermittelt.³²⁻³³

1.3 Humane Zellrezeptoren für das SARS-CoV

Als funktionaler Zellrezeptor wurde sowohl für das SARS-CoV als auch für das HCoV-NL63 das Glycoprotein *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) identifiziert.^{27, 34-35} Es konnte gezeigt werden, dass die S-Proteine des SARS-assoziierten Coronavirus und des humanen Coronavirus NL63 an überlappende Regionen des humanen Zellrezeptors ACE2 binden.³⁶ Neben dem ACE2 ist für das SARS-CoV noch das C-Typ Lektin L-SIGN als alternativer Rezeptor vorgeschlagen worden.²⁸

1.3.1 *Angiotensin converting enzyme 2*

Die Proteine *angiotensin converting enzyme* (ACE) und *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2), sind für die humane Blutdruckregulierung über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von Bedeutung.³⁷⁻³⁸ ACE2 liegt überwiegend im Endothel von Herz und Nieren sowie zu einem geringen Anteil in den Lungen und im Magen-Darm-Trakt vor.³⁹ Es handelt sich sowohl bei ACE als auch ACE2 um Typ-1-Transmembranproteine, die als Zink-Metalloproteasen fungieren. Obwohl die Aminosäuresequenzen in der katalytischen Domäne zu 42% identisch sind, zeigen ACE und ACE2 unterschiedliche Substratspezifitäten. Während ACE an der Produktion des gefäßverengenden Angiotensin II beteiligt ist, fördert ACE2 die vermehrte Bildung von anderen Angiotensinen, die u.a. als blutdrucksenkenden Mediatoren

im Renin-Angiotensin-System auftreten. Darum gilt ACE2 neben ACE als wichtiger Regulator des Herz-Kreislauf-Systems.^{37, 40}

Im November 2003 zeigten Li *et al.*, dass ACE2 als funktioneller Rezeptor für das SARS-CoV fungiert. Das Virus bindet dabei spezifisch an ACE2, eine Assoziation an das homologe Protein ACE konnte nicht nachgewiesen werden. Die Bindung des Virus an den ACE2-Rezeptor findet außerhalb der katalytischen Region statt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in der zinkkoordinierenden Region des Proteins keinen Einfluss auf die Virus-Rezeptor-Wechselwirkungen hat.²⁷

Da sich die Bindungsdomäne für das SARS-CoV fernab der katalytischen Peptidasedomäne des ACE2 befindet, würde eine Inhibition des Rezeptors vermutlich wenig Nebenwirkung auf die Enzymaktivität zeigen und stellt daher ein erfolgversprechendes Ziel für Wirkstoffe gegen das SARS-CoV dar.⁴¹

1.3.2 DC-SIGN und L-SIGN

Das *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN, CD209) und das *liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (L-SIGN, DC-SIGNR, CD209L) gehören zur Familie der calciumabhängigen, transmembranständigen (C-Typ)-Lektine.⁴²⁻⁴³ DC-SIGN und L-SIGN sind verwandte Rezeptoren, die auf Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommen und eine Homologie von 77% aufweisen. Sie erkennen spezifisch Pathogene und spielen somit eine Rolle in der Immunabwehr. Ihre Struktur kann in eine intrazelluläre, eine transmembrane und eine extrazelluläre Domäne unterteilt werden. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer *neck region* und einer kohlenhydraterkennenden Domäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD). Während die *neck region* des DC-SIGN aus einer konstanten Anzahl aus *tandem repeats* besteht, kann die *neck region* des L-SIGN unterschiedlich lang sein.⁴⁴⁻⁴⁵ Über ihre calciumabhängige CRD binden beide Rezeptoren spezifisch an hochmannosidische *N*-Glycane ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$).⁴⁶ Bei der Bindung der Glycane findet beim L-SIGN über die *neck region* eine Homooligomerisation statt, wodurch die Bindungsaffinität zu Kohlenhydratliganden erhöht wird.⁴⁷⁻⁴⁹ Die CRDs der Lektine besitzen eine Homologie von 84% und verfügen beide über ein hochkonserviertes EPN-Motiv, welches eine Rolle bei der Erkennung von mannosehaltigen Strukturen spielt.⁵⁰ Dieses Motiv liegt für das DC-SIGN bei ³⁴⁷EPN³⁴⁹ und für das L-SIGN bei ³⁵⁹EPN³⁶¹.⁴⁶

Obwohl das DC-SIGN und das L-SIGN eine Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und somit im humanen Immunsystem haben, wurde auch eine Erhöhung der Infektion von Zellen

in Anwesenheit dieser Rezeptoren beobachtet. Bereits zu Beginn der 90er Jahre wurde publiziert, dass C-Typ-Lektine an das gp120-Glycoprotein des HI-Virus binden und somit eine Rolle bei der viralen Infektion von humanen Zellen spielen.⁵¹⁻⁵² Nach Identifizierung des DC-SIGN und des L-SIGN konnte eine Bindung an das gp120 des HIV-1 nachgewiesen werden.^{42, 46, 53} Auch bei anderen viralen Infektionen, wie beispielsweise durch das Hepatitis-C-Virus, ist eine Interaktion mit viralen Glycoproteinen und somit eine Beteiligung an der Infektion nachgewiesen worden.⁵⁴⁻⁵⁶

Der Einfluss der beiden Rezeptoren DC-SIGN und L-SIGN auf den Infektionsverlauf von humanen Zellen durch das SARS-CoV ist bis heute nicht genau geklärt.

1.4 Interaktionen zwischen dem S-Protein und den humanen Wirtsrezeptoren

Durch die Forschung verschiedener Arbeitsgruppen, die sich mit der Interaktion zwischen dem SARS-CoV und dem humanen Wirtsrezeptor ACE2 befassen, konnte eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD) innerhalb des S-Proteins ermittelt werden.⁵⁷⁻⁵⁸ Durch Arbeiten der Gruppe von Farzan, die auch ACE2 als Rezeptor für das SARS-CoV identifizieren konnten, wurden die Aminosäuren 318 bis 510 des S-Proteins als RBD lokalisiert.⁵⁹ Eine Fusion dieser Aminosäuren mit einem humanen IgG-Antikörper zeigt eine höhere Affinität gegenüber ACE2 als das in voller Länge an den Antikörper gebundene S-Protein. Es gelang ihnen ebenfalls die Kristallisation der RBD des S-Proteins im Komplex mit dem ACE2-Rezeptor.⁶⁰ In dieser Röntgenkristallstruktur befindet sich die RBD zwischen den Aminosäuren 306 und 527.

Eine detaillierte Analyse der Röntgenkristallstruktur zeigt, dass innerhalb der RBD eine Schleife zwischen den Aminosäuren 424 und 494 den gesamten Kontakt zum ACE2 ausmacht. Diese Aminosäuresequenz wird daher als Rezeptorbindungsmotiv (RBM) bezeichnet. Innerhalb des RBM befinden sich 14 Aminosäuren im direkten Kontakt mit dem Rezeptor. Unter diesen 14 Aminosäuren sind sechs Tyrosine an der Wechselwirkung zum ACE2 beteiligt.⁶⁰

Das S-Protein des SARS-CoV bindet an eine N-terminale Region des ACE2. Han *et al.* konnten mittels Alanin-Mutationsstudien zeigen, dass die Region zwischen den Aminosäuren 22 und 57 auf dem ACE2 entscheidend für die Bindung zum S-Protein ist. Dabei sind

14 Aminosäuren wichtig (E22, E23, K26, D30, K31, H34, E35, E37, D38, E56 und E57), wobei K26 und D30 die größte Rolle spielen.⁶¹

Yi *et al.* konnten demonstrieren, dass die Aminosäurepunktmutation R441A in SARS-Pseudoviren den viralen Eintritt in humane Zellen verhindert.⁶² Dieselbe Mutation (R441A) in einem Fusionsprotein aus der RBD und einem humanen IgG-Antikörper führt zum Verlust der Bindungsaffinität gegenüber ACE2 und das Protein kann somit eine Infektion humaner Zellen durch SARS-Pseudoviren nicht mehr blockieren.⁶³ Diese Studien zeigen, dass die Aminosäure R441 des viralen S-Proteins eine wichtige Rolle bei der Bindung an den humanen ACE2-Rezeptor spielt.

Die Interaktion der RBD des S-Proteins mit dem Wirtsrezeptor ACE2 wurde von M. Axmann im Rahmen seiner Dissertation untersucht.⁶⁴ Dabei gelang es mittels *SPR-screening* einer Peptidbibliothek ein minimales Bindungsmotiv der RBD zu identifizieren. Das Hexapeptid **1** ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³, was den Aminosäuren Y438 bis L443 entspricht, zeigt mit einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 46 \mu\text{M}$ eine hohe Bindungsaffinität zum ACE2. Die Ergebnisse von M. Axmann dienen als Grundlage für diese Arbeit und für eine dieser Arbeit vorausgehende Diplomarbeit.⁶⁵ Die biologische Aktivität von **1** gegenüber dem SARS-Coronavirus wurde im Rahmen der vorausgehenden Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Ch. Drosten am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin mittels eines *real-time* RT-PCR Reduktionsassay getestet.⁶⁵⁻⁶⁶ In diesen Studien wurden VeroE6-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Peptid **1** versetzt und anschließend mit dem SARS-Virus infiziert. Es zeigt sich dabei eine konzentrationsabhängige Inhibition des Virus. Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurde die Vermehrung der viralen RNA bei einer Peptidkonzentration von 7 mM um einen Faktor von 100 gegenüber einer peptidfreien Vergleichsprobe reduziert. Ein zytotoxischer Effekt konnte während des Assays nicht festgestellt werden. Peptid **1** eignet sich daher als Leitstruktur zum Design von Inhibitoren gegen das SARS-CoV.

Um Bindungsmotive von Proteinen zu identifizieren, gehört das *screening* von Peptidbibliotheken zu den Standardmethoden. Daher haben auch andere Forschungsgruppen diesen Ansatz gewählt, um die Bindung zwischen dem S-Protein und den humanen ACE2-Rezeptor zu untersuchen. Dabei wurden sowohl Peptide aus der S1-Domäne (N-Terminus bis Aminosäure 667) als auch aus der S2-Domäne (Aminosäure 668 bis C-Terminus) des S-Proteins gewählt.

Peptide aus der S1-Domäne wurden von Hu *et al.*, Guo *et al.* und Ho *et al.* untersucht.⁶⁷⁻⁶⁹ Hu *et al.* konnten zeigen, dass das 22er Peptid A471-L503 aus der RBD des S-Proteins die virale Vermehrung in Verozellen verhindert und somit als potentieller *entry*-Inhibitor dienen kann.⁶⁷ Die Arbeiten von Guo *et al.* liefern ein Peptid, das den Aminosäuren K217-I234 des S-Proteins entspricht und den viralen Eintritt von Pseudoviren in Zellen inhibiert.⁶⁸ Ho *et al.* konnten mit Hilfe eines Immunofluoreszenzassays zeigen, dass die Peptide G192-I203, F483-Y494 und Y660-Y683 aus der S1-Domäne den viralen Eintritt blockieren.⁶⁹ Zheng *et al.* haben sowohl Peptide aus der S1-Domäne als auch aus der S2-Domäne auf ihre antivirale Aktivität in Zellen untersucht.⁷⁰ Neben zwei Peptiden aus der S2-Domäne zeigten die S1-Peptide P259-C278 und Y598-617Y antivirale Aktivität gegen das SARS-CoV. In der S2-Domäne konnten durch Arbeiten von Sainz *et al.* und Yuan *et al.* verschiedene Peptidmotive als potentielle Inhibitoren lokalisiert werden.⁷¹⁻⁷³

Da in den Studien mit Peptiden aus der S1- und S2-Domänen des S-Proteins verschiedene Methoden verwendet wurden, ist ein quantitativer Vergleich untereinander und mit den Ergebnissen von M. Axmann nur schwer möglich.

Wie in 1.3.2 beschrieben, wurde auch der Einfluss der C-Typ-Lektine DC-SIGN und L-SIGN auf die SARS-Infektion untersucht. Marzi *et al.* konnten zeigen, dass sich durch die Anwesenheit von DC-SIGN bzw. L-SIGN in Zellassays die SARS-Infektion erhöht.⁷⁴ Sie schließen beide Lektine als funktionalen Rezeptor allerdings aus. Jeffers *et al.* postulieren L-SIGN als funktionellen Rezeptor für das SARS-CoV.²⁸ Es konnte gezeigt werden, dass VeroE6-Zellen, die nur den L-SIGN-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit dem SARS-CoV infiziert werden können. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass auch L-SIGN eine Fusion des Virus mit der Zellmembran induzieren kann. Yang *et al.* konnten eine Erhöhung des Virustiters der SARS-Infektion durch DC-SIGN zeigen, schließen eine Infektion der Zellen über den DC-SIGN Rezeptor jedoch aus.⁷⁵ Im Gegensatz dazu stehen Arbeiten von Chan *et al.*. Diese zeigen, dass Zellen, die homozygot für L-SIGN sind, vor einer SARS-Infektion geschützt sind und der Virustiter reduziert wird.⁷⁶ Da im Rahmen dieser Arbeit mit der CRD des L-SIGN gearbeitet wurde, ist der Fokus in dem betreffenden Abschnitt auf den L-SIGN-Rezeptor gelegt.

Die CRD des L-SIGN bindet spezifisch an mannosehaltige Strukturen. Im Jahre 2001 gelang es Feinberg *et al.* die CRD des L-SIGN mit verschiedenen Oligosacchariden (Man₅ und ManGlcNAc₂) und aus der hochmannosidischen Struktur einer *N*-Glycosylierung zu kristallisieren.⁴⁶ Mitchell *et al.* konnten in einem Bindungsassay zeigen, dass die CRD des

L-SIGN 17-mal stärker an das hochmannosidische Oligosaccharid $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ bindet als an Mannose.⁴⁷ Guo *et al.* untersuchten in einem Glycanarray die Bindungsaffinität von L-SIGN und DC-SIGN gegenüber verschiedenen Glycanstrukturen.⁷⁷ Auch hier wurde die stärkste Bindung an das hochmannosidische Glycan beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass L-SIGN im Gegensatz zu seinem Homologen DC-SIGN nicht an Blutgruppenantigene bindet.

Die bisher beschriebenen Analysen der Bindung von L-SIGN an Kohlenhydrate legen die Vermutung nahe, dass eine Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und dem S-Protein des SARS-CoV über eine Interaktion der hochmannosidischen *N*-Glycane des S-Proteins mit der CRD des L-SIGN zustande kommt. Han *et al.* haben daher den Einfluss der einzelnen Glycosylierungsstellen des S-Proteins auf die Bindung an das L-SIGN und das DC-SIGN untersucht.⁷⁸ Es konnten durch sukzessives Austauschen der glycosylierten Asparagine gegen Glutamine zwölf Glycosylierungsstellen, die kritisch für den durch L-SIGN verursachte viralen Eintritt sind, identifiziert werden. Diese Glycosylierungen sind in Abbildung 4 dargestellt. Einen besonderen Einfluss an der Bindung besitzen die Glycoside an den Asparaginen N109, N118, N119, N158, N227, N589 und N699. Wenn diese mutiert werden und somit die Glycosylierung fehlt, kommt es zur Aufhebung der Bindung zwischen dem S-Protein und dem L-SIGN-Rezeptor.

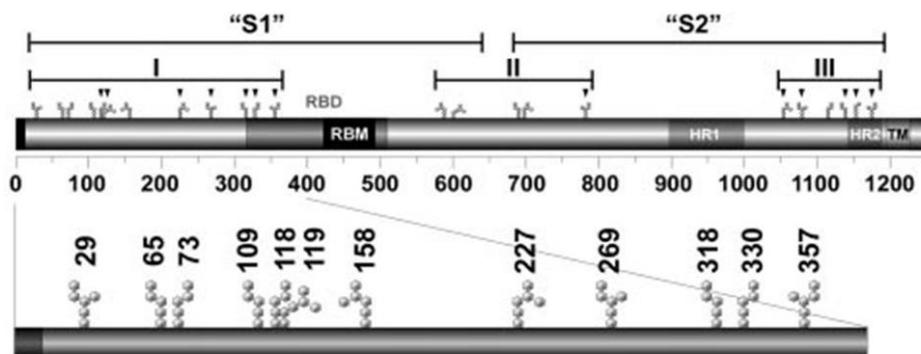


Abbildung 4 Wichtige *N*-Glycosylierungsstellen im S-Protein des SARS-CoV für die Bindung zum L-SIGN. Die RBD, das RBM, die *heptad repeat region* (HR1 und HR2) und die transmembrane Domäne (TM) sind in der Sequenz gekennzeichnet.⁷⁸

Diese hier vorgestellten Studien sowie weitere Kristallstrukturen, die Feinberg *et al.* in den letzten Jahren publizierten, liefern Grundlagen, um den L-SIGN-Rezeptor als Angriffsstelle für Wirkstoffe gegen das SARS-CoV zu nutzen.^{48-49, 79}

2 Methoden

2.1 Molecular Modelling

Die Bezeichnung *molecular modelling* fasst *in silico* Methoden zur Darstellung, Berechnung und Analyse von dreidimensionalen Molekülstrukturen zusammen. Die Strukturen, auf denen das *molecular modelling* aufbaut, können beispielweise durch NMR oder röntgenkristallographische Daten erhalten werden oder per Computer neu erzeugt werden. Durch den Einsatz von Hochleistungsrechnern ist heutzutage sogar die Modellierung sehr komplexer Systeme wie Protein-Protein-Wechselwirkungen möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *molecular modelling* zur Erstellung von *molecular dynamic* (MD)-Simulationen genutzt. Bevor diese durchgeführt werden konnten, wurden alle Systeme einer Minimierung unterzogen.⁸⁰

Energieminimierungen werden durchgeführt, um Molekülstrukturen zu optimieren, indem deren Energien minimiert werden. Dabei wird die Geometrie des Moleküls kontinuierlich verändert, bis ein Energieminimum erreicht ist. Im Idealfall wird hierbei die Struktur so modifiziert, dass sich korrekte Bindungswinkel und Atomabstände ergeben und sich das gesamte System an Ende der Minimierung in einem energetisch günstigeren Zustand befindet. Nach der Minimierung können dann weitere Prozesse wie beispielsweise MD-Simulationen folgen.

Durch MD-Simulationen wird das dynamische Verhalten von Molekülen über einen bestimmten Zeitraum simuliert. Dabei handelt es sich um eine auf einem Kraftfeld basierende Rechenmethode, die sich auch zur Simulation von Ligand-Protein-Systemen eignet. Bei einer MD-Simulation wird der dreidimensionale Raum nach optimalen Konformationen abgesucht. Es können beispielsweise konformationelle Änderungen eines Proteins oder molekulare Fluktuation observiert werden. MD-Simulationen mit Ligand-Rezeptor-Komplexen können Auskunft über die Struktur-Funktions-Beziehung, die Bindungsaffinität und die Mobilität des Liganden geben.

Außerdem finden MD-Simulationen eine Anwendung in der Strukturaufklärung von Proteinen. In Kombination mit Daten aus NMR-Studien können beispielsweise 3D Strukturen von kleinen Proteinen erhalten werden, deren Strukturen durch röntgenkristallographische Verfahren nicht gewonnen werden kann.⁸¹

Beim *molecular modelling* ist es notwendig möglichst reale Bedingungen zu erzeugen. Da sich Proteine in der Regel in gepufferten Systemen befinden, sollten bei Energieminimierungen und MD-Simulationen auch die Lösungsmittelmoleküle berücksichtigt werden. Dazu kann beispielsweise eine Wasserbox mit Salzmolekülen um das Protein-Ligand-System simuliert werden.

2.2 Festphasenpeptidsynthese

Peptide spielen in der Wirkstoffforschung eine große Rolle.⁸² Sie lassen sich sowohl chemisch, biochemisch als auch enzymatisch darstellen.⁸³ Mit der von Merrifield entwickelten Peptidsynthese an einer festen Phase lassen sich Peptide im Labormaßstab synthetisieren.⁸⁴ Dabei wird der C-Terminus des Peptids über einen Linker an ein Polystyrol-Harz gekuppelt. Die Vorteile gegenüber der Synthese in Lösung sind, dass aufwendige Reinigungsschritte zwischen einzelnen Kupplungsschritten entfallen, da überschüssige Reagenzien über Waschschrte einfach und ohne Verlust des Produkts entfernt werden können. Die Syntheserichtung an der festen Phase findet entgegengesetzt zur Biosynthese vom C- zum N-Terminus statt.

Bei Aminosäuren handelt es sich um multifunktionale Verbindungen. Um eine selektive Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren zu gewährleisten, muss mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie gearbeitet werden. Bei der Peptidsynthese nach Merrifield wird der N-Terminus blockiert und der C-Terminus aktiviert. Um Reaktionen mit funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren zu vermeiden, müssen diese ebenfalls mit Schutzgruppen versehen werden. Eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Festphasenpeptidsynthese ist in Abbildung 5 zu sehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polystyrol-Harze als feste Phase verwendet, die einen Rink-Amid-Linker auf ihrer Oberfläche tragen. Als Aminosäurederivate wurde Aminosäuren eingesetzt, die eine freie α -Carboxylfunktion tragen und deren α -Aminofunktion mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen ist.⁸⁵

METHODEN

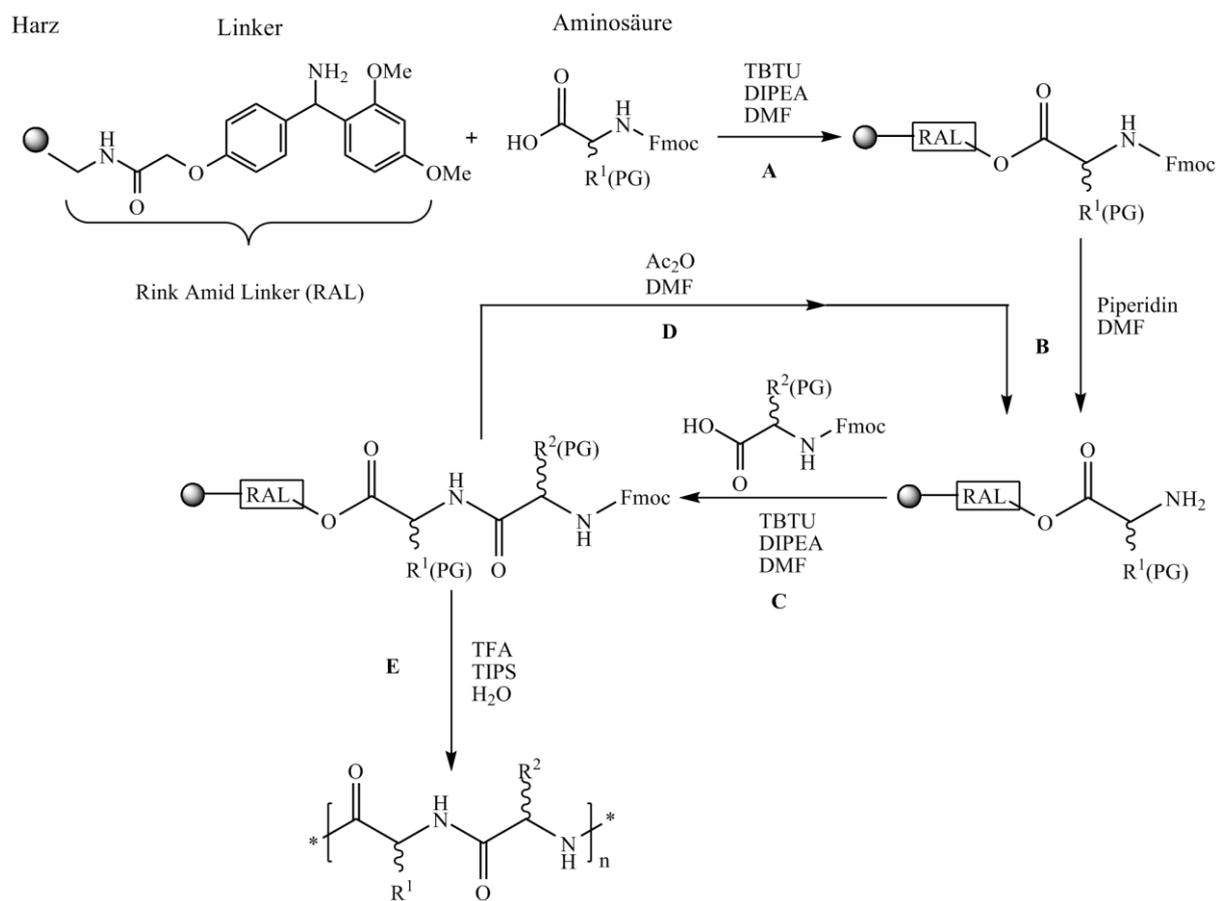


Abbildung 5: Schematische Übersicht der Festphasenpeptidsynthese mit **A**: Kupplung der ersten Aminosäure an die feste Phase, **B**: Fmoc-Abspaltung, **C**: Kupplung der Aminosäuren, **D**: *capping* und **E**: Abspaltung vom Harz

Im ersten Schritt (**A**) wird die α -Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure als Carbonsäureamid an die Aminofunktion des Linkers gebunden. Als Reagenzien zur Aktivierung der Carboxylfunktionen stehen eine Reihe von Aktivatoren zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit TBTU als Aktivierungsreagenz und der Base DIPEA gearbeitet.⁸⁶⁻⁸⁸ Es kommt zur Bildung eines Aktivesters, der mit der Aminofunktion der ersten Aminosäure zur Amidbindung reagiert.⁸⁹ Um nun weitere Aminosäuren zu koppeln, wird zunächst die Fmoc-Schutzgruppe der ersten Aminosäure mit der schwachen Base Piperidin abgespalten (**B**).^{85, 90-91} Anschließend können weitere Aminosäuren an die wachsende Peptidkette angefügt werden (**C**). Nicht umgesetzte Aminofunktionen, die zu Deletionspeptiden führen, werden nach jedem Kupplungsschritt mit Essigsäureanhydrid acetyliert (**D**). Die Schritte **B-D** werden durchgeführt, bis das Peptid die gewünschte Sequenz und Länge erreicht hat. Nach vollständiger Synthese wird das Peptid sauer mit Trifluoressigsäure und TIPS von der festen Phase abgespalten. In diesem Schritt werden parallel die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt.⁹²

Durch die Entwicklung von Peptidsynthesizern ist die automatisierte Peptidsynthese möglich. Dabei hat sich gezeigt, dass durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung eine Erhöhung der Ausbeuten und Verkürzung der Kupplungszeiten erreicht werden kann.⁹³⁻⁹⁵

Eine Erweiterung der Peptidsynthese stellt die Synthese von Glycopeptiden dar. Diese können zwar biochemisch gewonnen werden, allerdings ist so eine einheitliche Glycosylierung schwer zu erreichen.⁹⁶ Daher hat sich die Synthese von Glycopeptiden mit chemischen Methoden als Mittel der Wahl durchgesetzt.⁹⁷⁻⁹⁸ Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glycopeptide dargestellt, deren Asparaginseitenkette mit einem *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) verknüpft ist. Die Synthese solcher Glycobausteine wurde von Likhoshevskiy *et al.* publiziert.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Dabei wird *N*-Acetylglucosamin zunächst durch Aminierung des anomeren Zentrums in das β -Amin überführt. Der Glycobaustein wird anschließend durch Amidbildung zwischen der Aminofunktion des Kohlenhydrats mit der Seitenkettencarboxylgruppe erhalten.

2.3 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Mit der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR)-Spektroskopie kann man Bindungsereignisse zwischen Biomolekülen in Echtzeit detektieren.¹⁰¹ Dabei wird ein Bindungspartner auf einem Chip mit einer Goldoberfläche immobilisiert und der andere Bindungspartner in Lösung über den Chip geleitet.

Die physikalische Grundlage dieses Verfahren beruht auf der Interaktion von total reflektiertem Licht mit den Oberflächenplasmonen eines Metallfilms.¹⁰²⁻¹⁰³ Bei der Totalreflektion eines planar polarisierten Lichtstrahls an der Grenzfläche zwischen einem optischen dichteren (hier die Goldoberfläche des SPR-Chips) und einem optisch dünneren Medium (hier die Flusszelle) wird ein evaneszierendes Feld erzeugt, welches durch wellenmechanische Effekte beschrieben werden kann.¹⁰⁴ Bei einem bestimmten Einstrahlungswinkel, welcher von den Brechungsindizes jenseits der Reflexionsebene abhängt, kommt es zur Resonanz mit den Oberflächenplasmonen des Metallfilms, welche zu einer Verstärkung der evaneszierenden Welle führt.

Durch diese Resonanz wird die Intensität des reflektierten Lichts reduziert und somit der Winkel des reflektierten Lichts. Diese Änderung ist proportional zum Brechungsindex des optischen dünneren Mediums, welcher detektiert werden kann. Das von der Firma BiacoreTM (jetzt: GE Healthcare) entwickelte SPR-Sensorchipsystem ist in Abbildung 6 schematisch

dargestellt.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Die Änderung des Brechungsindex wird hier in sogenannten *response units* (RU) wiedergegeben.

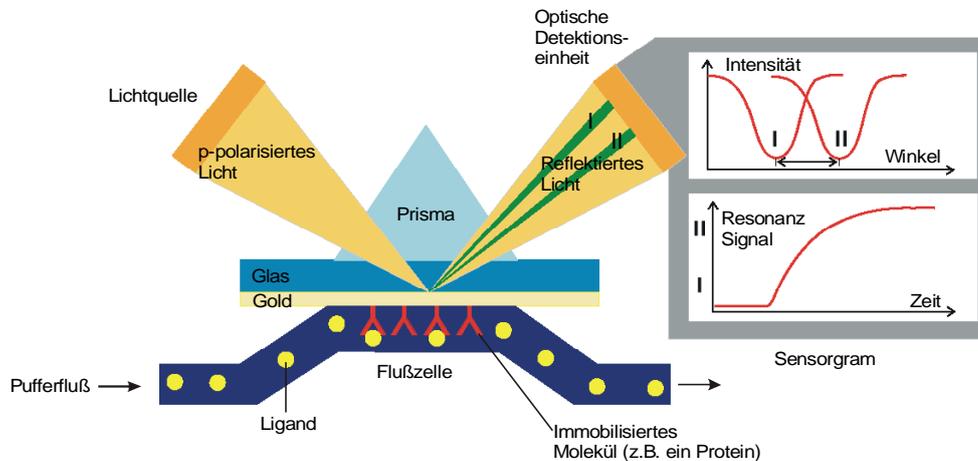


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer SPR-Sensorchipsystems.¹⁰⁵

Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem immobilisierten und mobilen Bindungspartnern, kommt es zu einer Massenzunahme an der Grenzschicht und dadurch zu einer Änderung des Brechungsindex des optisch dünneren Mediums. Daraus resultiert eine Änderung der RU-Antwort. Eine Zunahme um ein 1 RU entspricht dabei einer Massenzunahme von 1 pg auf der Chipoberfläche. Damit unspezifische Wechselwirkungen zwischen den mobilen Bindungspartnern und der Chipoberfläche nicht zu einer Verfälschung der Messung führen, werden parallel die RU-Antworten von einer Messzelle und einer Referenzzelle gemessen. Auf der Oberfläche der Referenzzelle sind entweder keine Moleküle oder Moleküle, die keine spezifische Bindung eingehen, immobilisiert. Das eigentliche SPR-Sensorgramm stellt die Differenz aus Messzelle und Referenzzelle dar. Ein idealisiertes SPR-Sensorgramm ist in Abbildung 7 dargestellt.

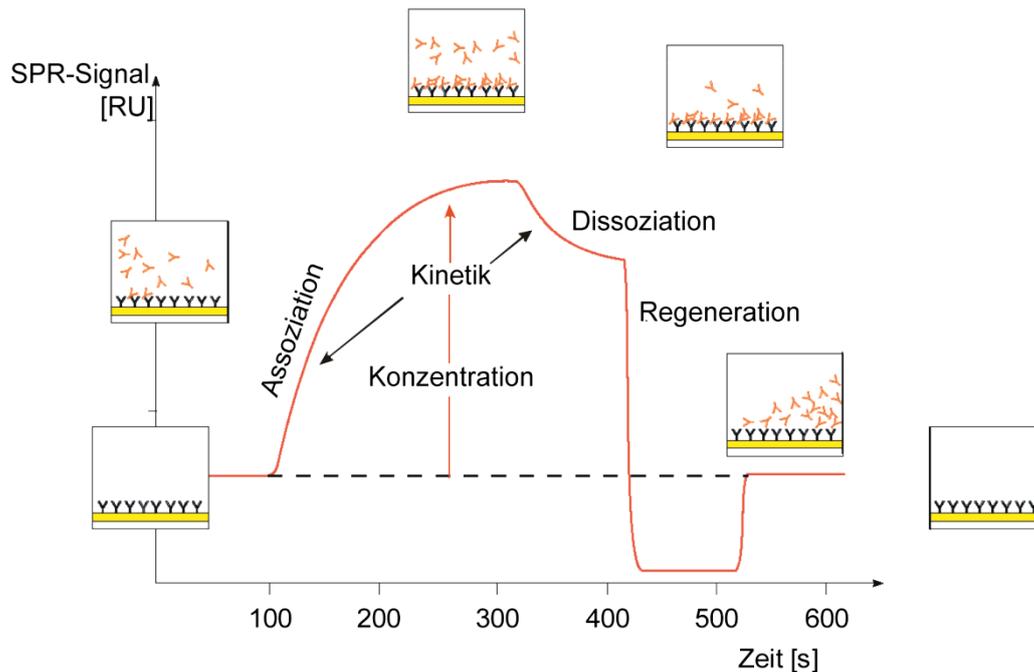


Abbildung 7: Idealisiertes Sensorgramm einer SPR-Messung.¹⁰⁵

Wenn die mobilen Bindungspartner an die immobilisierten Moleküle binden, kommt es zu einer Massenzunahme auf der Oberfläche und somit zu einem Anstieg des RU-Signals (Assoziation). Die SPR-Kurve steigt an, bis alle Bindungsstellen des immobilisierten Bindungspartners besetzt sind. Dann geht das System in einen Gleichgewichtszustand über, bei denen keine Netto-Assoziation mehr stattfindet. Es sind also immer die gleiche Anzahl von Bindungsstellen besetzt. Dieser *steady state* verursacht ein Plateau im Sensorgramm. Nach beendeter Injektion lösen sich die Liganden durch die Strömung wieder vom immobilisierten Bindungspartner. Es kommt zur Dissoziation und die SPR-Kurve fällt ab. Bei manchen Bindungsereignissen wird noch eine abschließende Regeneration benötigt, um alle Liganden von der Chipoberfläche zu lösen und somit die SPR-Kurve wieder auf die Basislinie zurück zu bringen.

Aus SPR-Messkurven lassen sich sowohl die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) als auch die thermodynamische Dissoziationskonstante (K_D) des Bindungsereignisses bestimmen (Gleichung 2-1).

$$K_D = \frac{A \cdot B}{AB} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad 2-1$$

Kinetische Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D mit $[A]$ = Konzentration der immobilisierten Verbindung, $[B]$ = Konzentration der gelösten Verbindung und $[AB]$ = Konzentration des gebundenen Zustands, k_{off} = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation, k_{on} = Geschwindigkeitskonstante der Assoziation.

Im Fall einer spezifischen Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern wird ein Gleichgewichtszustand (*steady state*) erreicht, in dem alle Bindungsstellen des immobilisierten Moleküls besetzt sind. Bei Molekülen, die nur eine Bindungsstelle besitzen, kann bei einer angenommenen 1:1-Bindung das *one-site-binding*-Modell angewandt werden. Dazu wird der jeweilige RU-Wert im *steady state* gegen die Ligandkonzentration aufgetragen (Gleichung 2-2). Bei dieser thermodynamischen Analyse entspricht die Konzentration bei $RU_{max}/2$ der Dissoziationskonstante K_D .

$$RU = \frac{RU_{max} \cdot c_L}{K_D + c_L} \quad 2-2$$

One-side-binding-Modell mit RU_{max} = extrapolierter Gleichgewichts-RU-Wert bei unendlich hoher Konzentration der gelösten Verbindung c_L .

2.4 Immobilisierungsmethoden für Proteine

Um ein Protein auf einem SPR-Chip zu immobilisieren, stehen verschiedene Techniken und Oberflächen zur Verfügung. In der Regel wird der kovalente Bindungspartner an Carboxylgruppen einer Dextranmatrix gebunden. Diese carboxylierten Dextranmatrizes stehen in verschiedenen Kettenlängen und Belegungsdichten zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden SPR-Chips der Firma GE Healthcare mit einer CM5-Oberfläche verwendet. Neben den Standardchips mit Carboxylgruppen auf der Oberfläche sind noch weitere funktionalisierte Oberflächen wie beispielsweise Streptavidin-Oberflächen erhältlich.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

2.4.1 Kovalente Immobilisierung

Die Standardimmobilisierungsmethode für Proteine stellt die Amid-Kupplung dar. Bei dieser werden die Proteine über eine Amidbindung der Aminogruppen ihrer Lysinseitenketten mit den Carboxylgruppen der Dextranmatrix verknüpft. Vor der Bildung der Amidbindung muss die Chipoberfläche mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) aktiviert werden. Dadurch bilden sich aus den

Carboxylgruppen Aktivester, die mit den Aminofunktionen des Proteins reagieren. Nicht umgesetzte Carboxylgruppen werden anschließend mit Ethanolamin verestert.

Eine wesentliche Rolle bei der Immobilisierung nach der Standard-Amid-Methode spielt der Effekt der Vorkonzentrierung des zu immobilisierenden Proteins auf der Chipoberfläche. Bei einem pH-Wert zwischen dem isoelektrischen Punkt des Proteins und 3.5 kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Oberfläche und den positiv geladenen zu immobilisierenden Bindungspartnern. Dadurch kann die Immobilisierungsreaktion schneller und effizienter ablaufen.

Ein Problem bei der Standard-Amid-Methode stellen Lysine in der Bindungsregion des Proteins dar. Falls das Protein über solch ein Lysin auf der Chipoberfläche verankert wird, können Liganden nicht mehr mit der Bindungsregion wechselwirken und das SPR-Experiment kann nicht durchgeführt werden. Um diesem Problem entgegen zu wirken, kann das Protein in Anwesenheit eines Liganden immobilisiert werden. Der Ligand bindet an die Bindungsregion des Proteins und macht diese damit für eine Immobilisierung unzugänglich.

Neben der Standard-Amid-Methode können Proteine auch über Thiol- und Aldehydgruppen kovalent mit den Carboxylgruppen der Dextranmatrix verknüpft werden.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

2.4.2 *Antibody-based-capture-Methode*

Eine weitere Immobilisierungsmethode für Proteine stellt die *antibody-based-capture*-Methode dar. Voraussetzung um einen Bindungspartner mittels dieser Methode auf die Chipoberfläche zu bringen ist das Vorhandensein eines entsprechenden Antikörpers, der an einen Teil des Proteins bindet. Über die Wechselwirkung zwischen dem Antikörper und dem passenden Antigen kann der Bindungspartner auf den Chip gebracht werden. Dazu wird der Antikörper zunächst nach der Standard-Amid-Methode auf der Dextranmatrix immobilisiert. Anschließend wird das Protein über die Messzelle geleitet. Durch die starke Interaktion zwischen dem Antigen und dem Antikörper bleibt das Protein auf dem Chip. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderen die Wechselwirkung zwischen einem Glutathion-S-Transferase-(GST)-tag und einem Anti-GST-Antikörper zur Immobilisierung genutzt.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

2.4.3 Weitere Immobilisierungsmethoden

Wie oben erwähnt, stehen neben den carboxylierten Oberflächen weitere funktionalisierte Chipoberflächen zur Verfügung. Biotinylierte Proteine können beispielsweise auf

Streptavidin-Oberflächen über die Wechselwirkung mit einem K_D von 10^{-15} M immobilisiert werden (*Streptavidin-biotin-capture*). Des Weiteren stehen Chips mit Ni^{2+} -Oberflächen zur Verfügung auf die Proteine mit einem His-tag gebracht werden können.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

2.5 STD-NMR-Spektroskopie

Durch die STD-NMR-Spektroskopie kann die Bindung zwischen Molekülen auf atomarer Ebene aufgeklärt werden. Durch dieses Experiment lassen sich sowohl die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D als auch das Bindungsepitop des Liganden bestimmen.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ Die Grundlage für die STD-NMR-Spektroskopie ist die selektive Sättigung eines Makromoleküls wie beispielsweise eines Proteins. Bei Molekülen, die eine Masse größer als 10 kDa besitzen, tritt wegen der kurzen T_2 -Relaxationszeit und der daraus resultierenden großen Linienbreite im NMR-Spektrum auch außerhalb des spektralen Bereichs eines kleinen Liganden Signalintensität auf. Durch das Einstrahlen einer selektiven Puls-kaskade in diesem Bereich, typischerweise bei negativen ppm, erfolgt eine selektive Sättigung, welche aufgrund der Spindiffusion über das gesamte Makromolekül verteilt wird.

Kommt es zur Bindung eines Liganden an das Makromolekül, wird die Sättigung mittels Kreuzrelaxation auf die Ligandprotonen übertragen (Abbildung 8). Durch Dissoziation liegen gesättigte Liganden in der Lösung vor und können durch verminderte Signalintensität im *on-resonance*-Spektrum detektiert werden. Neben dem *on-resonance*-Spektrum wird ein *off-resonance*-Spektrum aufgenommen, in dem die Puls-kaskade außerhalb des Resonanzbereichs von Liganden und Protein eingestrahlt wird. Es findet im *off-resonance*-Spektrum also keine Sättigung der Proteinresonanzen statt. Das eigentliche STD-Spektrum ist die Differenz zwischen *on*- und *off-resonance*-Spektrum. In diesem Spektrum sind nur die Signale der bindenden Ligandprotonen zu sehen.

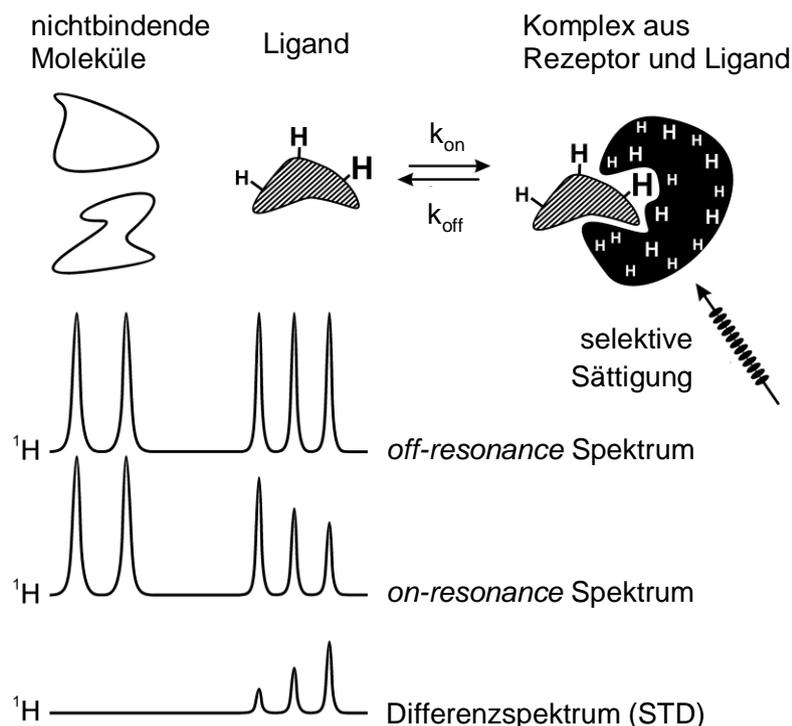


Abbildung 8: Prinzip des STD-NMR-Experiments. Das Makromolekül (hier: Rezeptor) wird selektiv gesättigt. Diese Sättigung wird auf bindende Ligandprotonen übertragen, was durch reduzierte Signalintensität im *on-resonance*-Spektrum detektiert wird. Die Differenz aus *on*- und *off-resonance*-Spektrum ergibt das STD-Spektrum.

Die Intensität der STD-Signale hängt mit der $1/r^6$ -Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate vom Bindungsabstand zwischen Ligandprotonen und Protein ab. Protonen, die sich in räumlicher Nähe zum Protein befinden, werden stärker gesättigt als andere und weisen somit stärkere Intensitäten im STD-Spektrum auf. Aufgrund der Intensitäten der einzelnen Ligandprotonen kann das Bindungsepitop des Liganden an das Protein aufgestellt werden. Für die STD-Messung ist es dabei entscheidend, wie viele Moleküle des Liganden die Bindungsstelle des Proteins erreichen und anschließend in die Lösung diffundieren. Eine zu kleine *off-rate* führt zu einer geringen Diffusion der gesättigten Liganden in die Lösung. Zu große *off-rates* können wiederum bewirken, dass die Verweilzeit des Liganden an der Bindungsstelle nicht für einen Sättigungstransfer ausreicht.¹⁰⁹

Die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D kann zum einen durch die Kinetik des Bindungsprozesses (Gleichung 2-1, Seite 32) als auch durch eine sogenannte STD-Titration mit verschiedenen Ligandkonzentrationen bestimmt werden. Aus den jeweiligen STD-Effekten und dem Ligandüberschuss kann nach Gleichung 2-3 der STD-Amplifikationsfaktor bestimmt werden.

$$\text{STD – Amplifikationsfaktor} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \text{Ligandüberschuss} \quad 2-3$$

Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors mit I_0 = Signalintensität im *off-resonance*-Spektrum und I_{sat} = Signalintensität im *on-resonance*-Spektrum.

Der erhaltene STD-Amplifikationsfaktor wird als Funktion der Ligandkonzentration aufgetragen. Zur Bestimmung des K_D -Werts kann analog zur SPR-Analyse das *one-site-binding*-Modell angewandt werden.¹¹⁰

Bei der Durchführung des STD-Experiments kann es beispielsweise durch Sättigung von Ligandresonanzen zum Auftreten von Artefakten kommen. Um diese zu berücksichtigen, wird ein STD-Experiment durchgeführt in dem kein Protein, sondern lediglich der Ligand vorliegt. Kann im STD-Artefakt-Spektrum Signalintensität beobachtet werden, dann werden die STD-Effekte der eigentlichen STD-Messungen durch die Artefakt-Signale korrigiert.

STD-NMR-Messungen mit Protein-Ligand-Systemen werden in der Regel in wässrigen, deuterierten Puffersystemen durchgeführt. Durch einen Restbestandteil von nichtdeuterierten Wasser kommt es zu einem HDO-Lösungsmittelsignal bei etwa 4.7 ppm im ^1H -NMR-Spektrum. Um Ligandprotonen in der Nähe dieses Signals zu detektieren, muss das Wassersignal unterdrückt werden.¹¹¹ Eine Variante bietet die *excitation-sculpting*-Pulssequenz.¹¹² Bei dieser wird die Wasserresonanz durch eine doppelte Spin-Echo-Sequenz mit einem selektiven Rechteckpuls unterdrückt. Da bei der Anwendung dieser Wasserunterdrückung im Rahmen dieser Arbeit verstärkt Artefakten auftraten, wurde neben der *excitation-sculpting*-Pulssequenz auch eine WATERGATE-Pulssequenz verwendet.¹¹³ Alle WATERGATE-Sequenzen haben eine einfache Spin-Echo Sequenz gemein. Bei der hier verwendeten WATERGATE -Sequenz wird die Wasserresonanz durch eine frequenzselektive Pulsabfolge selektiert und dadurch unterdrückt.¹¹⁴

Neben der Bestimmung des K_D -Werts und des Bindungsepitops kann über die Anwendung eines STD-Kompetitiv-Experiments detektiert werden, ob Liganden an dieselbe Region eines Proteins binden.¹⁰⁹ Dazu führt man zunächst ein STD-Experiment mit dem Liganden durch, der eine schwächere Bindungsaffinität besitzt. Anschließend gibt man einen weiteren Liganden wie beispielsweise einen nativen Liganden, in die Probe, der eine höhere Bindungsaffinität zum Rezeptorprotein aufweist. Wenn dieser Ligand nun an dieselbe Bindungsdomäne wie der erste Ligand bindet, dann verdrängt er diesen aus der

Bindungsregion. Dies kann durch Abnahme der Signale vom ersten Liganden im STD-Spektrum detektiert werden.

2.6 Virusamplifikationsassay

Die bisher beschriebenen Methoden liefern zwar eine Aussage über die Bindungsaffinität von Ligand-Protein-Komplexen, da sie aber *in vitro* durchgeführt werden, kann keine Aussage über die biologische Aktivität von Liganden getroffen werden. Da die biologische Aktivität für die Funktionalität von Liganden von großem Interesse ist, wurden peptidische Liganden im Rahmen dieser Arbeit von S. Pfefferle in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ch. Drosten (jetzt: Universitätsklinikum Bonn) am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin auf ihre biologische Aktivität getestet. Die Arbeiten wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe S4 durchgeführt.

Mit Hilfe eines *real-time-reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction* (RT-PCR)-Reduktionsassays ist es möglich die inhibierende Wirkung des Liganden auf die virale Infektion zu untersuchen. Für den Assay werden Zellen ausgesät und mit Ligandlösung inkubiert. Anschließend findet die Infektion der Zellen mit einer Viruslösung statt. Nach der Infektion vermehrt sich das Virus in den Zellen und wird in den Überstand freigesetzt. Die Vermehrung der Viruspartikel ist durch die quantitative *real-time*-RT-PCR messbar, mit deren Hilfe sich virale RNA quantifizieren und mit dem Virustiter korrelieren lässt. Damit ist die Bestimmung der Reduktion der Virusreplikation durch den Liganden über einen bestimmten Zeitraum möglich.⁶⁶

Um einen zytotoxischen Effekt des Liganden auf die Zellen zu überprüfen wird zusätzlich ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test durchgeführt.¹¹⁵

Dabei werden die Zellen mit dem MTT-Farbstoff behandelt und anschließend der Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen bestimmt.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt in Abhängigkeit von Molekülgröße und Ladung. Durch Zugabe des stark amphiphatischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine bei der SDS-PAGE lediglich nach Masse getrennt, da nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört

werden. Gleichzeitig wird durch Wechselwirkung des unpolaren Teils des SDS mit unpolaren Seitenkette des Proteins negative Ladung auf das Protein übertragen. Dadurch werden die Wandergeschwindigkeiten der Proteine von der Ladung unabhängig und die Proteine nur durch Siebeffekte in der Reihenfolge ihrer Molekulargewichte auf dem Gel aufgetrennt.¹¹⁶

2.7.2 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen

Proteinbanden in PA-Gelen können mit dem Farbstoff Coomassie-Blau angefärbt werden, welcher unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten bindet. Die Nachweisgrenze für diese Färbung beträgt 100 ng.¹¹⁷ Um geringere Proteinmengen in PA-Gelen zu detektieren, eignet sich beispielsweise die Silberfärbung, die eine Nachweisgrenze von 5 ng aufweist.¹¹⁸

2.7.3 Western Blot und Immunprinting

Der Western Blot findet im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese statt. Durch Anlegen eines elektrischen Feld werden die Proteine vom SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran transferiert, welche eine hohe Peptidbindungsaffinität besitzt. Durch anschließendes Immunprinting erfolgt die spezifische Detektion bestimmter Proteine auf einer NC-Membran durch Inkubation mit einem primären und einem sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist durch ein Enzym markiert, welches nach Substratzugabe durch eine Farbreaktion detektiert werden kann.¹¹⁹

2.7.4 BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung

Über die BCA-Methode lassen sich Proteinkonzentrationen durch Vergleich mit Proteinlösungen bekannter Konzentration bestimmen. Proteine bilden in alkalischer Lösung einen Komplex mit Cu^{2+} -Ionen aus. Dieser Komplex wird anschließend mit Bicinchonin-Säure (BCA) behandelt, wodurch eine Reduktion zu Cu^+ -Ionen stattfindet. Diese bilden mit der BCA einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei 550 nm gemessen werden kann.¹²⁰

3 Aufgabenstellung

Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) ist der Erreger des Schweren Akuten Atemwegssyndroms (SARS), an dem im Winter 2002/03 etwa 8000 Menschen erkrankten. Die Arbeitsgruppe von M. Farzan identifizierte eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die den Kontakt zwischen dem viralen *spike* (S)-Protein und dem humanen Rezeptor *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) vermittelt.^{27, 59} M. Axmann konnte durch ein SPR-*screening* von Peptidbibliotheken zeigen, dass das Hexapeptid ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ (Peptid **1**) aus dem S-Protein des SARS-CoV an den humanen ACE2-Rezeptor bindet. Daher kann Peptid **1** als Templat zum Design von *entry*-Inhibitoren gegen das SARS-CoV dienen. Weiterhin wurden von M. Axmann und in einer dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit erste Mutationsstudien der Leitstruktur **1** durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im ersten Teil die Interaktion der Leitstruktur **1** zum Wirtsrezeptor ACE2 genauer analysiert werden. Hierzu sollten zunächst *molecular-dynamic*-Simulationen durchgeführt werden, um den Bindungsmodus des Hexapeptids **1** an das ACE2 zu analysieren. Anschließend sollte durch die Synthese von Peptidbibliotheken, die einen Alaninscan und weiteren Punktmutationen der Leitstruktur **1** darstellen, und anschließenden SPR-*screening*, die Rolle der einzelnen Aminosäuren an der Bindung geklärt werden. Durch STD-NMR-Experimente sollte das Bindungsepitop von Peptid **1** auf atomarer Ebene bestimmt werden. Um die biologische Aktivität der Leitstruktur **1** und anderen Peptiden gegen das SARS-CoV zu testen, sollte ein Inhibitionsassay mit SARS-infizierten Zellen durchgeführt werden. Dazu sollten die Peptide in ausreichenden Mengen dargestellt werden. Neben dem SARS-CoV nutzt außerdem das Coronavirus NL63 (HCoV-NL63) ACE2 als funktionalen Rezeptor.^{22, 35} Daher könnte ein Inhibitor gegen das SARS-CoV auch gegen das HCoV-NL63 wirken. Um dies zu testen sollte die inhibitorische Wirkung von Peptid **1** gegen das HCoV-NL63 getestet werden.

Als alternativer Rezeptor für das SARS-CoV wurde 2004 das Lektin L-SIGN vorgeschlagen.²⁸ Dieser Rezeptor bindet spezifisch an hochmannosidische Kohlenhydratstrukturen.⁴⁶ Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte die Bindung des L-SIGN an das SARS-CoV anhand von Modellsubstanzen analysiert werden. Dazu soll ein SPR-Assay entwickelt werden, um die Interaktion der kohlenhydraterkennenden Domäne (CRD) des L-SIGN mit Kohlenhydraten, Glycopeptiden und Peptiden zu überprüfen. Außerdem sollte die Bindung an den L-SIGN-Rezeptor mittels STD-NMR untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 *Molecular-dynamic*-Simulationen zur Analyse der Interaktion der Leitstruktur **1** mit dem ACE2-Rezeptor

Um den Bindungsmodus des Hexapeptids **1** $^{438}\text{YKYRYL}^{443}$ mit dem Rezeptor ACE2 zu analysieren, wurde das Peptid an den Rezeptor gedockt und *molecular-dynamic* (MD)-Simulationen unterzogen. Im Rahmen der MD-Studien konnte gezeigt werden, dass die Seitenketten der Aminosäuren K439, Y440 und R441 mit Aminosäuren des Rezeptorproteins wechselwirken (Abbildung 9).

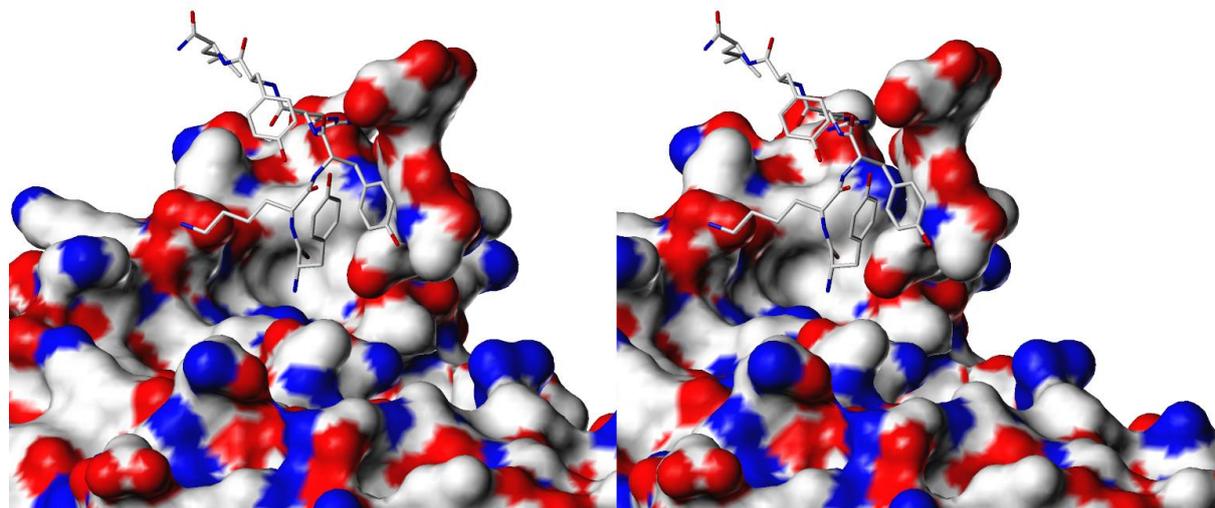


Abbildung 9: Konformation des Hexapeptids **1**. Die Seitenketten der Aminosäuren K439, Y440 und R441 zeigen Interaktionen mit der Rezeptoroberfläche.

Als Startstruktur wurde dafür die Struktur gewählt, die das Hexapeptid in der Röntgenkristallstruktur als Teil der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des S-Proteins im Komplex mit ACE2 aufweist.⁶⁰ Zunächst wurde das Rezeptor-Ligand-System in eine *waterbox* gesetzt. Dann wurden MD-Simulationen über 11000 ps bei einer Temperatur von 300 K durchgeführt, bis das System in einem thermodynamischen Gleichgewichtszustand vorlag. Anschließend wurde eine MD-Simulation über 3000 ps bei 300 K durchgeführt und die Bindung des Peptids an die Rezeptoroberfläche anhand der Abstände analysiert.

Das ACE2 ist ein Glycoprotein, welches am N90 durch ein *N*-Glycan glycosyliert ist. In der Röntgenkristallstruktur sind die ersten drei Zuckereinheiten dieses Glycans aufgelöst. Als Teil der RBD befindet sich das Peptid $^{438}\text{YKYRYL}^{443}$ **1** in der Röntgenkristallstruktur in Nähe des

Glycans. Der C-Terminus des Peptids besitzt einen Abstand von 18.4 Å und der N-Terminus einen Abstand von 30.1 Å zu dem C-1 der GlcNAc-Einheit am N90 des Rezeptors. Nach der MD-Simulation zeigt das Peptid **1** direkte Wechselwirkungen mit der Glycaneinheit. Insgesamt erfährt das Peptid während der Simulation eine durchschnittliche Verschiebung von 5.4 Å am C-Terminus und von 17.4 Å am N-Terminus. Die Konformationen des Peptids vor und nach den MD-Simulationen sind in Abbildung 10 dargestellt.

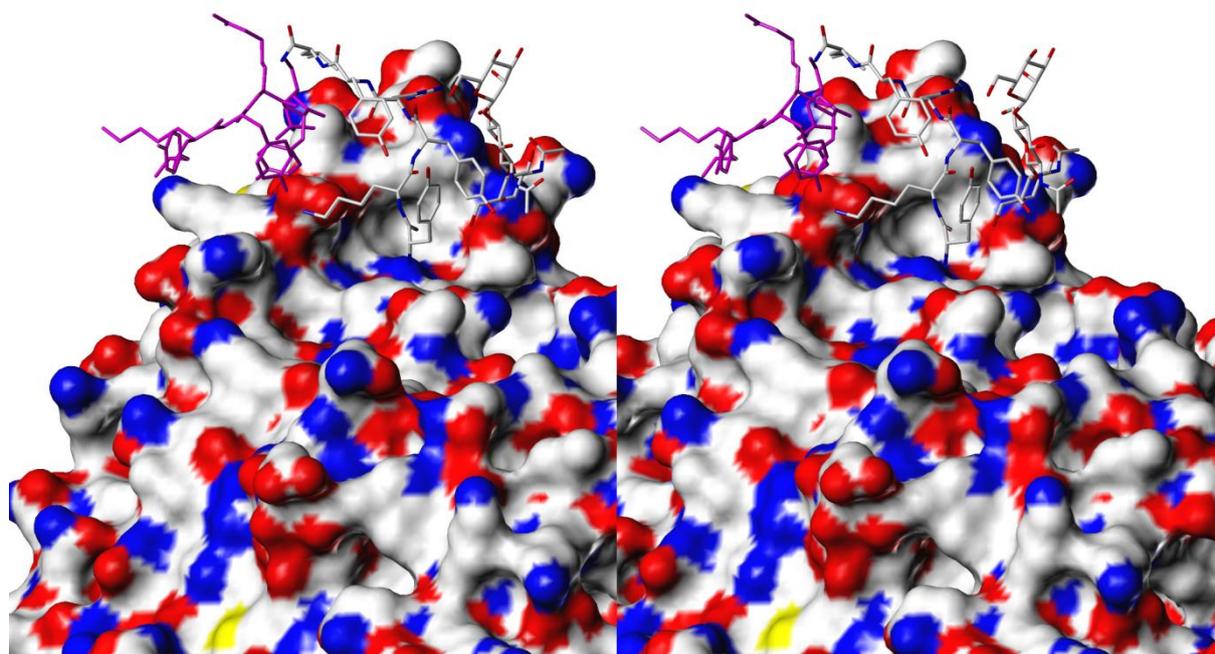


Abbildung 10: Konformation des Hexapeptids ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ **1** im Ligand-Rezeptor-Komplex vor und nach der MD-Simulationen. Das Peptid vor der Simulation ist in Magenta, das Peptid und die Glycanstruktur auf der Rezeptoroberfläche nach der Simulation sind in *atom color* dargestellt.

In der Röntgenkristallstruktur zeigen die Seitenkette der Tyrosine Y440 und Y442 Kontakt zur Oberfläche des humanen Rezeptors.⁶⁰ Während der MD-Simulation gehen die Seitenketten der peptidischen Aminosäuren K439, Y440 und R441 Kontakt mit dem Rezeptorprotein ein. Das K439 interagiert mit dem D30 des ACE2, indem die positiv geladene Seitenkette eine ionische Interaktion mit der Carboxylatgruppe eingeht. Der durchschnittliche Abstand zwischen dem ε-Stickstoffatom des Lysins und einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe beträgt dabei 3.1 ± 0.7 Å. Die Guanidiniumgruppe des R441 interagiert mit der Carboxylatgruppe des E23 des Rezeptors, mit einem durchschnittlichen Abstand zwischen dem η-Stickstoffatom und der Carboxylatgruppe von 3.4 ± 0.9 Å. Das Y440 des Hexapeptids wechselwirkt mit dem Glycanmolekül auf der Rezeptoroberfläche. Der aromatische Ring zeigt sowohl Kontakt zum zweiten

N-Acetylglucosamin als auch zur Mannose des Glycans. Der durchschnittliche Abstand dieser Wechselwirkungen beträgt $5.1 \pm 0.9 \text{ \AA}$ für das *N*-Acetylglucosamin ($C\delta$ des Y440 mit C3 des GlcNAc) und $5.9 \pm 0.8 \text{ \AA}$ für die Mannose ($C\epsilon$ des Y440 mit C1 der Man). Die jeweiligen Abstände zwischen dem Peptid und dem Rezeptor sind in Abbildung 11 dargestellt.

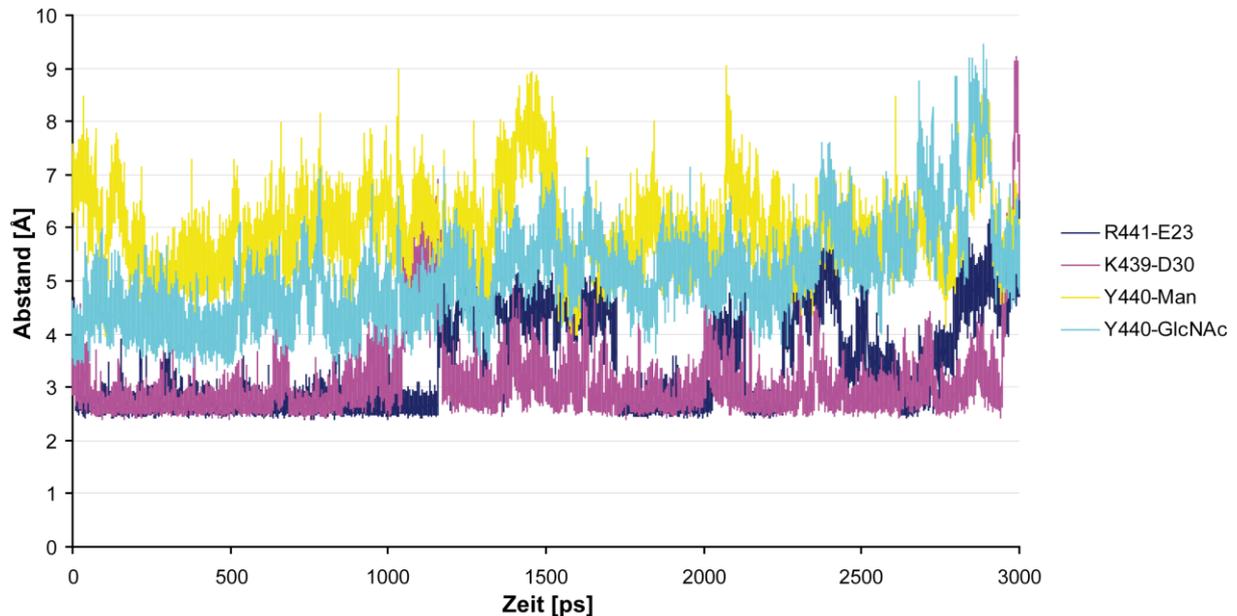


Abbildung 11: Abstände der Interaktionen zwischen den Seitenketten des Hexapeptids **1** und dem Rezeptorprotein ACE2 über die MD-Simulation. Es sind die Abstände über die gesamte Simulationszeit von 3000 ps gezeigt. Der Abstand zwischen dem R441 und E32 ist in Dunkelblau, der Abstand zwischen dem K439 und dem D30 in Magenta, der Abstand zwischen dem Y440 und der Mannose in Gelb und der Abstand zwischen dem Y440 und dem GlcNAc in Hellblau dargestellt.

Das Peptid zeigte während dieser MD-Simulation eine hohe Dynamik, blieb aber die gesamte Zeit in Kontakt mit der Rezeptoroberfläche. Die Konformationen des peptidischen Liganden **1** über die gesamte MD-Simulationszeit in Intervallen von 100 ps sind in Abbildung 12 dargestellt.

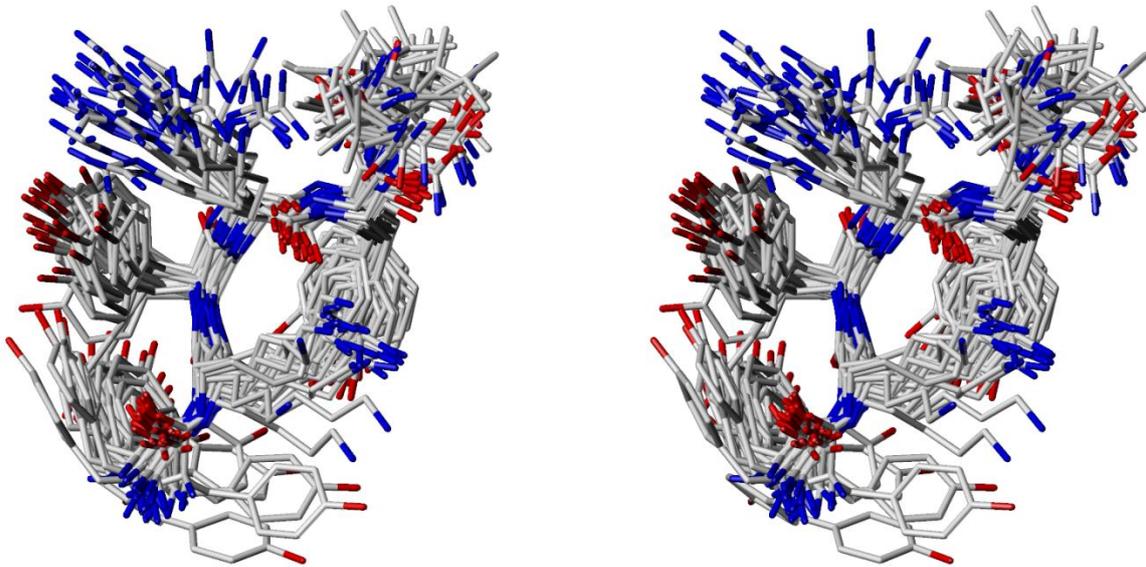


Abbildung 12: Konformation des Peptids **1** über den gesamten Verlauf der 3000 ps MD. Es sind die Peptidkonformationen in Intervallen von 100 ps dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass die Seitenketten der jeweiligen Aminosäuren eine unterschiedliche Dynamik erfahren. Die Seitenketten der Aminosäuren K439, Y440 und R441 zeigen während der gesamten MD eine Interaktion mit der Rezeptoroberfläche und erfahren somit keine starke Konformationsänderung. Die Seitenkette des Y438 ist hingegen über den gesamten MD-Verlauf flexibel, was durch eine hohe Streuung der Konformationen dieser Seitenkette in Abbildung 12 deutlich wird.

4.2 Alaninscan der Leitstruktur YKYRYL

4.2.1 Synthese der Peptide für den Alaninscan

Um die Relevanz der einzelnen Aminosäuren der Leitstruktur $^{438}\text{YKYRYL}^{443}$ (Peptid **1**) an der Bindung zum ACE2-Rezeptor zu spezifizieren, sollte ein Alaninscan des Peptids **1** durchgeführt werden. Dazu wurden die einzelnen Aminosäuren des Peptids **1** durch die Aminosäure Alanin substituiert. Die Peptide konnten mit Ausbeuten zwischen 29 und 37% dargestellt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Peptidbibliothek B1 mit Peptiden für den Alaninscan der Leitstruktur ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³

Peptid	Sequenz	Ausbeute [%]
1	⁴³⁸ YKYRYL ⁴⁴³	36
2	AKYRYL	37
3	YAYRYL	35
4	YKARYL	32
5	YKYAYL	30
6	YKYRAL	29
7	YKYRYA	30

Die Darstellung der Peptide erfolgte mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese nach der AAV 1 (Abschnitt 7.3.1) an einem Microwave-Peptidsynthesizer. Die Reinigung des jeweiligen Rohproduktes wurde durch Ausfällen mit *tert*-Butylmethylether (AAV 8) und anschließender *RP*-HPLC (AAV 9) durchgeführt. Die Charakterisierung der von der Säule eluierten Produkte nach der *RP*-HPLC erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF-MS (AAV 11). Nach erfolgreicher Reinigung wurden alle dargestellten Peptide mittels 2D-NMR-Spektroskopie charakterisiert (AAV 12).

4.2.2 SPR-Studien mit den Peptide aus dem Alaninscan

Um den Einfluss der Alaninsubstitution in den Peptiden **2-7** auf die Bindungsaffinität zum humanen Zellrezeptor ACE2 zu untersuchen, wurde ein *SPR-screening* der Peptidbibliothek B1 durchgeführt. Dabei wurde die, in den MD-Studien gezeigte, Rolle des positiv geladenen Tripeptidmotivs ⁴³⁹KYR⁴⁴¹ bestätigt (Abbildung 13).

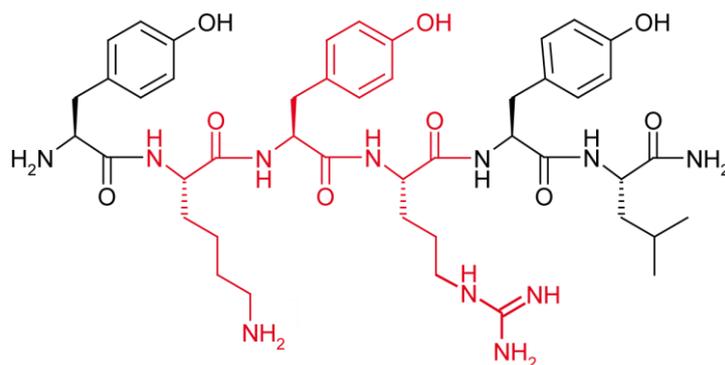


Abbildung 13: Per Alaninscan bestimmtes Bindungsepitop der Leitstruktur **1**. Aminosäuren die im SPR-*screening* eine wesentliche Rolle an der Bindung zum ACE2 zeigen, sind Rot dargestellt.

Für das SPR-*screening* wurden 10 μg des rekombinanten humanen Rezeptorproteins ACE2 mittels einer Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 7 kDa in PBS umgepuffert. Anschließend wurden 31 fmol des ACE2 nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung mittels Standard-Amid-Kupplung auf der Messzelle eines CM5-Chips immobilisiert. Die Messungen mit den Peptiden wurden in Zink(II)-haltigem TBS durchgeführt. Es wurden von den jeweiligen Peptiden Konzentrationen zwischen 0.5 und 64 μM untersucht, wobei die Assoziationszeit 20 s und die Dissoziationszeit 600 s betrug. Bei einer Peptid-Protein-Interaktion von 1:1 und einer durchschnittlichen Molmasse von 900 g/mol ist für die Peptide des Alaninscans jeweils eine theoretische maximale RU-Antwort von $RU_{max,theo} = 27$ RU zu erwarten.

Um die Aktivität des Chips zu überprüfen, wurde zunächst die Bindungsaffinität von Peptid **1** bestimmt. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe des Peptids untersucht. Die resultierenden SPR-Sensorgramme sind exemplarisch für alle weiteren SPR-Messungen in Abbildung 14 dargestellt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

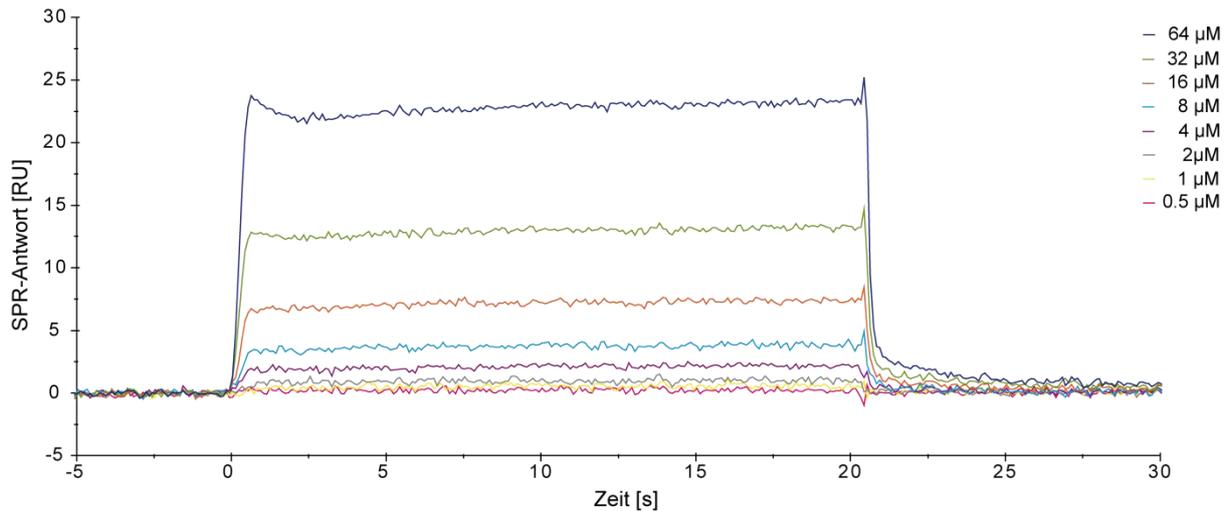


Abbildung 14: SPR-Sensorgramme von Peptid **1**. Es wurden Peptidkonzentrationen zwischen 0.5 und 64 μM auf ihre Bindungsaffinität zum rhACE2 untersucht.

Die jeweiligen maximalen RU-Antworten wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen und mit Hilfe des *one-site-binding*-Modells analysiert (Abbildung 15). Die Datenpunkte gehen bei der höchsten Konzentration von 64 μM in einen linearen Verlauf über, was auf das Auftreten von unspezifischen Wechselwirkungen des Peptids mit der Rezeptoroberfläche hindeutet. Daher wurde der höchste Datenpunkt nicht in die Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell einbezogen. Es ergab sich ein thermodynamische Dissoziationskonstante K_D von $41 \pm 12 \mu\text{M}$. Dieser Wert stimmt mit dem von M. Axmann per SPR ermittelte Wert von $K_D = 46 \mu\text{M}$ sehr gut überein.⁶⁴ Der RU_{max} -Wert liegt mit $21 \pm 4 \text{ RU}$ im Bereich $RU_{max,theo}$ -Antwort.

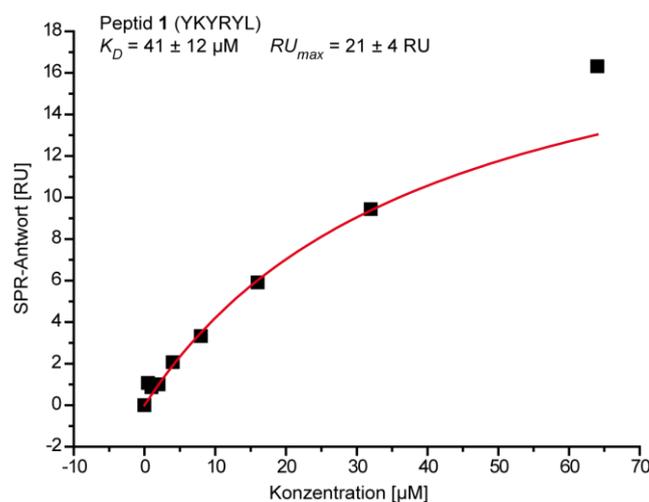


Abbildung 15: Thermodynamische Bindungsanalyse von Peptid **1** mit dem ACE2-Rezeptor. Durch Auftragung der jeweiligen maximalen RU-Antworten gegen die Konzentration ergeben sich über das *one-site-binding*-Modell die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D und die in der Sättigung maximale RU-Antwort RU_{max} . Der obere Datenpunkt wurde nicht in die Analyse miteinbezogen, da das Peptid bei der höchsten Konzentration unspezifisch an das Protein bindet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Anschließend wurden Konzentrationsreihen der durch Alanin punktmultierten Peptide **2-7** untersucht. Die daraus resultierenden jeweiligen thermodynamischen Bindungsanalysen sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

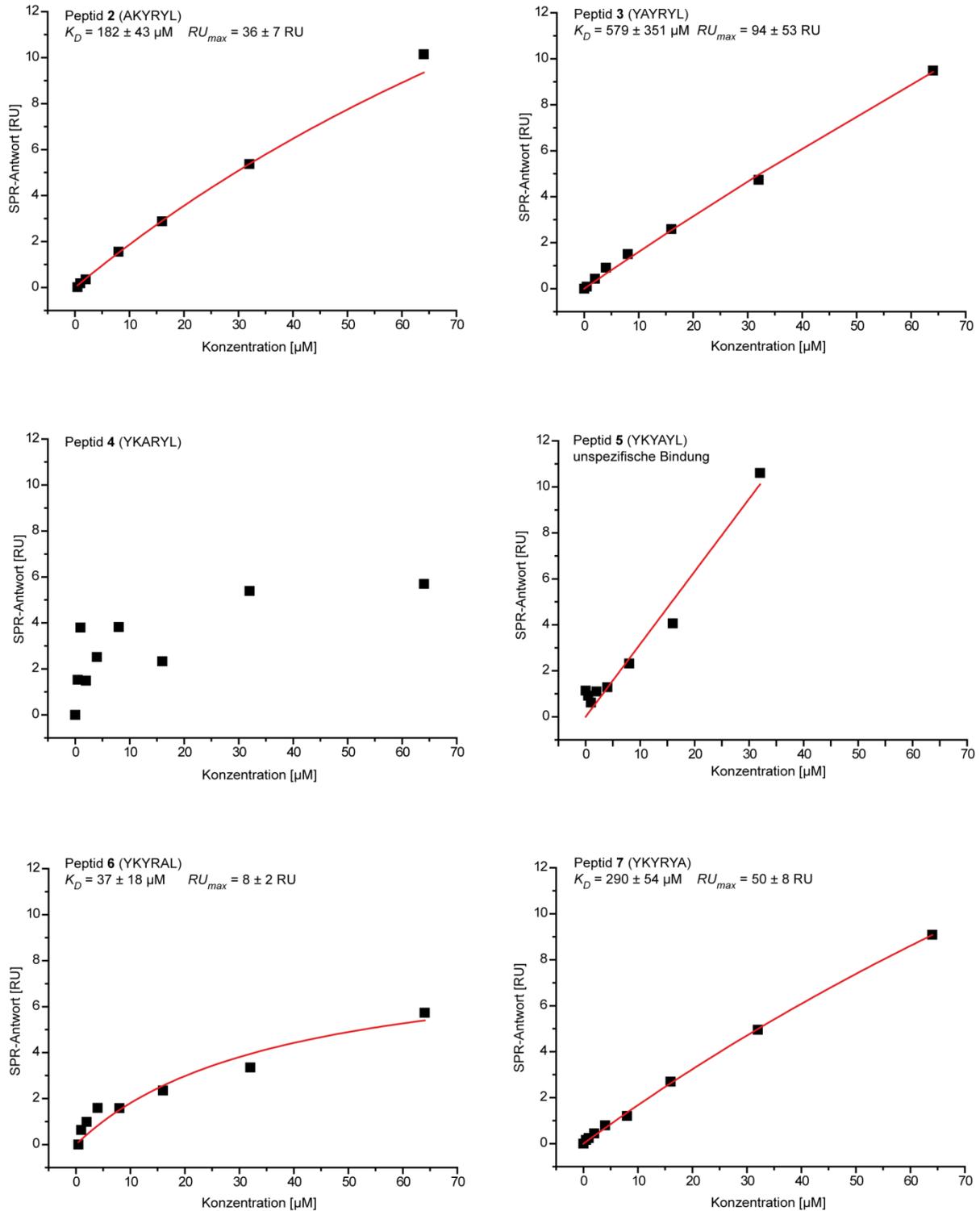


Abbildung 16: Affinitätsplots der Peptide **2-7** des Alaninscans. Es wurden Peptidkonzentrationen zwischen 0.5 und 64 μM untersucht. Für das Peptid **5** waren nur Datenpunkte bis 32 μM vorhanden. Es ergibt sich nur für die Peptide **2, 3, 6** und **7** ein konzentrationsabhängiger Kurvenverlauf, der sich mit dem *one-site-binding*-Modell analysieren lässt.

Von den sechs Peptiden **2–7** des Alaninscans zeigen vier Peptide (**2, 3, 6** und **7**) weiterhin Bindungsaffinität gegenüber dem humanen Wirtsrezeptor ACE2. Lediglich Peptid **6**, in dem das Y442 substituiert wurde, zeigt mit einer Bindungskonstante von $K_D = 37 \pm 18 \mu\text{M}$ ein vergleichbares Bindungsverhalten wie Peptid **1**. Der RU_{max} -Wert liegt allerdings mit 8 ± 2 RU signifikant unter der $RU_{max,theo}$ -Antwort von 27 RU.

Für das Peptid **4**, in dem das Y440 der Leitstruktur gegen Alanin substituiert wurde, liegen die beiden höheren Konzentrationen bei einer RU_{max} -Antwort von etwa 6 RU. Dieser Wert liegt weit unter dem $RU_{max,theo}$ -Wert von 27 RU. Die niedrigeren Konzentrationen weisen eine reproduzierbare Streuung auf. Eine Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell kann daher nicht durchgeführt werden und es kann von einer unspezifischen Bindung des Peptids **4** zum ACE2 ausgegangen werden.

Das Peptid **2**, in dem das Y438 gegen Alanin ausgetauscht wurde, besitzt eine Bindungskonstante von $K_D = 182 \pm 43 \mu\text{M}$ und bindet somit ungefähr um Faktor 4.5 schlechter als die Leitstruktur **1**. Der RU_{max} -Wert beträgt 36 ± 7 RU und liegt damit leicht über dem theoretisch ermittelten Wert. Das Peptid **3** mit der Mutation K439A zeigt mit einer Bindungskonstanten von $589 \pm 351 \mu\text{M}$ eine wesentlich schwächere Bindung zum ACE2-Rezeptor als Peptid **1**. Der um Faktor 3 zu hohe RU_{max} -Wert von 94 ± 53 RU deutet zusätzlich auf einen unspezifischen Bindungsanteil hin. Peptid **7**, in dem das L443 der Leitstruktur gegen Alanin ersetzt wurde, weist mit einem K_D -Wert von $290 \pm 54 \mu\text{M}$ auf ein um Faktor 7 schwächeres Bindungsverhalten hin. Der RU_{max} -Wert beträgt 50 ± 8 RU und ist somit um etwa Faktor 2 größer als der $RU_{max,theo}$ -Antwort.

Für das Peptid **5** konnte im vermessenden Konzentrationsbereich kein spezifisches Bindungsverhalten zum ACE2-Rezeptor beobachtet werden, was durch eine Gerade im Affinitätsplot deutlich wird.

Die thermodynamischen Dissoziationskonstanten des Alaninscans sind graphisch in Abbildung 17 und die RU_{max} -Werte in Abbildung 18 dargestellt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

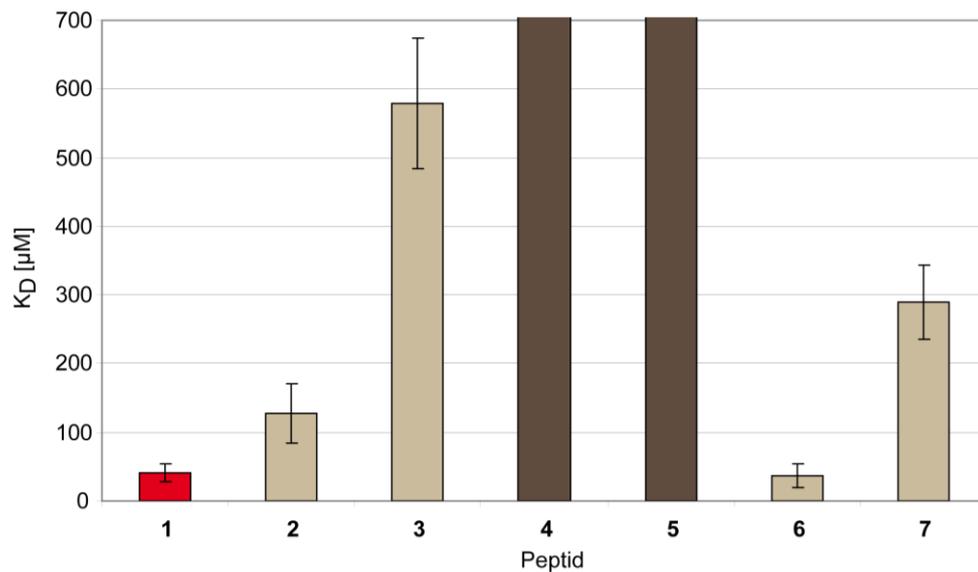


Abbildung 17: K_D -Werte der Peptidbibliothek B1 aus dem Alaninscans der Leitstruktur. Der K_D -Wert der Leitstruktur von 41 μM ist Rot dargestellt. Peptide mit einer spezifischen Bindung zum humanen Zellrezeptor sind Hellbraun und Peptide, die keine Bindung zeigten, sind Dunkelbraun dargestellt.

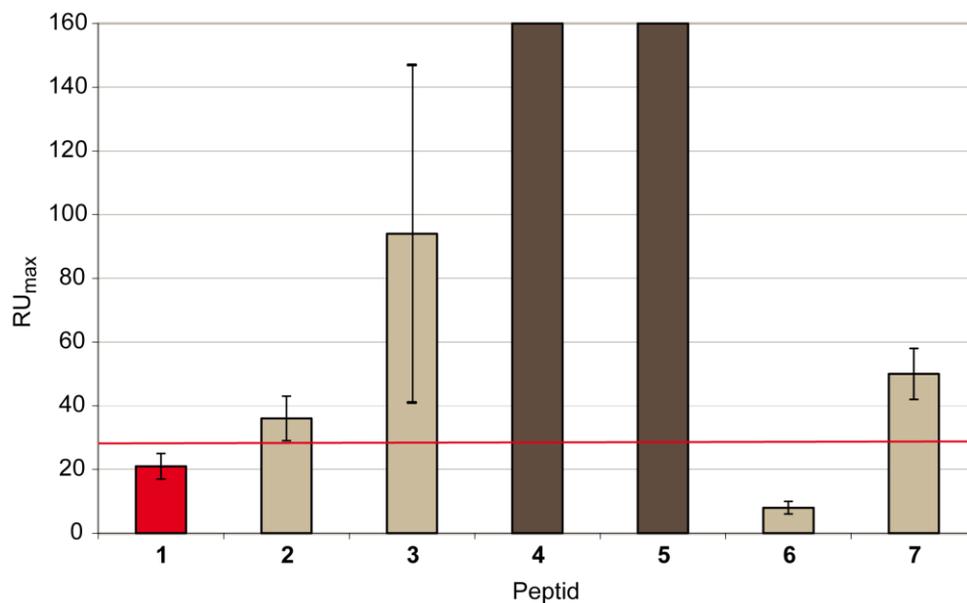


Abbildung 18 RU_{max} -Werte der Peptidbibliothek B1 aus dem Alaninscans der Leitstruktur. Der RU_{max} -Wert der Leitstruktur ist Rot dargestellt. Peptide mit einer spezifischen Bindung zum humanen Zellrezeptor sind Hellbraun und Peptide, die keine Bindung zeigten, sind Dunkelbraun dargestellt. Der $RU_{max,theo}$ -Wert von 27 RU ist als rote Linie dargestellt.

Die Ergebnisse des Alaninscans zeigen deutlich, dass das mittlere positiv geladene Tripeptidmotiv $^{439}\text{KYR}^{441}$ besonders wichtig für die Bindung der Leitstruktur $^{438}\text{YKRYL}^{443}$ zum ACE2-Rezeptor ist, wobei der Einfluss von Tyrosin und Arginin wichtiger als der des Lysins ist. Die anderen beiden Tyrosine Y438 und Y442 scheinen keinen großen Einfluss auf die Bindung zum ACE2 zu haben. Das Peptid **2**, mit der Mutation Y438A, zeigt nur eine

geringfügig schwächere Bindung zum Rezeptor als die Leitstruktur. Das Peptid **6**, in dem das Y442 substituiert wurde, zeigt eine mit Peptid **1** vergleichbare Bindungsaffinität. Die Bindungskonstante von Peptid **7**, in dem das L443 gegen Alanin ausgetauscht wurde, deutet auch auf einen Anteil von Leucin an der Bindung hin, wobei dieser Anteil geringer als der des Peptidmotivs ⁴³⁹KYR⁴⁴¹ ist. Dieses Ergebnis ist im guten Einklang mit den Ergebnissen der *molecular dynamic*-Studien, in dem die Aminosäureseitenketten des Tripeptidmotivs ⁴³⁹KYR⁴⁴¹ direkten Kontakt zum Rezeptor haben.

4.3 Weitere Punktmutationen der Leitstruktur 1 zur SPR-Analyse des Bindungsmodus zum ACE2

4.3.1 Synthese der Peptidbibliothek B2

Der Alaninscan der Leitstruktur ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ zeigt, dass vor allem die Aminosäuren K439, Y440 und R441 verantwortlich für die Bindung des Peptid **1** an den ACE2 –Rezeptor sind. Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren von **1** weiter zu analysieren, wurden punktmutierte Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert wurden. Die Peptide **8-17** konnten nach der Reinigung mit Ausbeuten zwischen 21 und 61% erhalten werden.

Tabelle 2: Peptidbibliothek B2. Die in Bezug auf die Leitstruktur 1 mutierten Aminosäuren sind in den Peptiden 8–15 unterstrichen dargestellt.

Peptid	Sequenz	Ausbeute [%]
1	⁴³⁸ <u>Y</u> K Y R Y L ⁴⁴³	61
8	Y K Y <u>D</u> Y L	49
9	Y K Y <u>S</u> Y L	65
10	Y <u>D</u> Y R Y L	47
11	Y <u>S</u> Y R Y L	34
12	Y <u>R</u> Y R Y L	52
13	Y <u>S</u> Y <u>D</u> Y L	36
14	Y <u>S</u> Y <u>S</u> Y L	n.d.
15	<u>F S F S F L</u>	21
16	N Y N Y K Y R Y L	42
17	R Y Y Y L K	32

Die Synthesen der Peptide **8–12** und **16** wurden nach AAV 3 (Abschnitt 7.3.1) durch manuelle Kupplung durchgeführt. Die Synthese der Peptide **13** und **17** erfolgte durch mikrowellenunterstützte Festphasenpeptidsynthese nach AAV 1. Die Peptide **14** und **15** wurden mit einem Syntheseroboter nach AAV 2 synthetisiert. Die Reinigung der Peptide erfolgte nach AAV 8 und AAV 9 mittels *RP*-HPLC. Alle Peptide wurden durch 2D-NMR-Spektroskopie charakterisiert (AAV 12).

In Peptid **8** und **9** ist jeweils das R441 punktmutiert, wobei die positiv geladene Aminosäure Arginin in Peptid **8** gegen die negativ geladene Asparaginsäure und in Peptid **9** gegen das ungeladene Serin substituiert wurde. Durch diese Substitutionen sollte der Einfluss der positiv geladenen Guanidiniumgruppe des Arginins auf die Bindung von Peptid **1** zum ACE2 untersucht werden. Analog wurde bei den Peptiden **10** und **11** das positiv geladene K439 gegen Asparaginsäure (**10**) und Serin (**11**) substituiert. Außerdem sollte durch die Mutation K439R in Peptid **12** noch untersucht werden, ob die Größe der positiv geladenen Seitenkette einen Einfluss auf die Bindung hat.

In den Peptiden **13** und **14** wurden sowohl das K439 als auch das R441 mutiert, wobei das K439 jeweils durch Serin ersetzt wurde und das R441 durch Asparaginsäure (**13**) bzw. durch Serin (**14**). Peptid **15** trägt die gleichen Punktmutationen wie Peptid **14**, wobei zusätzlich noch die drei Tyrosine der Leitstruktur gegen Phenylalanine ersetzt wurden. Durch diese Mutationen kann neben dem Einfluss der positiven Ladungen auch noch der Einfluss der Tyrosine observiert werden.

Neben den punktmutierten Peptiden wurde noch das Peptid **16** mit der Sequenz $^{435}\text{N}^{\text{YNYKYRYL}}^{443}$ dargestellt, welches der RBD des S-Proteins zwischen den Aminosäuren N435-L443 entspricht. Es wurde der Leitstruktur gegenüber also um drei Aminosäuren zum N-Terminus hin verlängert. Außerdem wurde Peptid **17** mit der Sequenz RYYYLK dargestellt, das die Aminosäuren der Leitstruktur in einer anderen Reihenfolge wiedergibt. Die Bindungsaffinität aller Peptide zum humanen Rezeptor wurde anschließend mittels SPR-Messungen überprüft. Peptid **1** wurde ebenfalls dargestellt und als Positivkontrolle vermessen.

4.3.2 SPR-Studien mit der Peptidbibliothek B2

An der Peptidbibliothek B2 wurde ein *SPR-screening* durchgeführt. Dadurch konnte der Einfluss der positiv geladenen Aminosäuren K439 und R441 für die Bindung von Peptid **1** an den humanen Zellrezeptor ACE2 belegt werden. Außerdem bestätigen SPR-Messungen mit dem *random*-Peptid **17** mit der Sequenz RYYYLK die Spezifität der Interaktion zwischen Peptid **1** und ACE2.

Für die SPR-Studien wurde zum einen der in 4.2.2 erwähnte Chip mit 31 fmol des rekombinanten humanen Rezeptorproteins ACE2 verwendet. Außerdem wurden auf der Messzelle eines zweiten CM5-Chips 108 fmol rekombinantes ACE2 nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung immobilisiert. Alle Messungen wurden in Zink(II)-haltigem TBS durchgeführt. Die Konzentrationen der Peptide lagen zwischen 0.5 (1) und 64 μM , die Assoziationszeit betrug 20 s und die Dissoziationszeit 600 s. Die maximale theoretische RU-Antwort liegt bei einer durchschnittlichen Peptidmasse von 900 g/mol bei 27 RU für den Chip mit 31 fmol Proteinbelegung und bei 97 RU für den Chip mit 108 fmol immobilisiertem ACE2. Für das Peptid **16**, welches eine Molmasse von 1295 g/mol besitzt, ist bei 108 fmol immobilisiertem ACE2 eine $\text{RU}_{\text{max,theo}}$ von 140 RU zu erwarten. Um die Proteinaktivität des mit 108 fmol ACE2 immobilisierten Chips zu überprüfen, wurden zunächst SPR-Messungen

mit Peptid **1** durchgeführt. Der Affinitätsplot für diese Messung ist in Abbildung 19 dargestellt.

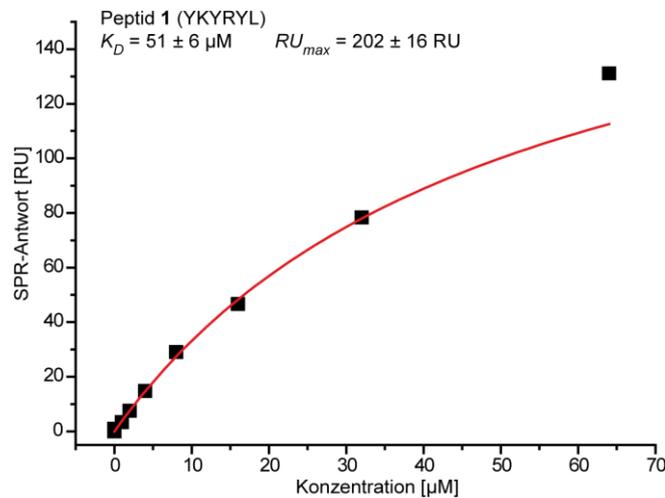


Abbildung 19: Affinitätsplot der SPR-Messungen von Peptid **1** mit 108 fmol immobilisiertem ACE2. Es ergibt sich ein K_D -Wert von $51 \pm 6 \mu\text{M}$.

Aus dem Affinitätsplot ergab sich eine thermodynamische Bindungskonstante von $K_D = 51 \pm 6 \mu\text{M}$. Die Bindungsaffinität zwischen Peptid **1** und dem ACE2-Rezeptor liegt somit in derselben Größenordnung wie von M. Axmann bestimmt. Allerdings liegt der $R_{U_{max}}$ -Wert mit $202 \pm 16 \text{ RU}$ etwa um einen Faktor von 2 über der $R_{U_{max,theo}}$ -Antwort. Da der K_D -Wert aber im erwarteten Bereich lag, wurde der Chip für weitere Messungen verwendet.

Anschließend wurde die Peptidbibliothek B2 untersucht. Dabei wurde für die Peptide **8–11** und **14–15** der Chip mit der Belegung von 108 fmol verwendet. Die Peptide **12** und **13** wurde mit dem Chip untersucht, der eine Belegung von 31 fmol aufwies. Die thermodynamischen Bindungsanalysen für alle acht punktmutierten Peptide **8–15** sind in Abbildung 20 dargestellt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

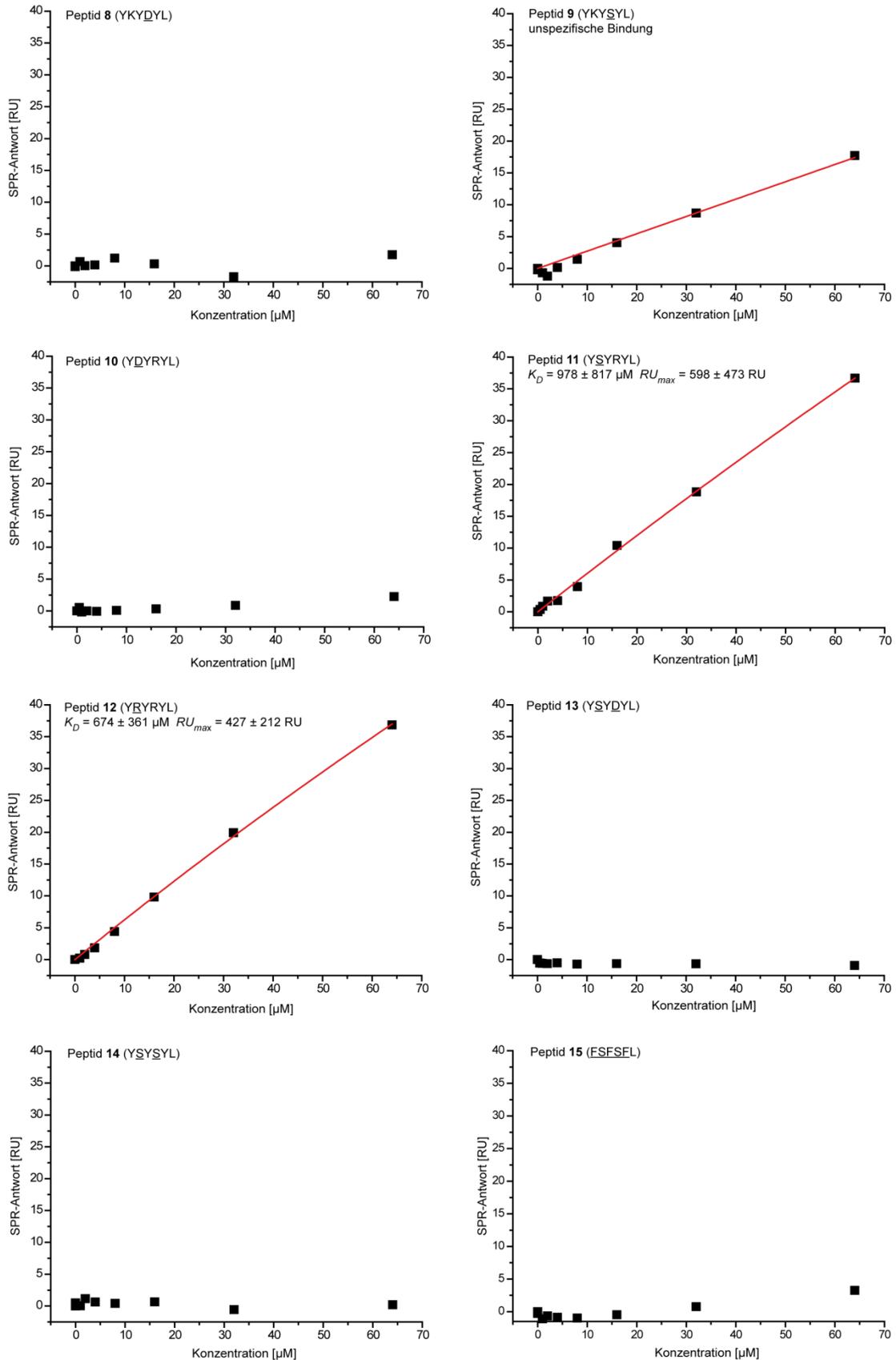


Abbildung 20: Affinitätsplots der Peptidbibliothek B2. Die gegenüber der Leitstruktur mutierten Aminosäuren sind in der Sequenz unterstrichen. Peptide 8–11, sowie 14 und 15 wurden mit 108 fmol immobilisiertem ACE2 und Peptid 12 und 13 mit 31 fmol immobilisiertem ACE2 untersucht.

Von den Peptiden aus der Peptidbibliothek B2 zeigen nur die Peptide **9**, **11** und **12** eine Bindung zum ACE2-Rezeptor. Bei den anderen Peptiden war keine signifikante Interaktion mit der Chipoberfläche zu beobachten. Diese Ergebnisse bekräftigen noch mal die Rolle der positiven Ladung bei der Bindung der Leitstruktur **1** an das ACE2. Wenn eine der beiden positiv geladenen Aminosäuren K439 und R441 gegen das neutral geladene Serin substituiert wird, dann ist noch eine Interaktion mit dem ACE2-Rezeptor zu beobachten. Das Peptid **9**, in dem das positiv geladene Arginin gegen das neutrale Serin substituiert wurde, zeigt im untersuchten Konzentrationsbereich allerdings kein spezifisches Bindungsverhalten, was durch eine Gerade im Affinitätsplot deutlich wird. Für Peptid **11** ergibt sich ein K_D -Wert von $978 \pm 817 \mu\text{M}$. Der K_D -Wert liegt somit um den Faktor 20 höher als der der Leitstruktur. Wird eine der positiven Aminosäuren durch die negativ geladene Asparaginsäure substituiert, dann findet keine Bindung an den Rezeptor statt. Zusammenfassend lässt sich über die Substitution der positiv geladenen Aminosäuren K439 und R441 der Leitstruktur $^{438}\text{YKYRYL}^{443}$ durch negativ geladene und neutrale Aminosäure also sagen, dass die Bindung zum humanen Rezeptorprotein bei einer neutralen Substitution stark geschwächt wird und bei einer negativen Substitution gar nicht mehr zustande kommt.

Durch SPR-Messungen von Peptid **12** mit der Mutation K439R sollte geklärt werden, ob die Größe der positiv geladenen Seitenkette des K439 einen Einfluss auf die Bindung von Peptid **1** zum ACE2 hat. Der Ersatz der Aminofunktion des Lysins durch die Guanidiniumgruppe des Arginins könnte zu einer Steigerung der Bindung führen. Durch die thermodynamische Bindungsanalyse von Peptid **12** ergibt sich allerdings eine Bindungskonstante von $K_D = 674 \pm 361 \mu\text{M}$. Die Bindung von Peptid **1** an den humanen Rezeptor wird durch die Mutation K439R also stark abgeschwächt.

Auch die SPR-Messungen der mehrfach substituierten Peptide **13**, **14** und **15** bestätigen die bisher gewonnenen Erkenntnisse. Keines der Peptide zeigt eine Bindung zum ACE2-Rezeptor. Insgesamt konnten durch die SPR-Messungen mit punktmutierten Peptiden also die Erkenntnisse des Alanin-scans, dass die positiv geladenen Aminosäuren K439 und R441 eine wichtige Rolle für die Bindung zum ACE2 spielen, bestätigt werden.

Außerdem wurden noch SPR-Messungen mit dem Peptid **16** durchgeführt. In diesem Peptid wurde die Sequenz der Leitstruktur um drei Aminosäuren zum N-Terminus der RBD des SARS-CoV hin verlängert. Die thermodynamische Bindungsanalyse (Abbildung 21) von Peptid **16** ergibt einen K_D -Wert von $200 \pm 13 \mu\text{M}$. Der RU_{max} -Wert liegt mit $556 \pm 30 \text{RU}$ über den $\text{RU}_{\text{max,theo}}$ -Wert von 140RU .

Das Hexapeptid **1** liegt als freies Peptid in einer anderen Konformation als in der RBD vor. Die etwa vierfach stärkere Bindung von Peptid **1** an ACE2 spricht dafür, dass das kürzere Hexapeptid **1** eine bessere Möglichkeit hat, sich der Rezeptoroberfläche anzunähern als das Nonapeptid **16**. Diese Tatsache untermauert die Theorie, dass es sich bei der Leitstruktur **1** ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ um ein minimales Bindungsmotiv des S-Proteins zum humanen Zellrezeptor ACE2 handelt.

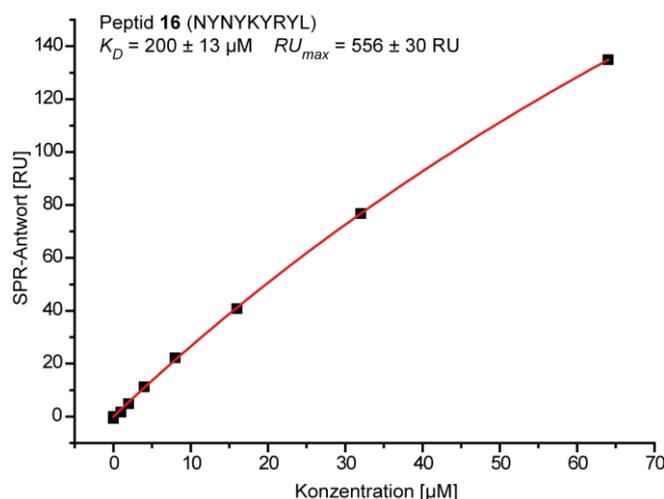


Abbildung 21: Thermodynamische Bindungsanalyse des Peptids **16** mit 108 fmol immobilisiertem ACE2. Es wurden Peptidkonzentrationen zwischen 0.5 und 64 µM analysiert.

Um abschließend die spezifische Bindung von Peptid **1** zum Zellrezeptor ACE2 zu untersuchen, wurde noch das Peptid **17**, das die Aminosäuren der Leitstruktur in einer anderen Reihenfolge wiedergibt, auf seine Bindungsaffinität zum ACE2-Rezeptor untersucht. Falls die Bindung von Peptid **1** nur in der unspezifischen Wechselwirkung von aromatischen und positiv geladenen Gruppen des Peptids mit der Proteinoberfläche begründet sein sollte, müsste das Peptid **17** mit der Sequenz RYYYLK eine Bindungskonstante in derselben Größenordnung wie die Leitstruktur **1** liefern. Wenn man die maximalen RU-Antworten einer Konzentrationsreihe von Peptid **17** gegen die Konzentration aufträgt, ergibt sich eine Gerade (Abbildung 22). Peptid **17** zeigt also keine spezifische Bindung zum ACE2-Rezeptor. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Wechselwirkung zwischen Peptid **1** und dem Rezeptor spezifischer Natur sind.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

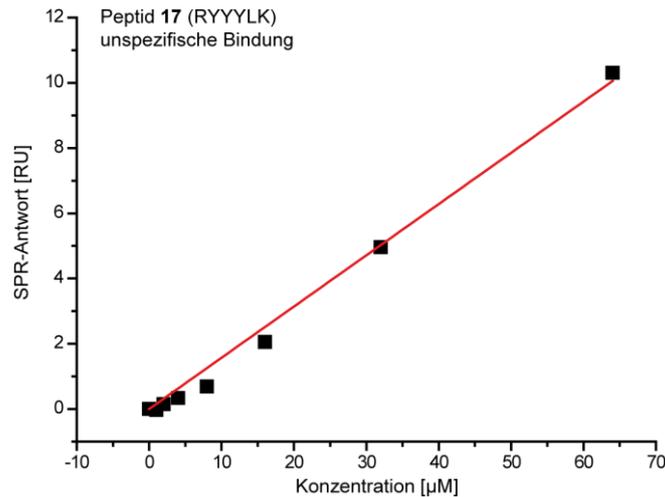


Abbildung 22: Thermodynamische Bindungsanalyse von Peptid 17 mit 31 fmol immobilisiertem ACE2. Die Datenpunkte liegen auf einer Geraden und deuten somit auf eine unspezifische Bindung hin.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der SPR-Messungen mit der Peptidbibliothek B2 zusammengefasst.

Tabelle 3: SPR-Ergebnisse der Peptidbibliothek B2. Die Peptide 8, 10, 13, 14 und 15 zeigen kein Bindungsverhalten zum ACE2. Für das Peptid 9 konnte im analysierten Konzentrationsbereich kein spezifisches Bindungsverhalten zum ACE2 detektiert werden. Die Peptide 11, 12 und 16 zeigen eine schwächere Bindung an den ACE2-Rezeptor als die Leitstruktur 1 und RU_{max} -Werte, die deutlich über den $RU_{max,theo}$ -Werten liegen.

Peptid	Sequenz	Mutation	Spez. Bindung zu ACE2	K_D [µM]	RU_{max}	$RU_{max,theo}$
1	⁴³⁸ YK Y R Y L ⁴⁴³	-	ja	51 ± 6	202 ± 16	98
8	Y K Y D Y L	R441D	nein	-	-	-
9	Y K Y S Y L	R441S	nein	-	-	-
10	Y D Y R Y L	K439D	nein	-	-	-
11	Y S Y R Y L	K439S	ja	978 ± 817	598 ± 473	93
12	Y R Y R Y L	K439R	ja	674 ± 361	427 ± 212	101
13	Y S Y D Y L	K439S R441D	nein	-	-	-
14	Y S Y S Y L	K439S R441S	nein	-	-	-
15	F S F S F L	K439S R441S Y438/440/442F	nein	-	-	-
16	⁴³⁵ N Y N Y K Y R Y L ⁴⁴³	-	ja	200 ± 13	556 ± 30	140
17	R Y Y Y L K	-	nein	-	-	-

4.3.3 Synthese und SPR-Messungen von weiteren S-Protein Peptiden als Negativkontrolle für die Interaktion zwischen ACE2 und Peptid 1

Neben den in 4.3.1 vorgestellten Peptiden wurden noch zwei weitere Peptide, die einen anderen Teil der RBD des S-Proteins wiedergeben, synthetisiert und mittels SPR-Messungen auf ihre Bindungsaffinität zum ACE2-Rezeptor analysiert. Dabei konnte für beide Peptide keine Interaktion mit dem ACE2 observiert werden.

Zum einen wurde das Peptid **18** mit der Sequenz ⁴²⁷NIDATS⁴³² und zum anderen das Peptid **19** mit der Sequenz ⁴⁵¹FERDIS⁴⁵⁶ synthetisiert. Abbildung 23 zeigt die Sequenz der RBD, wobei die Leitstruktur Grün und die Peptide **18** und **19** Gelb hinterlegt sind. Peptid **18** befindet sich bezüglich der Leitstruktur also näher am N-Terminus und Peptid **19** näher am C-Terminus des S-Proteins. Beide Peptide dienen als Negativkontrollen für Untersuchungen mit der Leitstruktur **1**.

```

      310          320          330          340          350          360
QTSNFRVVVPS GDVVRFPNIT NLCPFGEVFN ATKFPVSYAW ERKKISNCVA DYSVLYNSTF
      370          380          390          400          410          420
FSTFKCYGVS ATKLNLDLCS NVYADSEFVVK GDDVRQIAPG QTGVIADYNY KLPDDFMGCV
      430          440          450          460          470          480
LAWNTRNIDA TSTGNYNKY RYL RHGKLRP FERDISNVPF SPDGKPCPPP ALNCYWPLND
      490          500          510          520          530          540
YGFYTTTGIG YQPYRVVVLV FELLNAPATV CGPKLSTDLI KNQCVNFNFN GLTGTGVLTP
    
```

Abbildung 23: Sequenz der RBD des S-Proteins; Die Leitstruktur **1** ist in Grün und die Referenzpeptide **18** und **19** in Gelb hinterlegt. Potentielle N-Glycosylierungsstellen sind durch ein Rot markiertes N dargestellt.

Beide Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese nach AAV 3 synthetisiert (Tabelle 4), gereinigt, charakterisiert und anschließend mittels SPR untersucht.

Tabelle 4: Übersicht der Peptide **18** und **19** aus der RBD des S-Proteins.

Peptid	Sequenz	Ausbeute [%]
18	⁴²⁷ NIDATS ⁴³²	30
19	⁴⁵¹ FERDIS ⁴⁵⁶	26

Die SPR-Messungen von Konzentrationsreihen der Peptide **18** und **19** in Zink(II)-haltigem TBS wurden mit dem in 4.3.2 beschriebenen Chip mit 108 fmol ACE2 durchgeführt. Beide Peptide zeigen negative, unspezifische RU-Antworten. Die Auftragungen

der jeweiligen maximalen RU-Antworten gegen die Konzentration sind in Abbildung 24 dargestellt.

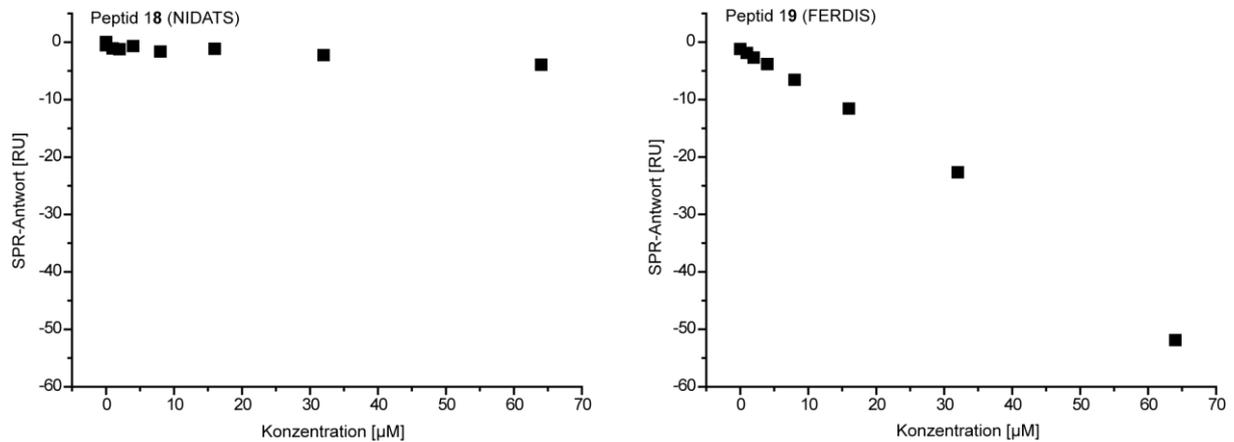


Abbildung 24: Thermodynamische Bindungsanalyse der Peptide **18** und **19**. Beide Peptide zeigen negative RU-Antworten und keine Bindung zum ACE2.

4.3.4 SPR-Studien mit einem Fusionsprotein aus dem S-Protein

Neben den synthetisierten Peptiden **1-19** wurde noch ein rekombinantes S-Fusionsprotein erworben und SPR-spektroskopisch auf seine Bindung zum ACE2-Rezeptor untersucht. Aus der SPR-Analyse ergab sich für das S-Fusionsprotein eine um den Faktor sechs höhere Bindung zum ACE2 als die der Leitstruktur **1**.

Das rekombinante Protein besteht aus einer Fusion der Aminosäuren Y408-P470 mit den Aminosäuren P540-I573 des S-Proteins des SARS-CoV. Ein Teilausschnitt der Sequenz des S-Proteins ist in Abbildung 25 dargestellt. Die RBD ist dabei Schwarz markiert, die Leitstruktur ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ unterstrichen und das S-Fusionsprotein Gelb hinterlegt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

```

      310          320          330          340          350          360
QTSNFRVVPS GDVVRFPNIT NLCPFGEVFN ATKFPSVYAW ERKKISNCVA DYSVLYNSTF

      370          380          390          400          410          420
FSTFKCYGVS ATKLNDLCFS NVYADSEFVVK GDDVRQIAPG QTGVIADYNY KLPDDFMGCV

      430          440          450          460          470          480
LAWNTRNIDA TSTGNNYKY RYLRHGKLRP FERDISNVPF SPDGKPCTPP ALNCYWPLND

      490          500          510          520          530          540
YGFYTTTGIG YQPYRVVVLS FELLNAPATV CGPKLSTDLI KNQCVNFNFN GLTGTGVLTP

      550          560          570          580          590          600
SSKRFQPFQQ FGRDVSDFTD SVRDPKTSEI LDIISPCSFGG VSVITPGTNA SSEVAVLYQD

```

Abbildung 25: Ausschnitt aus der Sequenz des S-Protein des SARS-CoV, wobei die schwarz markierten Aminosäuren die RBD wiedergeben, die Leitstruktur unterstrichen und das rekombinante S-Fusionsprotein in Gelb hinterlegt ist. Potentielle N-Glycosylierungsstellen sind durch ein Rot markiertes N dargestellt.

Es sind also 28% der RBD im S-Fusionsprotein enthalten. Außerdem ist auch die Leitstruktur **1** ein Teil des rekombinanten Proteins.

Neben den Aminosäuren des S-Proteins ist im rekombinanten S-Fusionsprotein noch einen Glutathion-S-Transferase (GST)-tag enthalten, welcher ein Molekulargewicht von 26 kDa besitzt. Damit ergibt sich für das gesamte rekombinante S-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 34 kDa. Die SPR-Messungen mit diesem Protein wurden mit dem Chip, auf dem 31 fmol ACE2 immobilisiert sind, durchgeführt. Bei einer vollständigen 1:1 Bindung zwischen den beiden Proteinen würde sich eine maximale theoretische $RU_{max,theo}$ -Antwort von 1065 RU ergeben. Vor den Messungen wurde das Protein nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in einen Zink(II)-haltigen TBS gebracht und eine Konzentrationsreihe zwischen 0.046 μ M und 11.8 μ M angesetzt und auf ihre Bindung zum ACE2 analysiert. Nach Auftragung der jeweiligen maximalen RU-Antwort gegen die Konzentration und anschließender Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell ergibt sich eine thermodynamische Bindungskonstante von $K_D = 7.7 \pm 0.8 \mu$ M und eine RU_{max} -Antwort von 1478 ± 79 RU. Das rekombinante S-Fusionsprotein bindet also um den Faktor sechs stärker an das ACE2-Protein als die Leitstruktur **1**. Es erreicht aber nicht annähernd die Bindungsaffinität des kompletten S-Proteins des SARS-CoV, welches mit einem per SPR ermittelten K_D -Wert von 1.7 nM an ACE2 bindet.¹²¹

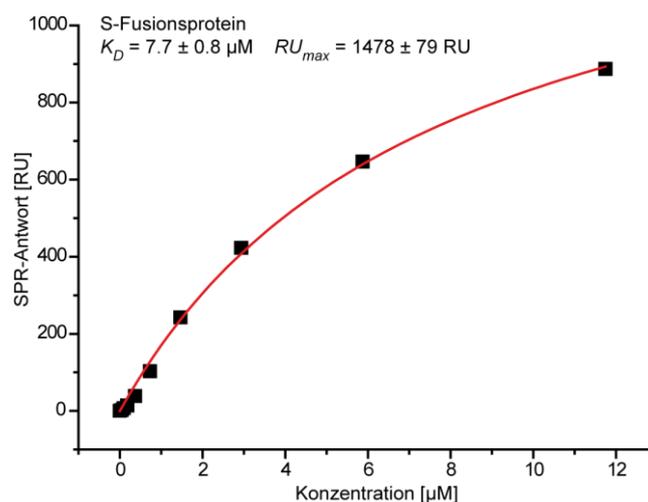


Abbildung 26: Bindungsanalyse des rekombinanten S-Fusionsproteins mit 31 fmol immobilisiertem ACE2. Die Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell ergibt eine spezifische Bindung zwischen den beiden Proteinen.

Da das rekombinante S-Fusionsprotein stärker an das ACE2 bindet als die Leitstruktur **1** steht es als potentiell Reagenz für Kompetitivexperimente zur Verfügung. Ein solches Experiment ist die in 2.5 beschriebene STD-NMR-Kompetitivtitration. Um eine solche Titration durchführen zu können, muss allerdings das Bindungsverhalten der Leitstruktur **1** an das ACE2-Rezeptorprotein per STD-NMR-Spektroskopie untersucht werden.

4.4 STD-NMR-Experimente mit Peptid **1** und dem ACE2-Rezeptor

Durch STD-NMR-Experimente kann die Bindung eines Liganden an ein Rezeptormolekül mit atomarer Auflösung analysiert werden. Dabei ist es sowohl möglich die Bindungsaffinität eines Liganden als auch sein Bindungsepitop zu ermitteln. Durch STD-Experimente von Peptid **1** mit dem humanen Zellrezeptor ACE2 wurde die in 4.3 per SPR detektierte spezifische Interaktion im niedrigen mikromolaren Bereich bestätigt. Außerdem konnte das Bindungsepitop von Peptid **1** an ACE2 aufgestellt werden.

Vor Beginn der NMR-Experimente wurden 10 μg des rhACE2 zunächst nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in ein deuteriertes Zink(II)-haltiges *d*TBS Puffersystem gebracht.

4.4.1 Bestimmung der Bindungsaffinität

Um die Bindungsaffinität der Leitstruktur **1** an den humanen Zellrezeptor ACE2 zu überprüfen, wurde eine STD-NMR-Titration durchgeführt. Dafür wurden aus einer Stammlösung von Peptid **1** in *d*TBS Peptidkonzentrationen von 15 bis 222 μM in der

Proteinlösung eingestellt. Diese Konzentrationen entsprechen einem 18- bis 288-fachen Ligandüberschuss gegenüber der Konzentration des ACE2 in der Lösung.

Abbildung 27 zeigt oben das ^1H -STD-Spektrum (Hellblau) der Bindung des Peptids **1** an rhACE2 für eine Probe mit 144-fachem Ligandüberschuss. Unten ist das ^1H -NMR-Referenzspektrum (Dunkelblau) abgebildet. Es ist ein deutlicher Sättigungstransfer auf den Liganden zu erkennen, was durch eindeutige Signale im STD-Spektrum zu erkennen ist. Die stärkste Sättigung von 7.8% wird dabei auf die $\text{H}\epsilon/\epsilon'$ -Protonen des Y440 übertragen.

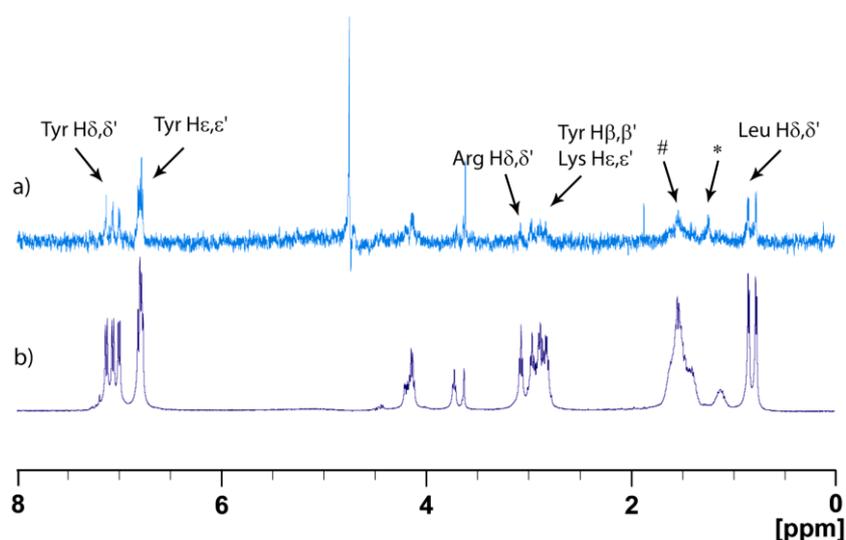


Abbildung 27: Sättigungstransfer von ACE2 auf das Peptid **1**. Oben (Hellblau): ^1H -STD-Spektrum, Unten (Dunkelblau): ^1H -NMR-Spektrum von Peptid **1**; * = Verunreinigung, # = Proteinrestsignale.

Da bei STD-Experimenten Artefakte auftreten können, wurde außerdem eine Probe untersucht, die nur 222 μM von Peptid **1** in $d\text{TBS}$ und kein Protein enthielt. Diese Ligandkonzentration entspricht der höchsten Konzentration in der STD-NMR-Titration. Im resultierenden ^1H -STD-Spektrum sind Signale mit absoluten STD-Effekten von durchschnittlich 3% zu beobachten, wobei die $\text{H}\epsilon/\epsilon'$ -Protonen des Y442 mit 5.2 % die stärkste und die $\text{H}\delta/\delta'$ -Protonen des Y438 mit 2.2% die schwächste Sättigung erfahren. Um die Artefakte zu berücksichtigen, wurden alle in der Titration ermittelten absoluten STD-Prozente um die Artefaktwerte korrigiert.

Um die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D zu erhalten, wurden für die einzelnen Protonensignale die jeweiligen STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und nach dem *one-site-binding*-Modell analysiert. Abbildung 28 zeigt die Bindungskurven für die Protonen der Leitstruktur **1**, an deren Verlauf sich das *one-site-binding*-Modell angleichen ließ.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

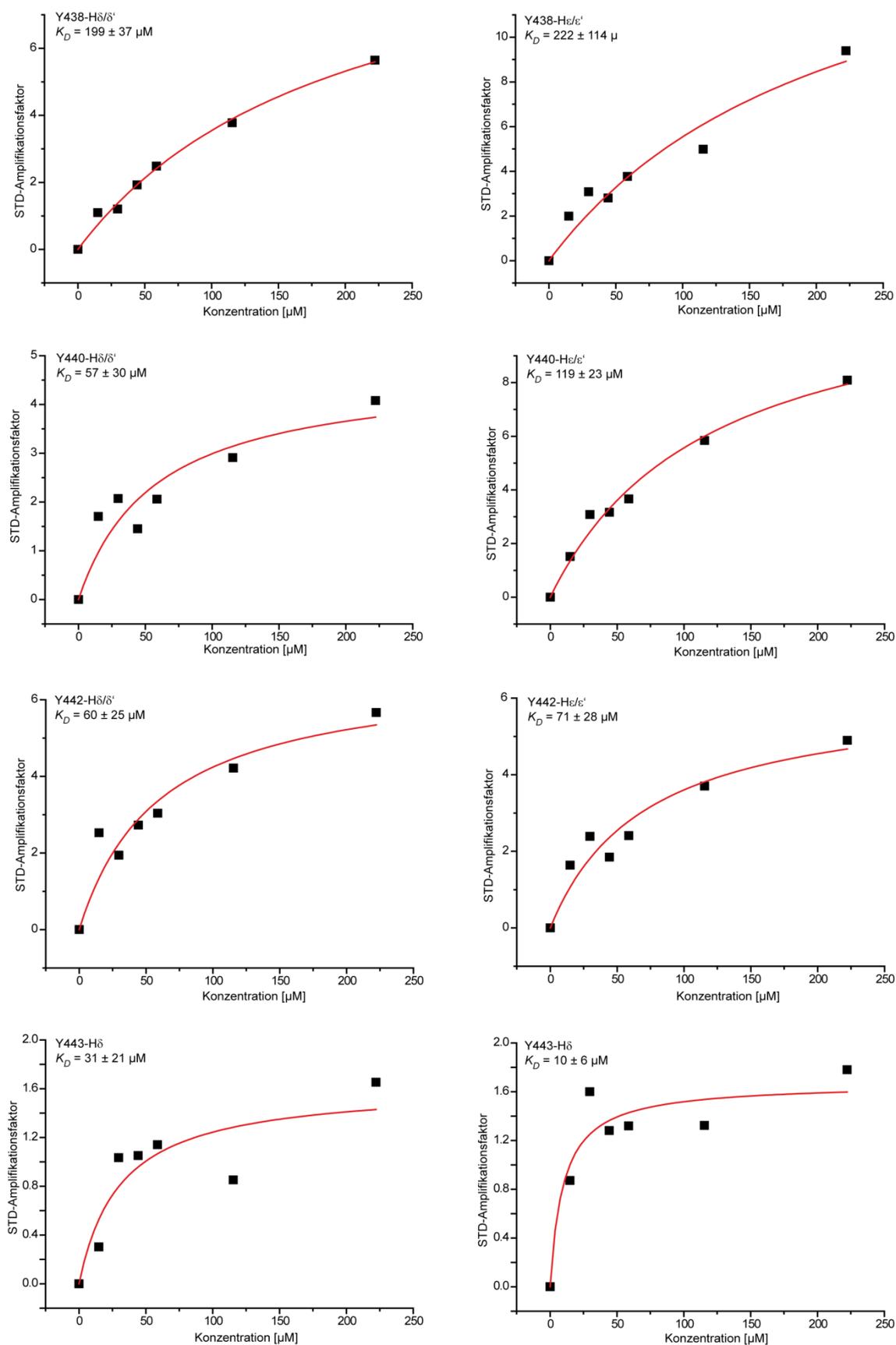


Abbildung 28: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren einiger Protonenresonanzen von Peptid **1** gegen die Ligandkonzentration. Es sind die Resonanzen für die aromatischen Protonen der drei Tyrosine und für die Methylprotonen des Leucins dargestellt.

Es ergeben sich Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich. Der niedrigste K_D -Wert von $10 \pm 6 \mu\text{M}$ ergibt sich für das $\text{H}\delta'$ -Proton des L443. Für die $\text{H}\delta/\delta'$ -Protonen des Y440 liegt der K_D -Wert bei $57 \pm 29 \mu\text{M}$ und für die $\text{H}\delta/\delta'$ -Protonen des Y442 bei $K_D = 60 \pm 25 \mu\text{M}$. Diese Bindungsaffinitäten für Peptid **1** stimmen gut mit den durch SPR ermittelten K_D -Werten von $41 \pm 12 \mu\text{M}$ überein. In Tabelle 5 sind die K_D -Werte für die einzelnen Protonen des Peptids **1** zusammengefasst.

Tabelle 5: Thermodynamische Dissoziationskonstanten K_D für die einzelnen Protonen des Peptids **1.**

δ [ppm]	Protonen	K_D [μM]
7.076	Y442- $\text{H}\delta/\delta'$	60 ± 25
7.012	Y440- $\text{H}\delta/\delta'$	57 ± 29
6.948	Y438- $\text{H}\delta/\delta'$	199 ± 36
6.761	Y442- $\text{H}\varepsilon/\varepsilon'$	71 ± 28
6.733	Y440- $\text{H}\varepsilon/\varepsilon'$	119 ± 23
6.712	Y438- $\text{H}\varepsilon/\varepsilon'$	222 ± 114
0.804	L443- $\text{H}\delta$	30 ± 21
0.725	L443- $\text{H}\delta'$	10 ± 6

4.4.2 Bestimmung des Bindungsepitops

Abbildung 29 zeigt das Bindungsepitop von Peptid **1** zum Rezeptorprotein ACE2 für einen 144-fachen Ligandüberschuss. Die höchste absolute Sättigung erfahren nach Korrektur um die Artefakte die $\text{H}\varepsilon/\varepsilon'$ -Protonen des Y440. Daher wurde für diese Protonen die relative Sättigung auf 100% gesetzt (Tabelle 6).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

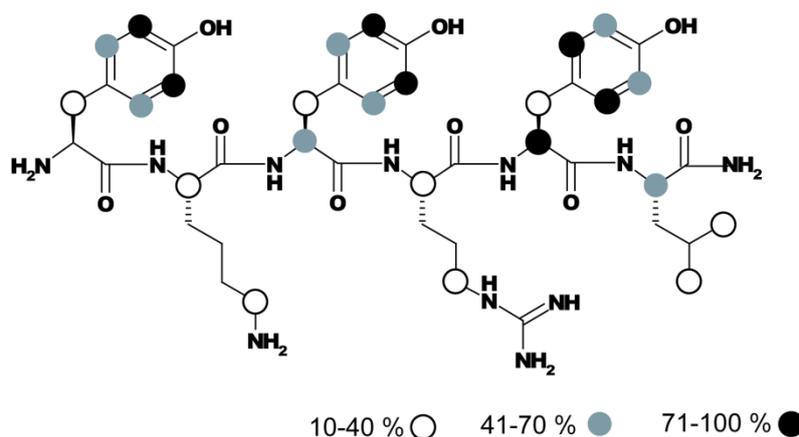


Abbildung 29: STD-NMR Bindungsepitop von Peptid 1: Die Kreise zeigen die Bereiche der relativen STD%.

Tabelle 6: Absolute und relative STD-Effekte für die Ligandprotonen von Peptid 1 bei der Bindung an den ACE2-Rezeptor.

ppm	Protonen	abs. STD [%]	rel. STD [%]
7.076	Y442-H δ/δ'	2.9	72
7.011	Y440- H δ/δ'	2.0	50
6.948	Y438- H δ/δ'	2.6	65
6.761	Y442-H ϵ/ϵ'	2.6	63
6.733	Y440- H ϵ/ϵ'	4.1	100
6.712	Y438- H ϵ/ϵ'	3.5	85
4.430	Y442-H α	3.6	89
4.385	Y440- H α	1.8	45
4.145	L443- H α	1.8	46
4.082	K439- H α ,R441- H α	1.4	33
3.026	R441- H δ/δ'	0.7	17
2.833	K439 H ϵ/ϵ' , Y(all)-H β/β'	0.6	14
0.804	L443-H δ	0.6	15
0.725	L443-H δ'	0.9	23

Am Bindungsepitop ist zu erkennen, dass alle drei Tyrosine einen Kontakt zum ACE2-Rezeptor aufweisen. Außerdem zeigen die H α -Protonen des Y442 und des L443 noch eine Nähe zur Proteinoberfläche. Die positiv geladenen Seitenketten des K439 und des R441 zeigen im Bindungsepitop moderate Wechselwirkungen mit den Protonen des ACE2. Auch die aliphatische Seitenkette des L443 ist an der Bindung zwischen dem Peptid 1 und dem Rezeptor beteiligt. Die Signale der H α -Protonen des K439 und des R441 sind im

¹H-STD-Spektrum nicht klar zu separieren. Daher kann nicht geklärt werden, ob der Sättigungstransfer vom Protein auf beide Protonen stattgefunden hat. Auch eine Differenzierung der Signale der H β -Protonen der drei Tyrosine und der H ϵ/ϵ' -Protonen des K439 ist im ¹H-STD-Spektrum nicht möglich. Daher ist auch hier nicht eindeutig zu klären, welches der Protonen die Signale im STD-Spektrum erzeugt.

In der Röntgenkristallstruktur des Komplexes der RBD mit ACE2 zeigen nur die Tyrosine Y440 und Y442 Kontakt zum Rezeptor.⁶⁰ Nach den in 4.1 beschriebenen MD-Studien interagieren die Seitenketten des Y440 und die positivgeladenen Gruppen des K439 und des R441 mit dem Rezeptormolekül. Diese Ergebnisse werden durch den in 4.2 beschriebenen Alaninscan bestätigt. Im Bindungsepitop zeigen alle Tyrosine Kontakt zum Rezeptor, was bestätigt, dass Peptid **1** als Teil der RBD einen anderen Bindungsmodus eingeht als in der freien Form. Der Einfluss der positiv geladenen Seitenketten steht im Einklang zu den Ergebnissen der STD-NMR-Titration. Die Seitenkettenprotonen H δ/δ' des R441 erfahren eine relative Sättigung von 17%, was auf eine ionische Interaktion der Guanidiniumgruppe mit dem Rezeptor hinweisen könnte. Auch das K439 weist mit relativen STD-Effekten von 14% für die H ϵ/ϵ' -Protonen Kontakt zur Rezeptoroberfläche auf. Dass die Seitenketten des Lysins und des Arginins nur eine moderate Sättigung aufweisen, steht im Einklang mit der Annahme, dass die Wechselwirkung mit dem Rezeptor über die Amino- bzw. Guanidiniumgruppe zustande kommt. Die Protonen dieser Gruppen werden durch Deuterium aus dem Lösungsmittel ausgetauscht und können somit im STD-Experiment nicht detektiert werden.

Außerdem lässt der Alaninscan noch auf eine Beteiligung des L443 von Peptid **1** an der Rezeptorbindung schließen. Im Bindungsepitop zeigen die Methylprotonen des Leucins STD-Effekte von 15% und 25%, was eine Beteiligung an der Bindung zum Rezeptormolekül verdeutlicht. Im folgenden Abschnitt werden die experimentellen STD-Effekte mit den Abständen aus der MD-Simulation verglichen.

4.4.3 Vergleich der STD-Effekte mit den Abständen aus der MD-Simulation

Um die experimentell ermittelten STD-Effekte mit den Ergebnissen aus der MD-Simulation vergleichen zu können, wurden aus den Ligand-Protein-Abständen theoretische STD-Prozente ermittelt. Hierfür wurde vereinfacht angenommen, dass das Protein gleichmäßig gesättigt wurde und diese Sättigung konstant übertragen wurde. Es wurden für jedes Proton der Leitstruktur ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ **1** die Abstände zu allen Proteinprotonen in einem Radius von 6 Å bestimmt. Jede Proton-Proton-Wechselwirkung geht mit $1/r^6$ in die

dipolare Kopplung ein. Aufgrund der intramolekularen Molekülrotation werden die Werte für chemisch-äquivalente Protonen wie die der $H\epsilon$ - und $H\epsilon'$ -Protonen gemittelt. Durch Addition aller $1/r^6$ -Komponenten für die jeweiligen Protonen des Liganden ergeben sich Werte, die proportional zur Sättigungsrate sind. Für Protonen von Methylgruppen wird auf Grund der freien Rotation nur der kürzeste Abstand berücksichtigt. Die Abstandsbestimmung wurde über die gesamte MD-Simulation durchgeführt. In Tabelle 7 sind die Summe der $1/r^6$ -Komponenten für die Abstände über die gesamte MD-Simulation gezeigt. Der größte Wert ergibt sich für die $H\epsilon$ -Protonen des Y440. Der STD_{theo} -Wert wurde für dieses Proton daher auf 100% gesetzt.

Tabelle 7: Theoretische STD% für die Ligandprotonen. Es wurden alle Ligandproton-Proteinproton-Abstände unter 6 Å über die gesamte MD-Simulation berücksichtigt. Die Summe der $1/r^6$ -Komponenten für chemische äquivalente Protonen wurde gemittelt.

		Summe ($1/r^6$) [$\cdot 10^{-5}$]	Mittelwerte Summe ($1/r^6$) [$\cdot 10^{-5}$]	STD_{theo} [%]
Y438	$H\beta'$	2.05	2.05	4
	$H\delta'$	2.36	2.36	5
K439	$H\delta$	1.10	1.10	2
	$H\epsilon$	2.01	2.91	6
	$H\epsilon'$	3.82		
Y440	$H\beta$	0.96	3.68	8
	$H\beta'$	6.39		
	$H\delta$	8.31	11.14	24
	$H\delta'$	13.98		
	$H\epsilon$	24.95	47.22	100
	$H\epsilon'$	69.49		
R441	$H\beta$	2.18	2.18	5
	$H\gamma$	1.22	1.22	3
	$H\delta$	8.96	15.37	33
	$H\delta'$	21.78		

Aus der Berechnung ergeben sich theoretische STD-Effekte für Protonen der Aminosäuren Y438, K439, Y440 und R441. Die STD-Prozente für die Protonen des Y438 und des K439 liegen allerdings unter 10% und gehen daher nicht in die Bestimmung des Bindungsepitops ein. In Abbildung 30 sind das theoretische Bindungsepitop und das experimentell bestimmte Bindungsepitop vergleichend dargestellt.

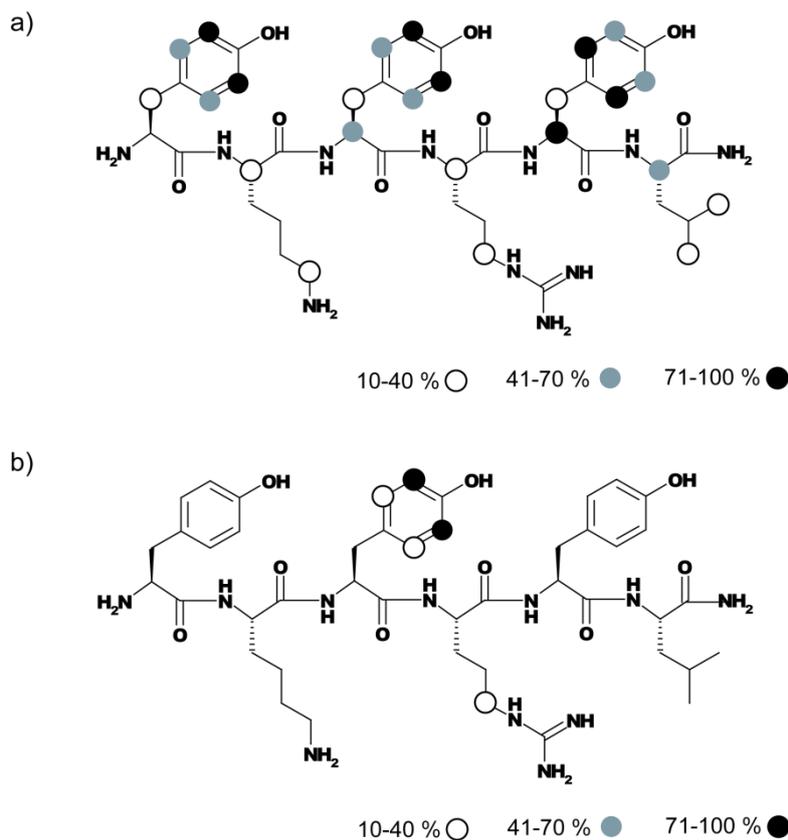


Abbildung 30: Vergleich des experimentellen und des theoretischen Bindungsepitops für die Leitstruktur 1. a) Per STD-NMR bestimmtes Bindungsepitop. b) Theoretisch berechnetes Bindungsepitop bei dem alle Abstände unter 6 Å über die gesamte MD-Simulation berücksichtigt wurden. Die Kreise zeigen die Bereiche der relativen STD%. Bei beiden Epitopen liegt der stärkste STD-Effekt auf den aromatischen H ϵ -Protonen des Y440. Dieser Wert wurde daher auf 100% gesetzt und dient als Referenz für die anderen Werte im jeweiligen Bindungsepitop.

Im experimentell per STD-NMR-Spektroskopie bestimmten Bindungsepitop treten mehr STD-Effekte auf als im berechneten Epitop, in dem nur das Y440 und das R441 STD-Prozente zeigen. Dass für das K439 keine STD-Effekte berechnet werden konnten, heißt nicht, dass es keine Nähe zum Rezeptor aufweist, da die Bindung nicht durch aliphatische Proton-Proton-Wechselwirkungen, sondern durch ionische Kräfte zustande kommt. Das R441 interagiert auch ionisch mit einer Carboxylatgruppe des Rezeptorproteins. Allgemein wird durch den Vergleich des berechneten Bindungsepitops mit dem experimentell bestimmten Bindungsepitop vor allem die Rolle des Y440 an der Rezeptorbindung untermauert.

4.5 Bindungsstudien mit YKYRYL und dem S-Fusionsprotein

Wie in 4.3.4 beschrieben, wurde ein rekombinantes S-Fusionsprotein erworben, welches in SPR-Studien eine Bindungsaffinität von $K_D = 7.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$ gegenüber dem ACE2-Rezeptor zeigt. Es besitzt damit eine um Faktor sechs größere Bindungsaffinität zum ACE2 als die

Leitstruktur ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴² **1**. Es könnte sie somit in einem in 2.5 beschriebenen STD-Kompetitivexperiment aus der Bindungsregion verdrängen und somit beweisen, dass die Leitstruktur **1** trotz des postulierten modifizierten Bindungsmodus immer noch dieselbe Bindungsregion wie die RBD aufweist. Um das Kompetitivexperiment durchführen zu können, muss eine Interaktion von Peptid **1** mit dem rekombinanten S-Fusionsprotein ausgeschlossen werden. Daher wurden zunächst STD-NMR-Experimente mit der Leitstruktur **1** und dem S-Fusionsprotein durchgeführt. Diese NMR-Experimente zeigten, dass die Leitstruktur **1** auch eine Interaktion mit dem S-Fusionsprotein eingeht. Um die Spezifität dieser Wechselwirkung weiter zu analysieren, wurden anschließend SPR-Messungen durchgeführt. Das S-Fusionsprotein wurde hierfür auf einen CM5-Chip immobilisiert. Die SPR-Studien konnten eine Bindung von Peptid **1** an das S-Fusionsprotein bestätigen. Die Spezifität der Bindung konnte jedoch nicht geklärt werden.

4.5.1 STD-NMR-Studien zur Analyse der Bindung von Peptid 1 an das S-Fusionsprotein

Um die STD-NMR-Studien mit Peptid **1** und dem S-Fusionsprotein durchführen zu können, wurde das Protein zunächst nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in dasselbe Zink(II)-haltige *d*TBS Puffersystem gebracht, in dem auch die in 4.4 beschriebenen Experimente durchgeführt wurden. Die NMR-Experimente wurden mit einer 0.31 μ M Protein-Lösung durchgeführt. Es wurden Ligandkonzentrationen von **1** in *d*TBS Peptidkonzentrationen zwischen 16 und 245 μ M in der Proteinlösung eingestellt. Diese Konzentrationen entsprechen einem 55- bis 874-fachen Ligandüberschuss gegenüber dem Protein.

Abbildung 31 zeigt oben das ¹H-NMR-Spektrum (Dunkelblau) und unten das ¹H-NMR-Referenzspektrum (Grün) von Peptid **1** für eine Probe mit einer Ligandkonzentration von 65 μ M. Diese Konzentration stellt einen 218-fachen Ligandüberschuss dar. In der Mitte der Abbildung ist das ¹H-Artefaktspektrum (Hellblau) für eine Probe dargestellt, die dieselbe Ligandkonzentration und kein Protein enthält.

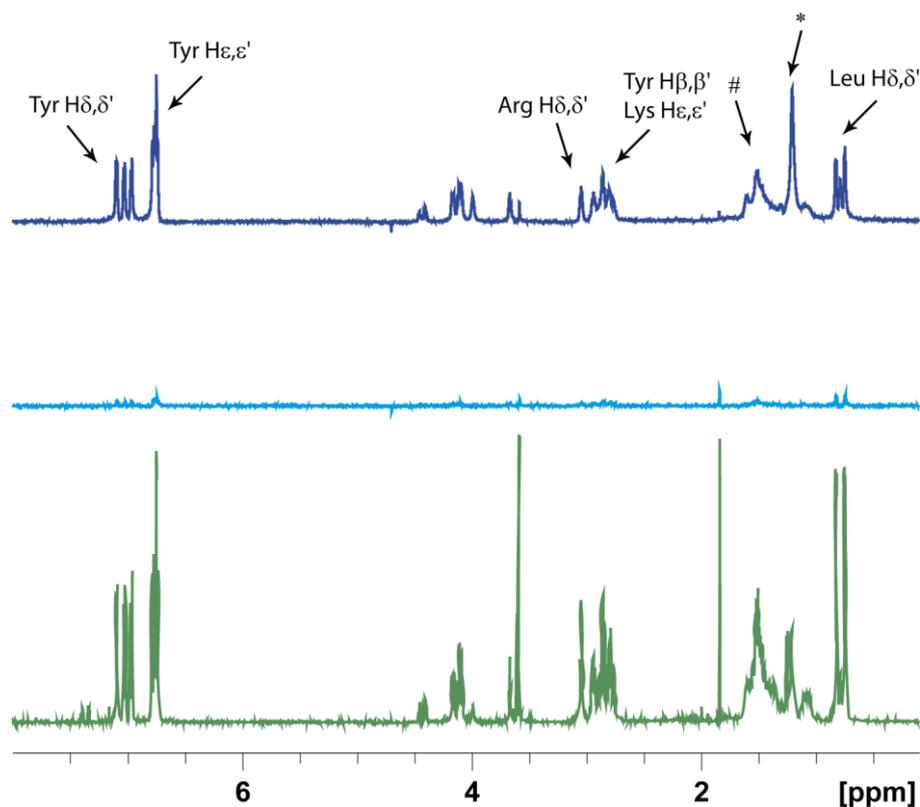


Abbildung 31: Sättigungstransfer von dem S-Fusionsprotein auf das Peptid **1**. Oben (Blau): ^1H -STD-Spektrum, Mitte (Hellblau): Artefaktspektrum; Unten (grün): ^1H -NMR-Referenzspektrum von **1**; * und # = Verunreinigung des *d*TBS.

Im STD-Spektrum sind deutliche Signale des Liganden **1** zu erkennen. Es findet also ein Sättigungstransfer von den Protonen des S-Fusionsproteins auf die Protonen des Liganden statt. Die größte Sättigung lässt sich mit 55% für die $\text{H}\epsilon/\epsilon'$ -Protonen des Y440 beobachten. Die im Artefaktspektrum beobachteten Signale liegen bei durchschnittlich 2%. Für die weitere Betrachtung der STD-Prozente wurden diese durch Abzug der Artefaktsignale korrigiert.

Das S-Fusionsprotein besitzt neben den Aminosäuren aus dem S-Protein noch einen Glutathion-S-Transferase (GST)-tag. Dieser tag stellt mit einem Molekulargewicht von 26 kDa 75% des gesamten rekombinanten S-Fusionsproteins dar. Um auszuschließen, dass die in Abbildung 31 gezeigte Sättigung von Peptid **1** durch den GST-tag verursacht wird, wurde ein NMR-STD-Experiment von **1** mit dem GST-tag durchgeführt. Dazu wurde Glutathion-S-Transferase erworben und in das Messpuffersystem (*d*TBS, siehe 7.6.1) gebracht. Die Artefaktmessung wurde mit einer 2.14 μM Proteinlösung durchgeführt. Dabei wurde eine Peptidkonzentration von 433 μM in der Proteinlösung eingestellt, was einem Ligandüberschuss von 218 entspricht. Abbildung 32 zeigt das unten das ^1H -STD-Spektrum

(Hellblau) und oben das ^1H -STD-Artefaktspektrum (Dunkelblau) für Proben mit diesem Ligandüberschuss an Peptid **1**.

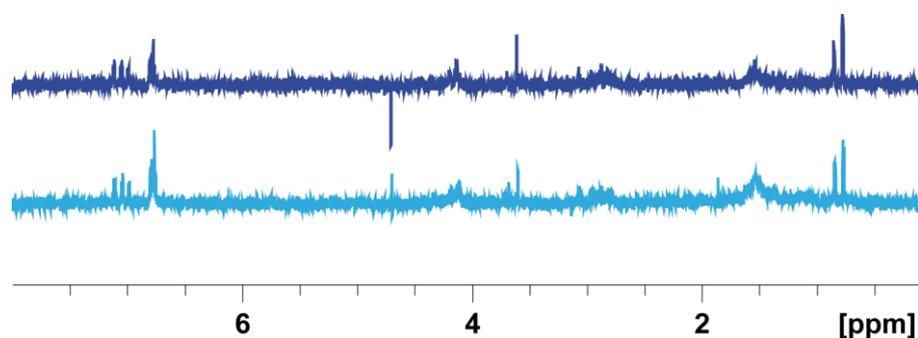


Abbildung 32: Negativkontrolle: STD-Titration gegen den GST-*tag*. Oben: Artefakt-Spektrum; Unten: STD-Spektrum. In beiden Spektren ergeben sich absoluten STD% von durchschnittlichem 1%.

Die absoluten STD% liegen sowohl im STD-Spektrum als auch im Artefaktspektrum bei durchschnittlich 1%. Daher kann eine Bindung der Leitstruktur **1** an den GST-*tag* ausgeschlossen werden. Die Bindung zwischen dem Peptid **1** und dem rekombinanten S-Fusionsprotein beruht also auf Wechselwirkungen zwischen dem Peptid mit dem S-Proteinanteil. Um zu klären, ob diese Bindung spezifischer Natur ist, wurde die Bindungsaffinität von Peptid **1** an das S-Fusionsprotein ermittelt. Dazu wurden die jeweiligen STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und mittels des *one-site-binding*-Modells analysiert. In Abbildung 33 sind die Bindungskurve für die aromatischen Protonen der drei Tyrosine dargestellt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

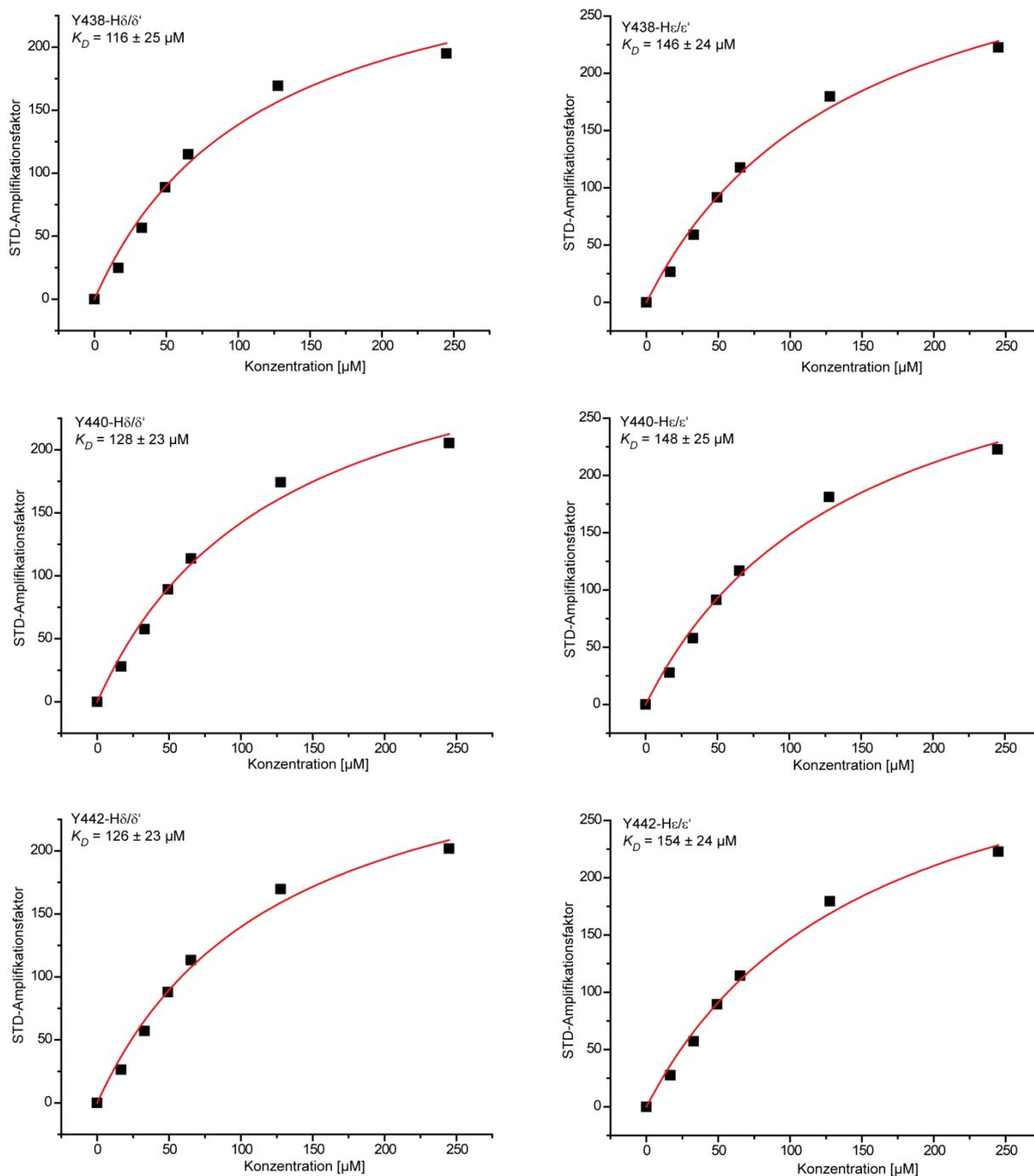


Abbildung 33: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren der H δ / δ' -Protonen und der H ϵ / ϵ' -Protonen der Tyrosine vom Peptid **1** gegen die Ligandkonzentration.

Es ergaben sich Dissoziationskonstanten zwischen $116 \pm 25 \mu\text{M}$ für die H δ / δ' -Protonen des Y438 und $154 \pm 24 \mu\text{M}$ für die H ϵ / ϵ' -Protonen des Y442. Das Peptid **1** bindet also um den Faktor zwei schlechter an das S-Fusionsprotein als an den ACE2-Rezeptor. Alle K_D -Werte sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: K_D -Werte der einzelnen aromatischen Protonen für die Bindung von Peptid **1** an das S-Fusionsprotein

δ [ppm]	Protonen	K_D [μ M]
7.076	Y442-H δ / δ'	126 ± 23
7.012	Y440-H δ / δ'	128 ± 23
6.948	Y438- H δ / δ'	116 ± 25
6.761	Y442-H ϵ / ϵ'	154 ± 24
6.733	Y440- H ϵ / ϵ'	148 ± 25
6.712	Y438- H ϵ / ϵ'	146 ± 24

Im STD-Experiment erfahren die H ϵ / ϵ' -Protonen des Y440 mit absoluten STD-Effekten von 41% die stärkste Sättigung. Um das Bindungsepitop der Leitstruktur **1** an das S-Fusionsprotein zu ermitteln, wurden die relativen STD-Prozente für diese Protonen auf 100% gesetzt und die relativen STD-Prozente für die anderen Protonen auf diese bezogen. In Abbildung 34 ist das Bindungsepitop von Peptid **1** dargestellt.

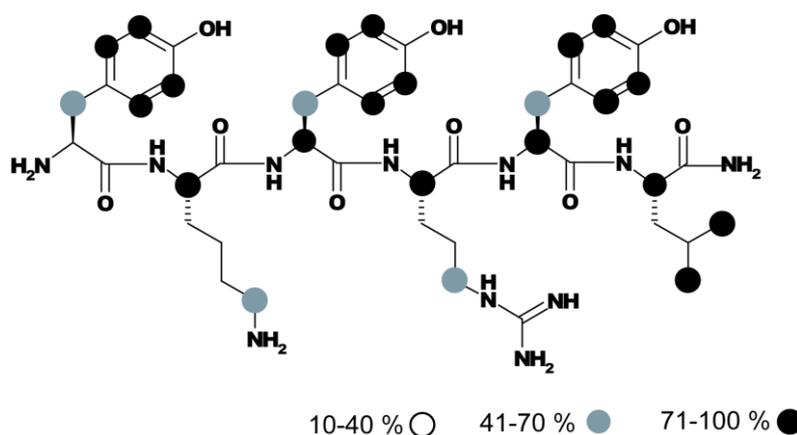


Abbildung 34: Bindungsepitop von Peptid **1** an das S-Fusionsprotein. Die Kreise geben die Nähe des jeweiligen Ligandprotons zum Protein wieder. Die Signale der H α -Protonen des K439 und des R441 und die Signale der H β / β' -Protonen des Y440 und Y438 überlagern sich im STD-Spektrum. Daher ist nicht genau geklärt, welches Proton den Beitrag zur Sättigung liefert.

Tabelle 9: Absolute und relative STD-Prozente für Protonenresonanzen von Peptid 1 nach einem Sättigungstransfer vom S-Fusionsprotein

ppm	Protonen	abs. STD [%]	rel. STD [%]
7.091	Y442-H δ/δ'	39	94
7.026	Y440- H δ/δ'	40	96
6.967	Y438- H δ/δ'	39	93
6.776	Y442-H ϵ/ϵ'	41	99
6.754	Y440- H ϵ/ϵ'	41	100
6.734	Y438- H ϵ/ϵ'	41	99
4.452	Y442-H α	33	79
4.403	Y440- H α	30	73
4.161	L441- H α	33	79
4.100	K439- H α , R441- H α	31	75
3.046	R441- H δ/δ'	25	60
2.940	Y442-H β/β'	27	66
2.860	K439-H ϵ/ϵ'	27	65
2.778	Y440- H β/β' , Y438- H β/β'	27	65
0.822	L443-H δ	30	72
0.748	L443-H δ'	31	75

Es ist zu erkennen, dass sich die Sättigung über den gesamten Liganden verteilt und alle Protonen eine ähnlich starke Sättigung erfahren. Die größte Sättigung erfahren hierbei die aromatischen Protonen der drei Tyrosine und die Methylprotonen des Leucins. Auch die H α -Protonen im *backbone* des Peptids besitzen hohe relative STD-Effekte. Die Tatsache, dass alle Ligandprotonen eine ähnliche starke Sättigung erfahren, könnte ein Hinweis für eine unspezifische Bindung sein. Die in Abbildung 33 gezeigten Bindungskurven aus der STD-Titration sprechen allerdings für ein spezifisches Bindungsereignis zwischen Peptid **1** und dem S-Fusionsprotein.

Die Leitstruktur **1** zeigt sowohl im STD-Experiment mit dem humanen Zellrezeptor ACE2 als auch mit dem S-Fusionsprotein eine Bindung des Peptids an das jeweilige Protein. Daher sind die Grundvoraussetzungen für das STD-Kompetitiv-Experiment nicht erfüllt und es wurde auf eine Durchführung verzichtet.

Um die Spezifität der Bindung des Peptids **1** an das S-Fusionsprotein genauer zu untersuchen, wurden ergänzend zu den STD-Experimenten SPR-Studien durchgeführt.

4.5.2 SPR-Studien von Peptid 1 mit den S-Fusionsprotein

Vor den SPR-Messungen mit dem Peptid 1 und dem S-Fusionsprotein wurde zunächst eine Negativkontrolle mit der Glutathion-S-Transferase durchgeführt. Dazu wurde der GST-tag mittels Standard-Amid-Kupplung auf der Messzelle eines CM5-Chips immobilisiert. Es wurden 1360 RU des GST-tag auf den Chip gebracht, was einer Menge von 52 fmol entspricht. Eine 1:1-Bindung zwischen Peptid 1 und dem GST-Protein ergibt eine maximale theoretische RU-Antwort von 47 RU. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von Peptid 1 in TBS analysiert. Die Assoziationszeit betrug dabei 60 s und die Dissoziationszeit 600 s. In Abbildung 35 sind die SPR-Sensorgramme von den Messungen von Peptid 1 gegen den GST-tag gezeigt.

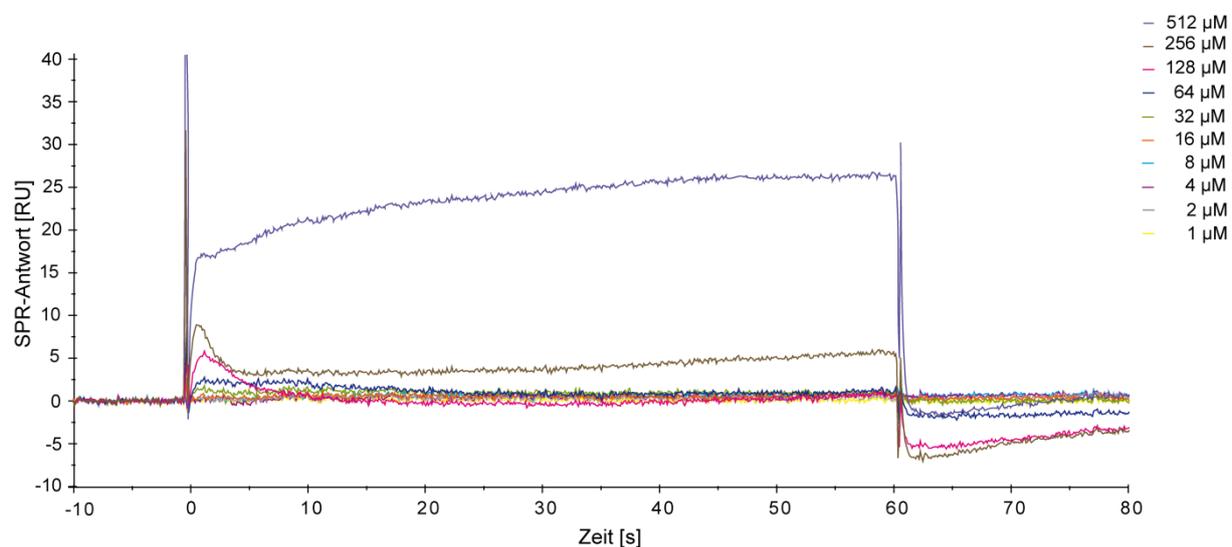


Abbildung 35: SPR-Sensorgramme von Peptid 1 gegen den GST-tag. Es wurden Konzentrationen zwischen 1 und 512 μM untersucht.

Für Peptidkonzentrationen bis 128 μM sind keine Interaktionen mit dem GST-tag zu beobachten. Lediglich für die beiden höchsten Peptidkonzentrationen von 256 und 512 μM tritt eine Wechselwirkung mit dem GST-tag auf. Der Plot der maximalen RU-Antworten gegen die Konzentration (Abbildung 36) macht deutlich, dass diese Interaktion unspezifischer Natur ist, da bei den niedrigeren Peptidkonzentrationen nur RU-Antworten von ≤ 1 RU auftreten und die beiden höchsten RU-Antworten auf einer Gerade liegen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

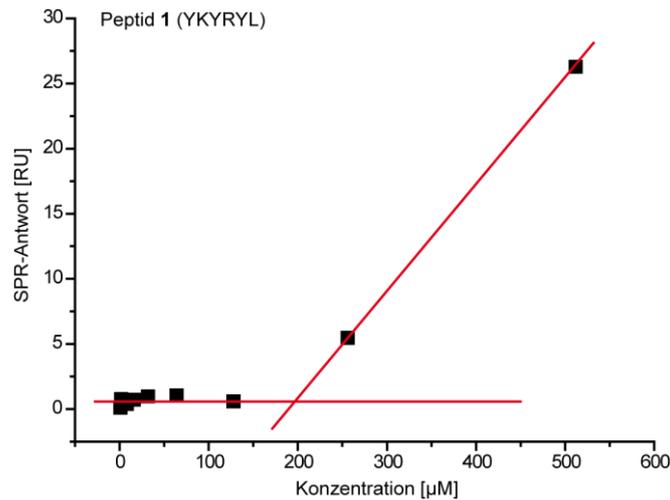


Abbildung 36: Auftragung der maximalen RU-Antworten gegen die Konzentration von Peptid 1 für SPR-Messungen mit 52 fmol GST.

Es konnte also auch per SPR gezeigt werden, dass keine Interaktion zwischen Peptid 1 und dem GST-*tag* stattfindet.

Für SPR-Messungen mit dem S-Fusionsprotein wurde anschließend eine Immobilisierung des Proteins mittels Standard-Amid-Kupplung durchgeführt. Dazu wurden 107 µg des Proteins mittels der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in einen PBS (pH 7.4) überführt. Anschließend wurde jeweils 30 µL der Proteinlösung (jeweils 27 µg S-Fusionsprotein) mit verschiedenen Acetat-Puffern (pH 4.0 und pH 4.5) versetzt und mit einer Flussrate von 10 µL/min über die Messzelle, die zuvor mit einer NHS/EDC-Lösung aktiviert wurde, geleitet. Es ließ sich bei keiner der Proteinlösungen eine Immobilisierung beobachten.

Neben der Standard-Amid-Kupplung gibt es wie in 2.4 beschrieben noch weitere Immobilisierungsmöglichkeiten. Eine davon ist die *antibody-based-capture*-Methode. Dazu wird der zu immobilisierende Bindungspartner über eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung auf den Chip gebracht. Der zum Antigen zugehörige Antikörper wird kovalent an die Dextranmatrix des Chips gebunden. Das rekombinante S-Fusionsprotein trägt einen GST-*tag*, der hier als Antigen fungiert. Als Antikörper wurde ein monoklonaler Anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper ist spezifisch für GST aus *Schistosoma japonicum*. Vor Beginn der SPR-Messungen mit dem Anti-GST wurde seine Bindung mit dem GST-*tag* mittels eines Western Blots verifiziert. In Abbildung 37 sind links das SDS-Gel und rechts der Western Blot für das S-Fusionsprotein und den GST-*tag* gezeigt. Man erkennt im Gel deutlich die Bande des GST-*tags* bei 25 kDa (2) und die Bande des S-Fusionsproteins bei 36 kDa (3). Im rechts gezeigten Western Blot sind ebenfalls deutlich

die Bande des GST bei 25 kDa (2) und die Bande des S-Fusionsproteins bei 36 kDa zu sehen (3). Außerdem ist in der Bahn des S-Fusionsproteins noch eine Bande bei 25 kDa zu beobachten, die den abgespaltenen freien GST-tag anzeigt.

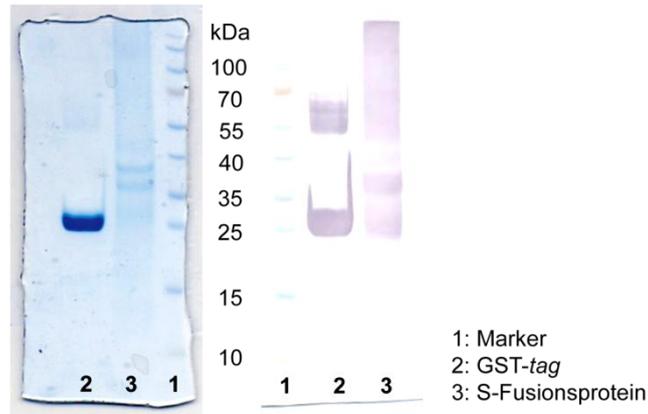


Abbildung 37: Western Blot zur Verifizierung der Bindung des S-Fusionsproteins über seinen GST-*tag* an einen Anti-GST-Antikörper. In Bahn 1 ist jeweils der Marker, in Bahn 2 der GST-*tag* und in Bahn 3 das S-Fusionsprotein aufgetragen.

Die Interaktion des rekombinanten S-Fusionsproteins mit dem monoklonalen Anti-GST-Antikörper wurde durch den Western Blot bestätigt. Der Antikörper kann also für die *antibody-based-capture*-Methode zur Proteinimmobilisierung verwendet werden.

Für die SPR-Messungen wurden 430 μg des Anti-GST mittels der in 7.4.1 beschriebenen Durchführung in PBS (pH 7.4) umgepuffert und anschließend über die Standard-Amid-Kupplung auf die Messzelle und die Referenzzelle eines CM5-Chips immobilisiert. Dabei wurden jeweils 17000 RU des Anti-GST auf beide Zellen des Chips gebracht. Anschließend wurde auf den Zink(II)-haltigen TBS-Laufpuffer gewechselt und eine Lösung von 27 μg S-Fusionsprotein in TBS über die Messzelle des Chips geleitet. Dadurch wurden 1300 RU des S-Fusionsproteins auf den Chip gebracht, was bei einer molaren Masse von 34 kDa einer Chip-Belegung von 38 fmol des Proteins entspricht. Bei einer 1:1-Bindung zwischen der Leitstruktur **1** und dem S-Fusionsprotein kann ein $RU_{max,theo}$ von 34 RU erreicht werden. Anschließend wurde die Referenzzelle mit dem GST-*tag* belegt. Dazu wurde eine Lösung von 30 μg des GST in TBS über die Referenzzelle gegeben. Dabei stieg die RU-Antwort um 400 RU an. Die Injektion der GST-Lösung wurde anschließend wiederholt, es kam allerdings zu keinen weiteren Anstieg der RU-Antwort. Es wurden daher nur 15 fmol GST auf der Referenzzelle immobilisiert. Bei den folgenden SPR-Messungen muss also beachtet werden, dass sich auf der Messzelle 38 fmol des S-Fusionsproteins, auf der Referenzzelle aber nur 15 fmol des GST als Negativkontrolle befinden. Da in den vorangegangenen SPR-Messungen

mit dem GST-tag bereits gezeigt wurde, dass es bei Peptidkonzentrationen bis 128 μM zu keiner Interaktion zwischen Peptid **1** und GST kommt, dürfte sich dieser Unterschied nicht auf die folgenden Messungen mit der Leitstruktur **1** auswirken.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des Peptids **1** $^{438}\text{YKYRYL}^{443}$ zum S-Fusionsprotein wurden Peptidkonzentrationen zwischen 1 und 256 μM in TBS analysiert. Die resultierenden SPR-Sensorgramme sind in Abbildung 38 dargestellt.

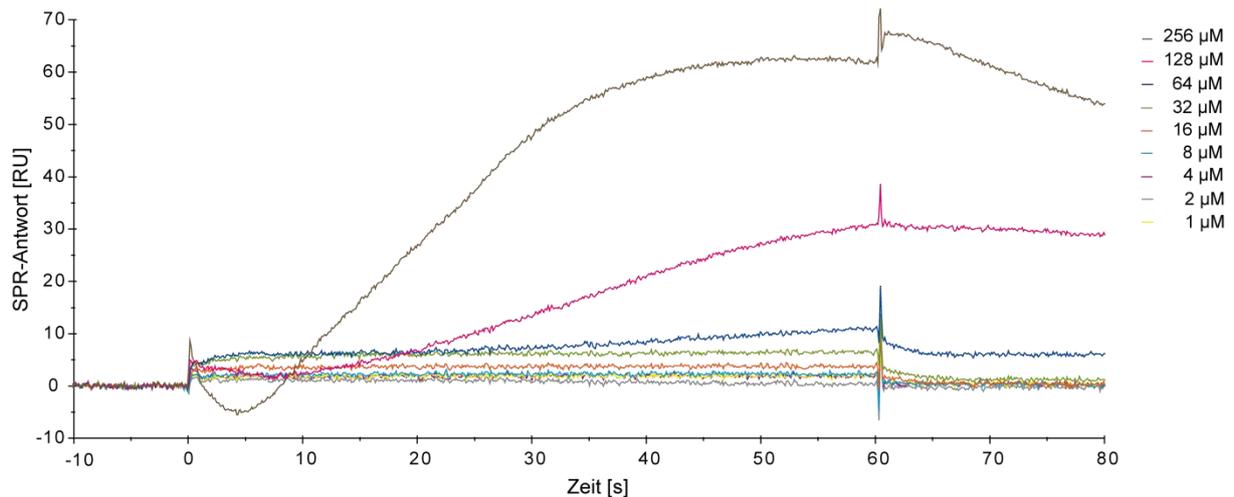


Abbildung 38: SPR-Sensorgramme von Peptid **1**. Es wurde ein Anti-GST-Antikörper auf beiden Flusszellen immobilisiert. Anschließend wurden das S-Fusionsprotein auf die Messzelle und der GST-tag als Negativkontrolle auf die Referenzzelle gebracht. Es wurden Peptidkonzentrationen zwischen 1 und 256 μM untersucht.

Es ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Sensorgramme zu beobachten. Ab einer Peptidkonzentration von 128 μM kommt es allerdings zu einem atypischen Verhalten der Sensorgramme, was dadurch deutlich wird, dass das Sensorgramm zunächst abfällt, bevor es wieder ansteigt. Wenn man den Affinitätsplot der Interaktion zwischen **1** und dem S-Fusionsprotein betrachtet (Abbildung 39), wird deutlich, dass es bei Peptidkonzentrationen über 64 μM unspezifisches Bindungsverhalten gibt, was durch einen linearen Anstieg im Plot deutlich wird. Bei einer Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell wurden daher nur Peptidkonzentrationen zwischen 1 und 64 μM berücksichtigt. Wird allerdings der Datenpunkt bei einer Konzentration von 64 μM bei der Analyse vernachlässigt, dann liegen die übrigen Datenpunkt auf einer Geraden, was für ein unspezifisches Bindungsverhalten sprechen würde.

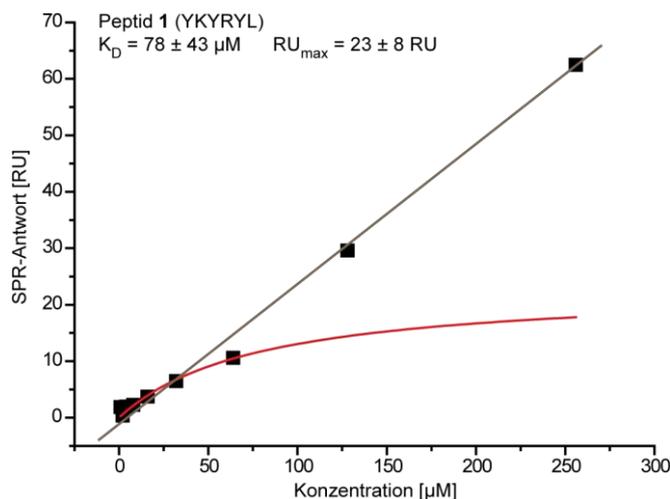


Abbildung 39: Affinitätsplot der Bindung von Peptid **1** an das S-Fusionsprotein. Die Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell ist in Rot dargestellt. Wird die Konzentration von $64 \mu\text{M}$ vernachlässigt, dann liegen die übrigen Datenpunkte auf einer Geraden, welche Grau dargestellt ist.

Aus der Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell ergibt sich eine thermodynamische Dissoziationskonstante von $K_D = 78 \pm 43 \mu\text{M}$ und ein $R_{U_{\max}}$ -Wert von $23 \pm 8 \mu\text{M}$. Der $R_{U_{\max}}$ -Wert liegt unter dem berechneten $R_{U_{\max,theo}}$ -Wert von 34, was für eine spezifische Bindung spricht. Der per SPR ermittelte K_D -Wert ist etwas kleiner als der mittels STD-NMR erhaltene K_D -Wert, liegt aber ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die im NMR-Experiment ermittelte Bindung der Leitstruktur **1** an das rekombinante S-Fusionsprotein mittels SPR-Messungen bestätigt wurde. Eine genaue Aussage über die Spezifität dieser Bindung kann allerdings auch per SPR nicht getroffen werden.

4.6 Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von Peptid **1** auf Coronaviren

Die inhibitorische Wirkung der Leitstruktur **1** gegen den viralen Eintritt von Coronaviren in Zellen wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ch. Drosten am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Peptid **1** einen inhibitorischen Effekt gegen die virale Vermehrung des SARS-CoV und des HCoV-NL63 besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Spezifität der Inhibition durch die Leitstruktur **1** bewiesen werden. Dazu wurde die biologische Aktivität von punktmutierten Leitstrukturpeptiden getestet. Da die Aminosäure R441 eine besonders große Rolle bei der Interaktion zwischen Peptid **1** und ACE2 spielt, wurde sie als *target* für die Mutation gewählt.

Peptide, die die Aminosäure R441 nicht mehr enthalten, sollten idealerweise keinen biologischen Effekt gegenüber dem SARS-CoV zeigen. Die naheliegendste Mutation ist R441A, was dem Peptid **5** des Alaninscans entspricht. Durch den Austausch des polaren Arginins gegen das unpolare Alanin erniedrigt sich die Hydrophilie des Peptids allerdings soweit, dass es sich nicht im Assaypuffer (PBS, pH 8) lösen lies. Daher wurden die Peptide **8** und **9** gewählt. In Peptid **8** ist das positiv geladene R441 gegen die negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure getauscht. Dieses Peptid und das Peptid **9** mit der Mutation R441S ließen sich gut im Assaypuffer lösen. Peptid **8** zeigt in SPR-Studien keine und Peptid **9** nur eine unspezifische Bindung an den ACE2-Rezeptor (siehe 4.3.2). Für beide Peptide ist also keine biologische Aktivität zu erwarten. Die Leitstruktur **1** wurde in allen Assays als Positivkontrolle mitgetestet. Außerdem wurde noch Peptid **18** mit der Sequenz ⁴²⁷NIDATS⁴³² als Negativkontrolle für die Inhibitionsassay gewählt, da es in der RBD des SARS-CoV in der Nähe der Leitsequenz **1** ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ liegt. Peptid **18** zeigt in den SPR-Messungen keine Bindung zum ACE2 und lässt sich aufgrund seines hydrophilen Charakters gut im Assaypuffer lösen.

4.6.1 Synthese der Peptide für den Bioassay

In den Inhibitionsassays werden jeweils Peptidkonzentrationen von 7, 10.5 und 14 mM getestet. Um diese Konzentrationen zu erhalten, mussten die Peptide in größeren Mengen synthetisiert werden. Für die Darstellung von großen Mengen ist die automatisierte Synthese nur bedingt geeignet, da die Größe des Synthesegefäßes limitiert ist. Daher wurde die Peptide **1**, **8**, **9** und **18** nach AAV 3 mittels manueller Kupplung dargestellt. In Tabelle 10 sind die Ansatzgröße und die Ausbeuten der Peptide zusammengefasst.

Tabelle 10: Übersicht der dargestellten Peptide für die Bioassays am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Peptid	Sequenz	Ansatz [μ M]	Ausbeute [%]
1	Y K Y R Y L	1000	n.d.
8	Y K Y D Y L	200	50
9	Y K Y S Y L	250	65
18	⁴²⁷ N I D A T S ⁴³²	400	30

4.6.2 *real-time-RT-PCR-Reduktionsassay* mit den TFA-haltigen Peptiden **1**, **8** und **9**

Zunächst wurden die dargestellte Peptide **1**, **8** und **9** von S. Pfefferle im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin auf ihren inhibitorischen Effekt gegenüber der SARS-Infektion getestet. Dazu wurden VeroE6-Zellen, die ACE2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit Frankfurtisolat SARS-CoV mit einem Virustiter von 0.01 MOI infiziert. Das Medium wurde nach einer Stunde entfernt und jeweils durch peptidhaltiges Medium mit verschiedenen Konzentrationen ersetzt. Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurde die virale RNA im Zellüberstand mittels *real-time-RT-PCR* bestimmt. Als Kontrolle wurde jeweils die Menge der viralen RNA einer peptidfreien Zellkultur bestimmt. Als Ergebnis des Assays ist die Anzahl der RNA-Kopien pro Milliliter aufgetragen (Abbildung 40).

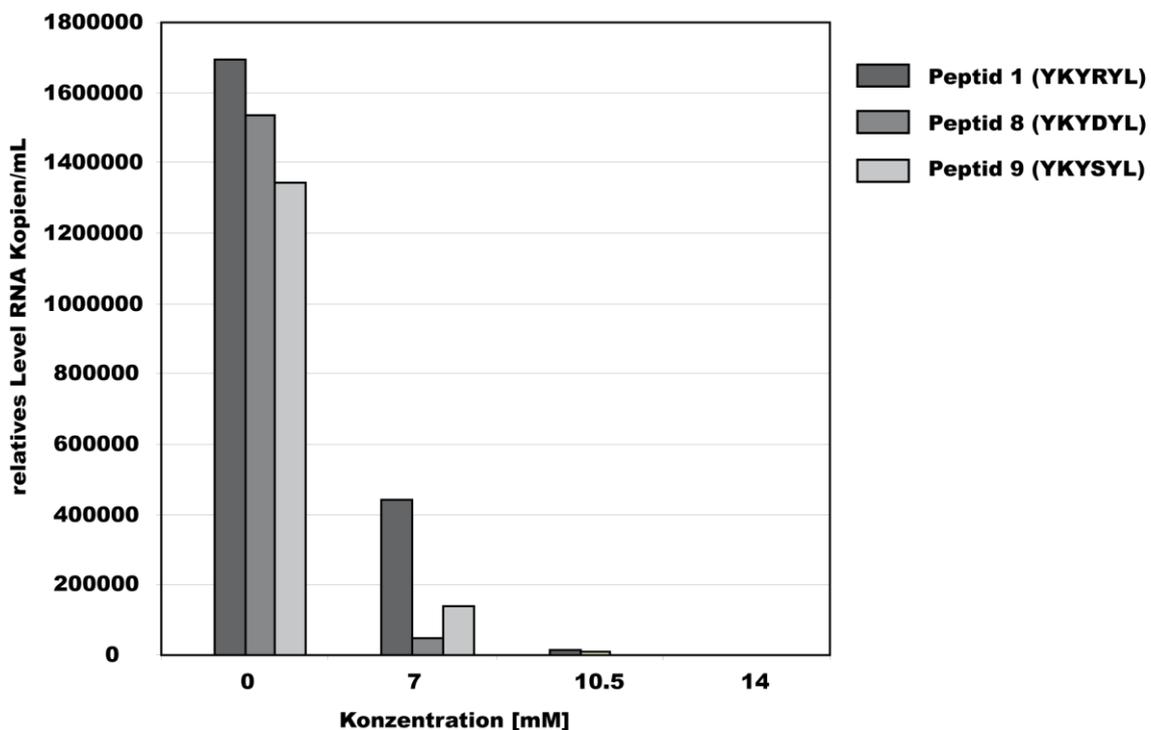


Abbildung 40: Inhibition von Verozellen gegen die SARS-Infektion mit TFA-haltigen Peptiden **1**, **8** und **9**.

Im Inhibitionsassay zeigen alle drei Peptide ein ähnliches inhibitorisches Verhalten. Bei einer Peptidkonzentration von 7 mM ist die Vermehrung der viralen RNA zwei Tage nach der SARS-Infektion für Peptid **1** um den Faktor 4, für Peptid **9** um den Faktor 10 und für Peptid **8** sogar um den Faktor 32 reduziert. Mit höherer Peptidkonzentration nimmt auch die Menge an RNA Kopien pro Milliliter weiter ab. Bei 10.5 mM Peptid in der Assaylösung wird die Virus-RNA um den Faktor 130 bei Peptid **1**, um den Faktor 570 bei Peptid **9** und um den Faktor 180 bei Peptid **8** vermindert. Bei der höchsten Peptidkonzentration von 14 mM wird für Peptid **1** eine Reduktion der viralen RNA um den Faktor 7400, für Peptid **9** um den Faktor 14000 und

für Peptid **8** um den Faktor 3400 erreicht. Dieses Ergebnis widerspricht den Ergebnissen der SPR-Messungen, in denen keine Bindung für Peptid **8** und lediglich eine unspezifische Bindung für Peptid **9** an den ACE2-Rezeptor ermittelt wurden. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass der Rückgang der viralen RNA mit steigenden Peptidkonzentrationen nicht auf einer spezifischen Interaktion der Peptide mit dem ACE2-Rezeptor, sondern auf zytotoxischen Effekten beruht. Diese konnten zwar nicht eindeutig beobachtet, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Bei der Festphasenpeptidsynthese werden die Peptide mit Trifluoressigsäure (TFA) von der Festphase abgespalten und die Reinigung mittels HPLC wird aufgrund eines einheitlichen Protonierungsgrad der Peptide mit TFA-haltigem Laufmittel durchgeführt. In der Leitstruktur **1** ist sowohl der N-Terminus als auch die Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin positiv geladen. Die Peptide **8** und **9** besitzen mit dem N-Terminus und der Aminosäure Lysin zwei positive Ladungen. Nach der Abspaltung der Peptide vom Harz mit TFA bildet das Trifluoracetat-Ion das Gegen-Ion zu den jeweils positiven Ladungen in den Peptiden. Es befinden sich in Peptid **1** also drei Trifluoracetatmoleküle und in den Peptiden **8** und **9** jeweils zwei Trifluoracetatmoleküle pro Peptidmolekül. Die Struktur von Peptid **1** mit drei Molekülen Trifluoracetat ist in Abbildung 41 dargestellt.

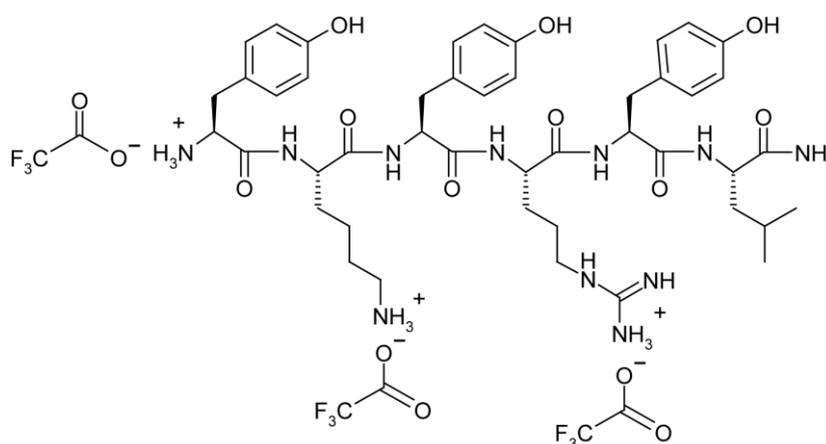


Abbildung 41: Struktur von Peptid **1** mit drei Molekülen Trifluoracetat.

Die in den Peptiden enthaltenen TFA-Moleküle könnten zytotoxisch auf die VeroE6-Zellen wirken und somit für die Reduktion der viralen RNA verantwortlich sein. Daher müssen die Trifluoracetat-Ionen vor Durchführung des biologischen Assays gegen andere Ionen ausgetauscht werden.

4.6.3 Entfernung von Trifluoracetat aus Peptiden

Zur Entfernung des TFA aus den Peptiden wurden diese über einen VariPure IPE Ionentauscher gegeben.¹²² Dieser Ionentauscher tauscht die Trifluoracetat-Moleküle gegen Carbonat aus. Das freigesetzte Carbonat zersetzt sich anschließend zu Wasser und Kohlendioxid. Die feste Phase des VariPure IPE Ionentauschers besteht aus Polystyrolen. Diese aromatischen Polymere können sich unter Umständen bei Benutzung des Ionentauschers lösen, dieser Effekt wird als „Bluten“ des Ionentauschers bezeichnet. Polystyrole können in Bioassays inhibitorische Effekte aufweisen.¹²³ Laut Versuchsvorschrift soll der Ionentauscher vor Benutzung mit Methanol und einem Wasser/Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 95:5 gespült werden. Anschließend wird das Peptid, gelöst in demselben Wasser/MeCN-Gemisch auf den Ionentauscher gebracht. Polystyrole sind jedoch unpolare Verbindungen. Um ein „Bluten“ während der Benutzung des Ionentauschers zu vermeiden, wurde er erst mit *n*-Hexan, dann mit Ethanol und anschließend erst mit Methanol gespült (AAV 10). Vor der ersten Benutzung wurde ein Testlauf mit einem TFA-haltigen H₂O/MeCN-Gemisch, welches kein Peptid enthielt, durchgeführt. Die Lösung wurde aufgefangen und mittels NMR- und UV-Spektroskopie untersucht. Mit beiden spektroskopischen Methoden konnten keine Polystyrole detektiert werden. Ein „Bluten“ des Ionentauschers kann daher ausgeschlossen werden und die Peptide **1**, **8**, **9** und **18** für die Inhibitionsassays mittels der VariPure IPE von TFA befreit werden.

Anschließend wurden mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie überprüft, ob die Peptide noch signifikante Mengen an TFA enthalten (AAV 13). Dazu wurden die jeweiligen Peptide in D₂O gelöst und mit 2 μM Fluorethanol als internen Standard versetzt. Abbildung 42 zeigt exemplarisch die ¹⁹F-NMR-Spektren einer TFA-haltigen Probe (oben) und einer TFA-freien Probe (unten) von Peptid **1**. Das ¹⁹F-Signal der CF₃-Gruppe der TFA bei -76 ppm ist im oberen Spektrum deutlich zu erkennen und im NMR-Spektrum der TFA-freien Probe nicht mehr vorhanden.

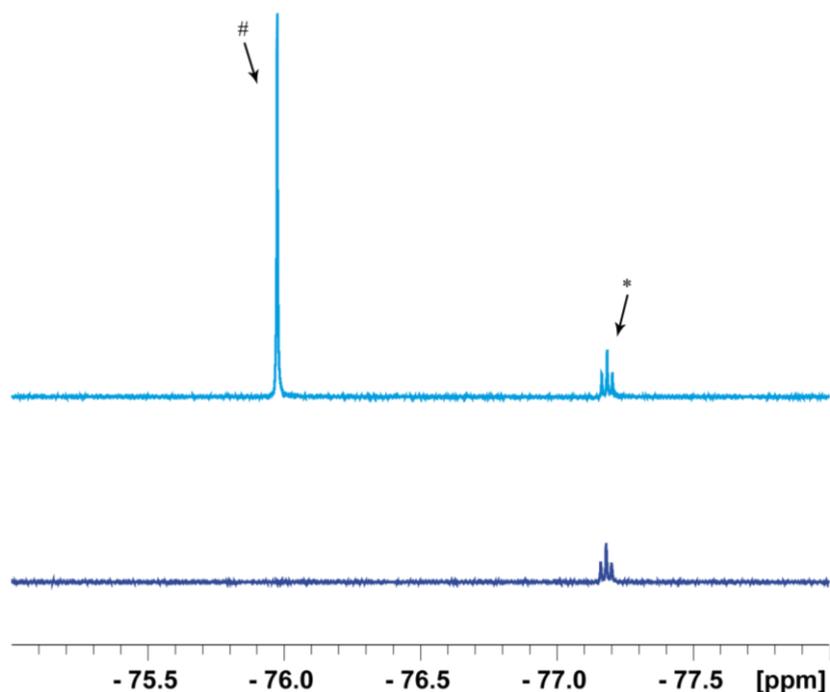


Abbildung 42: TFA-Entfernung aus dem Peptid **1**. Oben (Hellblau): ^{19}F -NMR-Spektrum des TFA-haltigen Peptids; Unten (Blau): ^{19}F -NMR-Spektrum des TFA-freien Peptids; # = TFA-Peak; * = Trifluorethanol-Peak.

Es konnte also mittels ^{19}F -NMR-Experimenten gezeigt werden, dass die Peptide keine signifikanten Mengen an TFA mehr enthalten. Sie werden im Folgenden daher als TFA-freie Peptide bezeichnet. Die TFA-freien Peptide wurden anschließend am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in *real-time* RT-PCR Reduktionsassays erneut auf ihren inhibitorischen Effekt getestet.

4.6.4 *real-time*-RT-PCR-Reduktionsassays mit dem TFA-freien Peptid **1** auf die inhibitorische Wirkung gegen das SARS-CoV

Die Ergebnisse des *real-time*-RT-PCR-Reduktionsassays mit dem TFA-freien Peptid **1** sind in Abbildung 43 dargestellt. Dabei ist das relative Level der Anzahl der RNA-Kopien pro Milliliter aufgetragen.

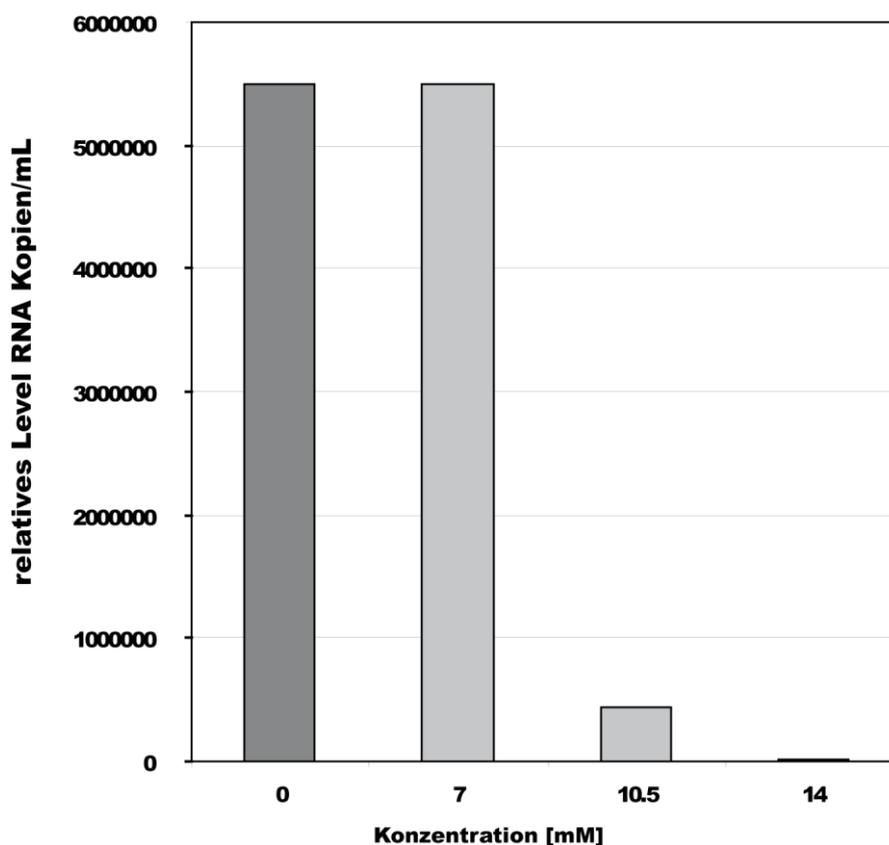


Abbildung 43: *real-time*-RT-PCR-Reduktionsassay mit dem Peptid **1** (⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³) nach zwei Tagen der Infektion mit dem SARS-CoV. Die Auftragung der RNA in Kopien/mL gegen die Peptidkonzentration zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion der Virusreplikation. Bei einer Peptidkonzentration von 10.5 mM konnte die Virusvermehrung um Faktor 10 und bei einer Peptidkonzentration von 14 mM um Faktor 600 unterdrückt werden.

Es lässt sich weiterhin ein konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt beobachten, wobei dieser geringer ist als beim zuvor durchgeführten Assay mit den TFA-haltigen Peptiden. Zwei Tage nach der Infektion der Zellen mit dem SARS-Coronavirus lässt sich bei einer Peptidkonzentration von 7 mM kein signifikanter Effekt beobachten. Bei einer Peptidkonzentration von 10.5 mM wird die Virusvermehrung um den Faktor 10 und bei einer Peptidkonzentration von 14 mM um den Faktor 600 unterdrückt. Bei dem TFA-haltigen Peptid **1** lag die Verminderung der viralen Vermehrung bei einem Faktor von 130 für 10.5 mM und bei einem Faktor von 7400 für die Peptidkonzentration von 14 mM. Die Reduktion der viralen RNA durch das TFA-freie Peptid **1** ist also durchschnittlich um Faktor 10 kleiner durch das TFA-haltige Peptid. Die Zytotoxizität des Peptids in niedrigen millimolaren Konzentrationen wurde mittels eines MTT-Test überprüft.¹¹⁵

Das Hexapeptid **1** ⁴³⁸YKYRYL⁴³³ blockiert die Bindung des S-Proteins des SARS-CoV an den Zellrezeptor ACE2 und somit den viralen Eintritt. Durch SPR- und STD-NMR-Messungen konnte gezeigt werden, dass das Peptid **1** sowohl an ACE2 als auch an das

S-Fusionsprotein, welches einem Teil der RBD des S-Proteins entspricht, bindet. Daher kann nicht genau bestimmt werden, ob die Inhibition durch Wechselwirkungen zwischen dem Peptid **1** und ACE2 oder durch Wechselwirkungen zwischen **1** und dem S-Protein stattfindet. Da die Bindung zwischen Peptid **1** und ACE2 allerdings stärker ist als die Bindung an das S-Fusionsprotein, ist die Blockierung des viralen Eintritts durch Bindung von Peptid **1** an ACE2 wahrscheinlicher. Bei einer Bindungskonstante von $46 \mu\text{M}$ sind bei einer Peptidkonzentration von 7 mM 99.3% der Bindungsstellen, bei einer Konzentration von 10.5 mM sind 99.5% und bei einer Peptidkonzentration von 14 mM sind 99.7% der Bindungsstellen des Rezeptors blockiert. Da Arbeiten in einem Sicherheitslabors der Stufe 4 mit einem sehr hohen Zeitaufwand verbunden sind, wird das Peptid nur einmalig am Anfang des Assays zur Zellkultur gegeben. Durch Proteasen, die in der Zellkultur enthalten sind, wird das Peptid verdaut und die Peptidkonzentration nimmt im Laufe der Zeit ab. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Peptidkonzentration nach zwei Tagen nicht mehr der zugegebenen Peptidkonzentration entspricht und somit auch weniger Bindungsstellen als oben berechnet blockiert sind. Dies könnte die Tatsache erklären, dass erst bei einer relativ hohen Peptidkonzentration von 10.5 mM ein inhibitorischer Effekt beobachtet werden kann. Um den Verdau durch Proteasen zu verhindern, kann die Leitstruktur **1** als Templat zum Design von peptidomimetischen Strukturen dienen.

Die Ergebnisse der Inhibitionsassays mit den TFA-freien Peptiden **8**, **9** und **18** standen bei der Fertigstellung dieser Arbeit noch aus.

4.6.5 Assay mit dem TFA-freien Peptid 1 auf die inhibitorische Wirkung gegen das Coronavirus NL63

Das Coronavirus NL63 nutzt ebenfalls den Wirtszellrezeptor ACE2, um humane Zellen zu infizieren. Es wurde gezeigt, dass sich die Bindungsregionen des SARS-CoV und des HCoV-NL63 auf dem ACE2 überlappen.³⁶ Daher könnte ein *entry*-Inhibitor für das SARS-CoV auch den viralen Eintritt des CoV-NL63 in die Wirtszellen inhibieren. Die peptidische Leitstruktur **1** zeigt im Inhibitionsassay biologische Aktivität gegen die SARS-Infektion. Sie könnte also auch die virale Vermehrung des Coronavirus NL63 inhibieren. Um dies zu überprüfen, wurden ebenfalls *real-time*-RT-PCR-Reduktionsassays mit dem TFA-freien Peptid **1** in zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Zum einen wurden CaCo2-Zellen mit dem HCoV-NL63 infiziert und anschließend mit Peptidlösung versetzt. Bei CaCo2-Zellen handelt es sich um eine adhärente, menschliche

Kolonkarzinomzelllinie.¹²⁴ Eine weitere Testreihe wurde in LLC-MK2-Zellen, einer permissiven Nierenzelllinie des Rhesusaffen, durchgeführt.¹²⁵ Beide Zelllinien wurden nach der viralen Infektion mit Peptidkonzentrationen von 7 und 14 mM versetzt. Die Ergebnisse des RT-PCR-Assays sind in Abbildung 43 zu sehen. Es ist jeweils die Menge der viralen RNA direkt nach der Infektion (Hellgrau) und die Menge der viralen RNA sechs Tage nach der Infektion (Dunkelgrau) aufgetragen.

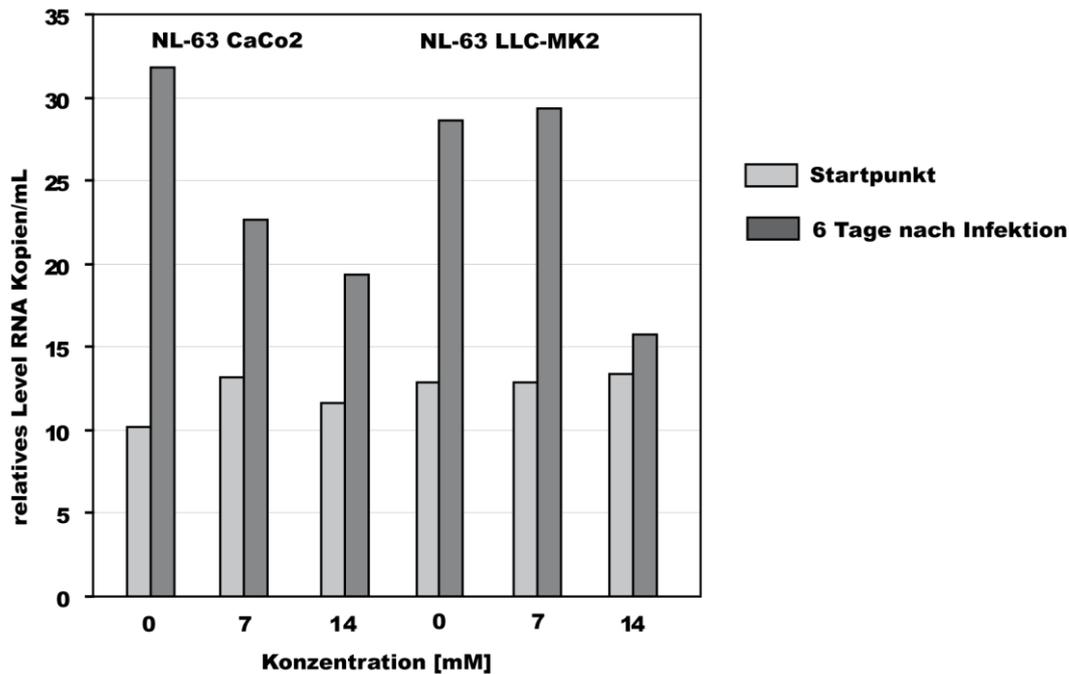


Abbildung 44: *real-time*-RT-PCR-Reduktionsassay mit dem Peptid **1** (⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³) nach 6 Tagen der Infektion mit dem HCoV-NL63 in zwei verschiedenen Zelllinien. Die Auftragung der RNA in Kopien/mL, gegen die Peptidkonzentration, zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion der Virusreplikation.

Es ist in beiden Zelllinien ein inhibitorischer Effekt zu beobachten. In den CaCo2-Zellen wurde die Vermehrung der viralen RNA in sechs Tagen bei einer Peptidkonzentration von 7 mM um 54% reduziert. Bei der höchsten Peptidkonzentration von 14 mM lag die Reduktion der viralen RNA nach sechs Tagen bei 64% verglichen zur peptidfreien Zellkultur. Bei den LLC-MK2-Zellen lässt sich erst bei einer Konzentration von 14 mM eine Inhibition der viralen RNA beobachten. Im Vergleich zum Startpunkt der Infektion vermehrte sich die RNA um 17%. Das entspricht einer Reduktion der Virus-RNA um 85% im Vergleich zu den peptidfreien Zellen. Bei den höchsten Peptidkonzentrationen von 14 mM wird die virale RNA in CaCo2-Zellen um den Faktor 2.7 und in LLC-MK2-Zellen um den Faktor 7.1 reduziert. Es lässt sich also eine biologische Aktivität der Leitstruktur **1** gegen das CoV-NL63 beobachten, die allerdings wesentlich geringer ist als gegen das SARS-CoV.

4.6.6 Inhibitionsassay mit dem TFA-freien Peptid **1** gegen das Alphavirus Sindbis

Als Negativkontrolle wurde die inhibitorische Wirkung des TFA-freien Peptids **1** gegen das Alphavirus Sindbis getestet, welches Fieber und Gelenkentzündungen im Menschen verursacht.¹²⁶ Das Sindbisvirus nutzt u.a. den Laminin Rezeptor für den viralen Eintritt in die humane Zelle.¹²⁷ Es wurden VeroE6-Zellen mit peptidhaltigem Medium inkubiert und anschließend mit dem Sindbisvirus infiziert. Die virale RNA im Zellüberstand wurde am Startpunkt der Infektion und nach 6 Tage mittels RT-PCR quantifiziert (Abbildung 45).

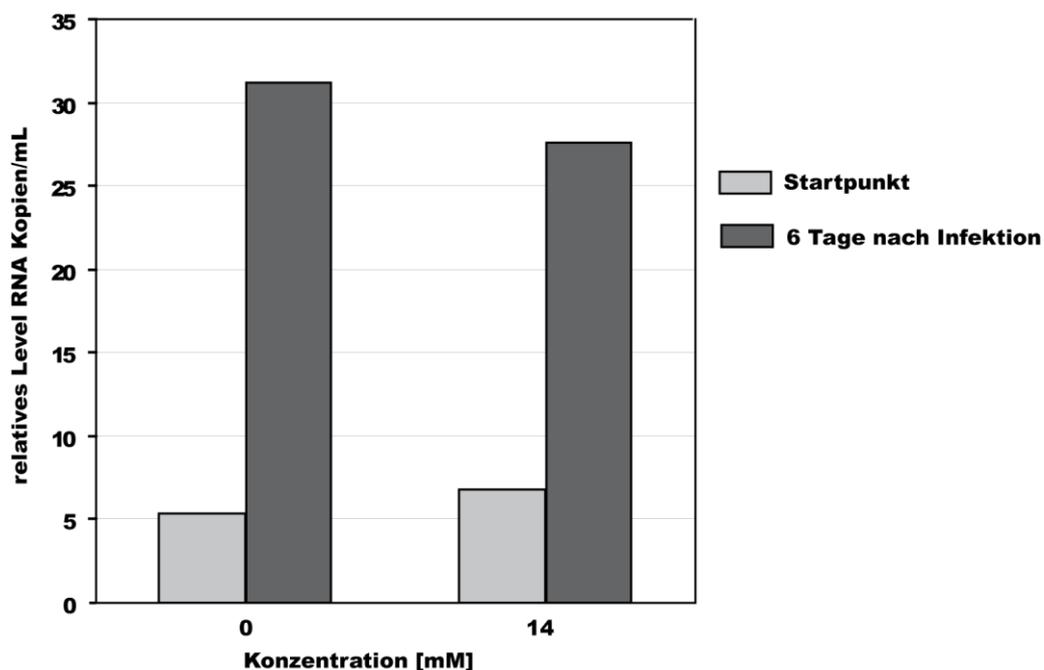


Abbildung 45: *real-time* RT-PCR Reduktionsassay mit dem Peptid **1** (⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³) nach 6 Tagen der Infektion mit dem Alphavirus Sindbis. Die Auftragung der RNA in Kopien/mL, gegen die Peptidkonzentration, zeigt eine keine signifikante Reduktion der Virusreplikation bei einer Peptidkonzentration von 14 mM.

Es wurde nur die höchste zuvor eingesetzte Peptidkonzentration von 14 mM getestet. Sechs Tage nach der Infektion ist die virale RNA um etwa 10% vermindert, was im Rahmen der Fehlertoleranz des Assays liegt. Es ist also kein signifikanter inhibitorischer Effekt zu beobachten, was die Tatsache untermauert, dass eine Inhibition der viralen Replikation von Coronaviren durch die Leitstruktur **1** spezifischer Natur ist.

4.7 Studien zur Interaktion des L-SIGN-Rezeptors mit dem S-Protein des SARS-CoV

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Interaktionen der CRD des L-SIGN-Rezeptors mit dem S-Protein des SARS-CoV analysiert werden, wobei zum einen ein Fokus auf die einzelnen Kohlenhydratmoleküle der hochmannosidischen *N*-Glycane des S-Proteins und zum anderen auf die Aminosäuren des *backbones* gelegt wurde. Dafür sollte ein SPR-Assay entwickelt werden, welcher das *screening* von Liganden auf ihre Bindung zur CRD ermöglicht. Die CRD wurde dafür zunächst über unterschiedliche Methoden auf der Oberfläche eines SPR-Chips immobilisiert und verschiedene Liganden auf ihre Bindungsaffinität mittels SPR untersucht. Dabei gelang es lediglich Mengen der CRD im niedrigen femtomol Bereich (<15 fmol) auf den Chip zu immobilisieren. Für das *screening* von kleinen Liganden wären allerdings Mengen über 100 fmol von Vorteil. Trotz der geringen Chipbelegung konnte ein *screening* von Liganden durchgeführt werden, welches beispielsweise ein K_D -Wert im niedrigen millimolaren Bereich für das Kohlenhydrat α -Methylmannosid (α -MeMan) liefert.

Um SPR-Studien mit der CRD des L-SIGN durchführen zu können, musste zunächst ein geeignetes Messsystem gefunden werden. Lozach *et al.* und Tabarani *et al.* beschreiben die Immobilisierung der CRD des homologen Rezeptors DC-SIGN mittels Standard-Amid-Kupplung.¹²⁸⁻¹²⁹ Für die Immobilisierung wurden Proteinkonzentrationen zwischen 5 und 50 $\mu\text{g/mL}$ über den Chip geleitet. Dabei wurden zwischen 200 RU und 1000 RU der CRD des DC-SIGN immobilisiert. Diese Mengen entsprechen Chip-Belegungen zwischen 13 und 66 fmol. Neben der CRD wurde von Lozach *et al.* und Martinez-Avila *et al.* auch die gesamte extrazelluläre Domäne des DC-SIGN (DC-SIGN-ECD, Aminosäuren 66-404) auf den Chip immobilisiert.⁵⁶ In der Literatur sind noch weitere SPR-Messungen mit DC-SIGN beschrieben, allerdings ist in diese Fällen das Protein der mobile Bindungspartner, der über den Chip geleitet wird.^{130, 131} SPR-Studien mit L-SIGN sind in der Literatur nicht beschrieben. Aufgrund der hohen Homologie der beiden Lektine wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Assaybedingungen, wie beispielsweise ein Calcium(II)-haltiger TBS (pH 8.0) als Laufpuffer, von DC-SIGN auf L-SIGN übertragen.

4.7.1 Wahl von Kohlenhydratliganden für die CRD des L-SIGN

Um die Rolle der einzelnen Kohlenhydratmoleküle der hochmannosidischen *N*-Glycane an der Bindung des S-Proteins an das L-SIGN zu untersuchen, wurden drei

Kohlenhydratmoleküle gewählt (Abbildung 46). Es sollten α -Methylmannosid (α -MeMan), welches die Antennen des Glycanmoleküls repräsentiert, *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), welches die proximale Monosaccharideinheit darstellt und eine Mannopentaose (Man5), welche dem Mittelteil der Glycanstruktur entspricht, auf ihre Bindung zur CRD analysiert werden.

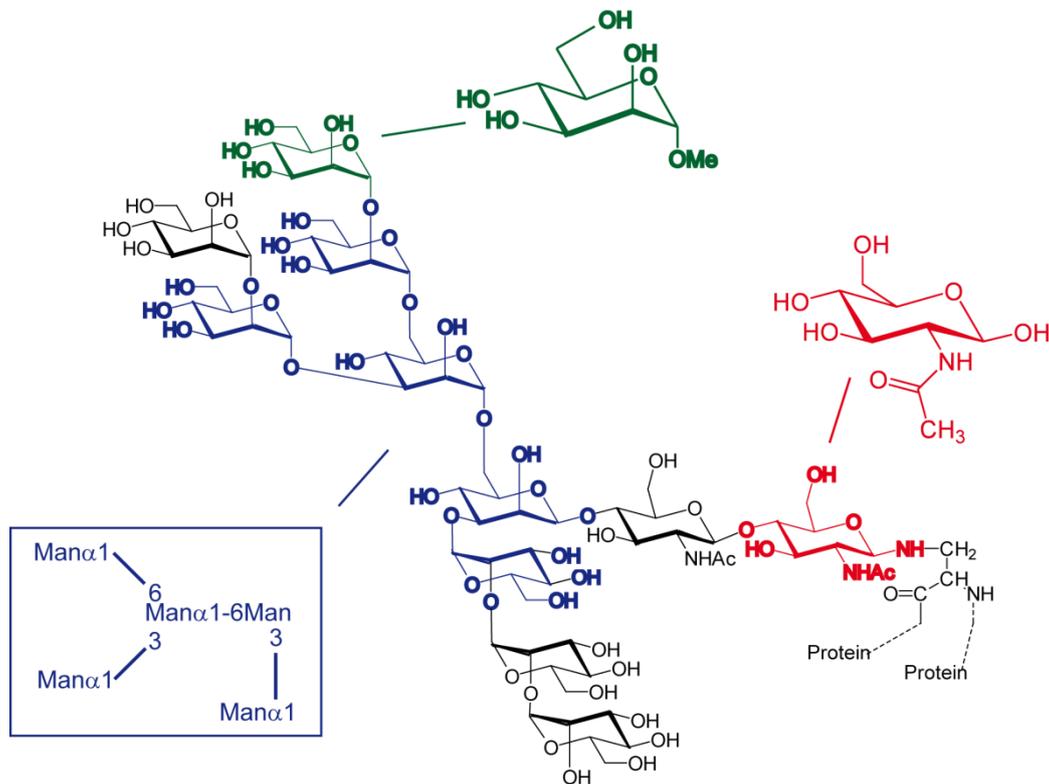


Abbildung 46: *N*-Glycan des hochmannosidischen Typs. α -Methylmannosid (Grün), *N*-Acetylglucosamin (Rot) und die Mannopentaose (Blau) dienen als Modellsysteme, um die Rolle der einzelnen Kohlenhydrate an der Bindung zum L-SIGN zu analysieren.

4.7.2 Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus dem S-Protein

Arbeiten von Han *et al.* haben gezeigt, dass die Glycosylierungsstellen im S-Protein des SARS-CoV unterschiedlich stark zur Affinität zum L-SIGN beitragen.⁷⁸ Es wurden drei Glycosylierungen gewählt, die besonders wichtig für die Bindung sind. Um den Einfluss der Aminosäuren des *backbones* in der Peripherie dieser Glycosylierungen genauer zu klären, sollten Hexapeptide und Glycopeptide synthetisiert werden, die die Asparagine N109, N118 und N227 enthalten. Stellvertretend für das Glycan wurden die Glycopeptide jeweils mit GlcNAc glycosyliert, welches dem proximalen Zuckermolekül im *core* der hochmannosidischen Glycane entspricht. Die dargestellten Peptide und Glycopeptide sind in Abbildung 47 Gelb hinterlegt und in Tabelle 11 aufgeführt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

```

10           20           30           40           50           60
MFIFLLFLTL TSGSDLRCT TFDDVQAPNY TQHTSSMRGV YYPDEIFRSD TLYLTQDLFL

70           80           90           100          110          120
PFYSNVTGFH TINHTFGNPV IPFKDGIYFA ATEKSNVVRG WVFGSTMNNK SQSVIIINNS

130          140          150          160          170          180
TNNVIRACNF ELCDNPFPAV SKPMGTQHT MIFDNAFNCT FEYISDAFSL DVSEKSGNFK

190          200          210          220          230          240
HLREFVFKNK DGFLYVYKGY QPIDVVRDLP SGFNTLKPIF KLPLGINITN FRAILTAFSP

250          260          270          280          290          300
AQDIWGTSA A YFVGYLKPT TFMLKYDENG TITDAVDCSQ NPLAELKCSV KSFEIDKGIY

310          320          330          340          350          360
QTSNFRVVP S G DVVRFPNIT NLCPFGEVFN ATKFPSVYAW ERKKISNCVA DYSVLYNSTF

370          380          390          400          410          420
FSTFKCYGVS ATKLNLCFS NVYADSFVVK GDDVRQIAPG QTGVIADYNY KLPDDFMGCV

430          440          450          460          470          480
LAWNTRNIDA TSTGNINYKY RYL RHGKLRP FERDISNVPF SPDGKPCPP ALNCYWPLND

490          500          510          520          530          540
YGFYTTTGIG YQPYRVVVL S FELLNAPATV CGPKLSTDLI KNQCVNFNFN GLTGTGVLTP

550          560          570          580          590          600
SSKRFQPFQ FGRDVSDFTD SVRDPKTSEI LDISPCSF GG VSVITPGTNA SSEVAVLYQD

610          620          630          640          650          660
VNCTDVSTAI HADQLTPAWR IYSTGNNVFQ TQAGCLIGAE HVDTSYECDI PIGAGICASY

```

Abbildung 47: Sequenz der S1-Domäne des S-Proteins des SARS-CoV. Potentielle N-Glycosylierungsstellen sind durch ein Rot markiertes N dargestellt. Die RBD des SARS-CoV ist durch schwarze Hervorhebung und die dargestellten Peptide und Glycopeptide durch gelbe Hinterlegung markiert.

Die Peptide **20**, **22** und **24** und die dazugehörigen Glycopeptide **21**, **23** und **25** wurden nach AAV 1 (Abschnitt 7.3.1) synthetisiert. Der Asn-GlcNAc-Baustein wurde nach literaturbekannter Synthese dargestellt und als Aminosäurederivat in die Festphasensynthese eingegliedert.⁹⁹⁻¹⁰⁰

Tabelle 11: Übersicht der dargestellten Peptide und Glycopeptide aus dem S-Protein.

Peptid	Sequenz	Ausbeute [%]
20	¹⁰⁷ M N N K S Q ¹¹²	32
21	¹⁰⁷ M N N(GlcNAc) K S Q ¹¹²	30
22	¹¹⁶ I I N N S T ¹²¹	88
23	¹¹⁶ I I N(GlcNAc) N S T ¹²¹	50
24	²²⁵ G I N I T N ²³⁰	72
25	²²⁵ G I N(GlcNAc) I T N ²³⁰	10

Anschließend wurden alle Peptide und Glycopeptide mittels 2D-NMR-Spektroskopie charakterisiert. In Abbildung 48 ist exemplarisch der NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des Glycopeptids **23** gezeigt. Alle Signale konnten eindeutig einer Aminosäure und dem GlcNAc zugeordnet werden. Die Zuordnung der Signale für die N-terminale Aminosäure I116 erfolgte im aliphatischen Bereich des Spektrums.

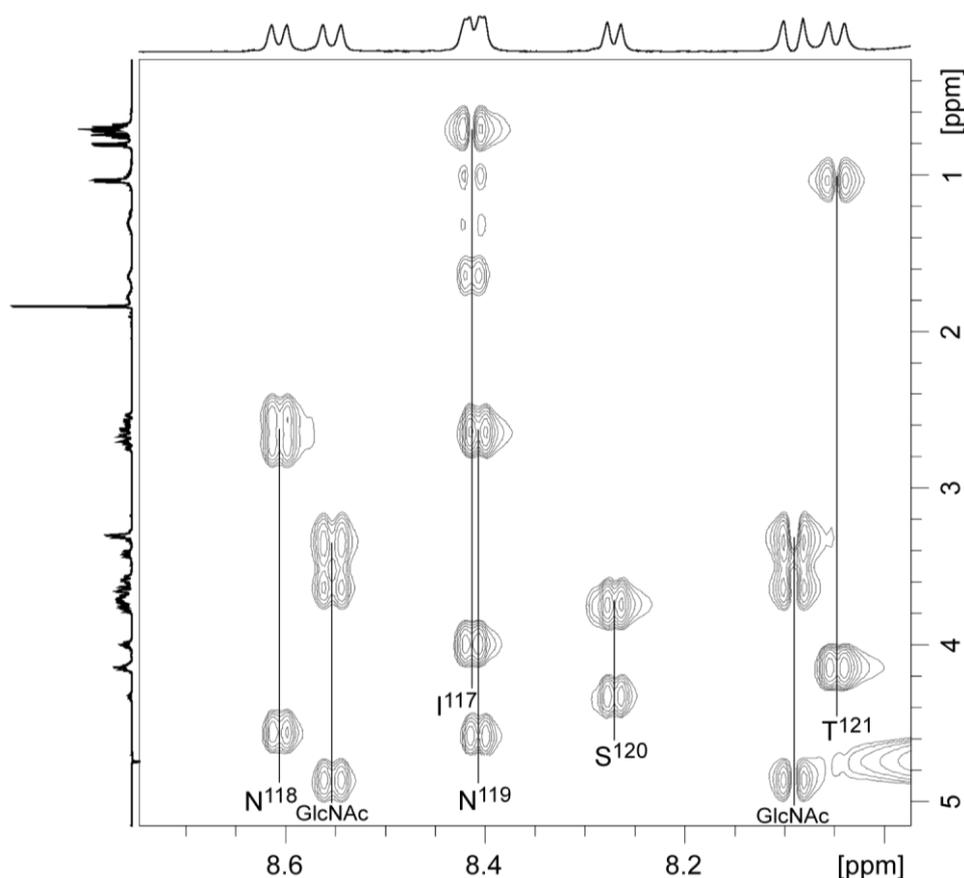


Abbildung 48: Spinsysteme von Protonenresonanzen im NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des Glycopeptids **23**.

4.7.3 Konzentrationsbestimmung, Umpuffern und Western Blot der CRD

Von der Arbeitsgruppe von Prof. K. Holmes, University of Colorado, wurde die CRD des L-SIGN, fusioniert mit einem FLAG-tag, zur Verfügung gestellt. Laut Angaben lag das CRD-FLAG-Fusionsprotein in TBS mit einer Konzentration von etwa 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vor. Für eine spätere SPR-Immobilisierung nach der Standard-Amid-Methode musste es zunächst vom Tris-Puffer in ein anderes Puffersystem gebracht werden, da die Aminofunktionen des Tris ansonsten die Proteinimmobilisierung stören würden. Es wurde als Belegungspuffer jeweils ein PBS (pH 7.4) und ein BisTris-Puffer (pH 7.2) gewählt. In beiden Puffersystemen sollte das Protein zusätzlich noch aufkonzentriert werden. Das Umpuffern und Aufkonzentrieren

erfolgte nach der in 7.6.2 beschriebenen Durchführung. Dabei wurde in beiden Puffersystemen ein Präzipitieren des Proteins und ein damit verbundenes Zusetzen der Ausschlussgrößenmembran beobachtet. Anschließend wurde von dem Protein, vor dem Aufkonzentrieren und Umpuffern und nach dem Umpuffern in das BisTris-Puffersystem, ein SDS-PAGE-Gel angefertigt. Die Umpufferung in PBS musste wegen des Zusetzens der Membran vorzeitig abgebrochen werden. In Abbildung 49 ist die Coomassie-Färbung des Gels zu sehen.

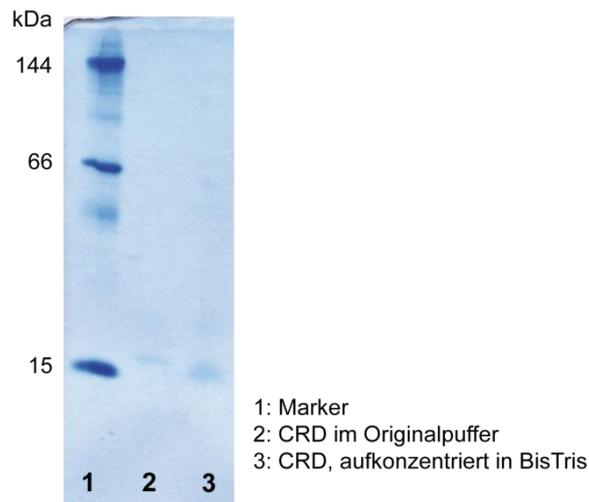


Abbildung 49: Coomassie-Färbung, in Bahn 1 ist ein selbstangesetzter Marker, in Bahn 2 die CRD in TBS und in Bahn 3 die CRD in BisTris-Puffer aufgetragen.

Es lassen sich für die CRD im Original-TBS in Bahn 2 und für die aufkonzentrierte CRD in BisTris in Bahn 3 schwache Banden bei etwa 16 kDa erkennen. In Bahn 1 ist ein Marker zu erkennen, in dem die Bande bei etwa 15 kDa 1 μ g des Enzyms Lysozym entspricht. Die Intensität der Banden spiegelt die Menge an Protein wieder. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Banden sowohl in Bahn 2 als auch in Bahn 3 deutlich schwächer sind als die Bande in Bahn 1. Von der CRD wurden jeweils 6.6 μ L aufgetragen. Bei einer angenommenen Konzentration von 70 μ g/mL müsste die Bande in Bahn 2 also 0.5 μ g entsprechen. Daraus lässt sich schließen, dass die Anfangskonzentration der CRD unter den angenommenen 70 μ g/mL liegt.

Um die Proteinkonzentration genauer zu bestimmen wurde die BCA-Methode angewandt. Das Enzym Lysozym wurde als Referenzsubstanz verwendet. Es wurden eine Proteinkonzentration von 32 μ g/mL für die Probe im Original-Puffer und eine Proteinkonzentration von 72 μ g/mL für die Probe der CRD in BisTris ermittelt. Diese Werte geben die Gesamtproteinkonzentration und nicht die Konzentration der CRD in der Probe an.

Da im SDS-PAGE-Gel neben der Bande bei etwa 16 kDa auch noch weitere sehr schwache Banden beobachtet werden können, kann davon ausgegangen werden, dass Verunreinigungen enthalten sind und die tatsächliche Konzentration der CRD etwas unter der ermittelten Konzentration liegt.

Die CRD des L-SIGN enthält vier Lysine, von denen drei in der Röntgenkristallstruktur im Inneren des Proteins liegen und einen intramolekularen Bindungspartner besitzen.⁴⁸ Das vierte Lysin sitzt direkt am FLAG-tag. Die Sequenz des FLAG-tags ist DYKDDDDK. Das heißt, es sind auch im FLAG-tag zwei Lysine enthalten. Das Fusionsprotein aus der CRD und dem FLAG-tag enthält also sechs Lysine. Durch die fünf Aspartate besitzt der tag eine hohe negative Ladung. Wie in 2.3 beschrieben ist die elektrostatische Anziehung zwischen dem zu immobilisierenden positiv geladene Bindungspartner und der negativ geladenen Chipoberfläche ein wesentlicher Aspekt bei der Immobilisierung über die Standard-Amid-Methode. Da alle freien Lysine in direkter Nähe der hohen negativen Ladungsdichte liegen, könnte der Effekt der Vorkonzentrierung wegfallen und somit eine Immobilisierung erschweren. Die CRD des L-SIGN ist mit einem FLAG-tag fusioniert. Dieser tag kann als Antigen zur Immobilisierung mittels der *antibody-base-capture*-Methode dienen.

Um die CRD des L-SIGN über den FLAG-tag auf dem SPR-Chip zu immobilisieren, wurde ein monoklonaler Anti-FLAG-M2-Antikörper in TBS (pH 8.0) verwendet. Dieser Antikörper bindet spezifisch an Fusionsproteine, die das FLAG-Peptid enthalten. Vor der Belegung des SPR-Chips mit dem Antikörper wurde zunächst die Aktivität mittels eines Western Blots überprüft. Im Western Blot ist eine deutliche Bande bei etwa 16 kDa zu beobachten, was der molaren Masse der CRD fusioniert mit dem FLAG-Peptid entspricht (Abbildung 50). Eine Interaktion des Anti-FLAG-M2 mit der CRD des L-SIGN ist also detektierbar.

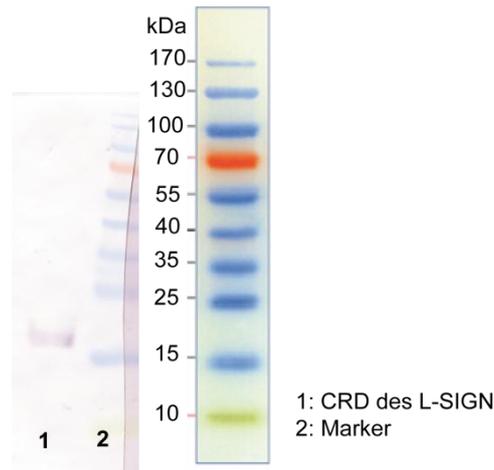


Abbildung 50: Western Blot von Anti-FLAG M2 und der CRD-FLAG des L-SIGN. In Bahn 1 ist die CRD und in Bahn 2 ein Marker aufgetragen.

4.7.4 Immobilisierung der CRD mittels Standard-Amid-Kupplung

Um die CRD des L-SIGN mittels Amid-Kupplung zu immobilisieren wurden 50 μL der CRD in BisTris mit 150 μL Acetatpuffer (pH 4.0) versetzt. Die Immobilisierung wurde also mit 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durchgeführt. Nach der Aktivierung der Chipoberfläche wurde die CRD in Acetatpuffer mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Messzelle geleitet. Dabei gelang es 100 RU der CRD zu immobilisieren, was einer Menge von 6.3 fmol entspricht. Bei der beschriebenen Immobilisierung der CRD von DC-SIGN wurden zwischen 200 RU und 1000 RU erreicht, wobei mit Konzentrationen zwischen 5 und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gearbeitet wurde.¹²⁸

Die Massen der Kohlenhydrate, Peptide und Glycopeptide, deren Bindung zu L-SIGN untersucht werden soll, liegen zwischen 194.1 g/mol für das α -Methylmannosid (α -MeMan) und 923.2 g/mol für das Glycopeptid **21**. Bei einer Chipbelegung von 6.3 fmol können daher maximale theoretische $RU_{max,theo}$ -Antworten zwischen 1.2 RU und 5.8 RU erreicht werden.

4.7.5 Immobilisierung der CRD mittels der *antibody-based-capture*-Methode

Um die CRD über den FLAG-tag zu immobilisieren, wurde der Anti-FLAG-Antikörper zunächst nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in ein Calcium(II)-haltiges BisTris-Puffersystem (pH 7.2) gebracht. Anschließend wurden 30 μg des Antikörpers in 30 μL BisTris-Puffer mit 90 μL Acetatpuffer (pH 4.5) versetzt und mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ über Referenz- und Messzelle eines CM5-Chips geleitet, der zuvor aktiviert worden war. Dabei wurden 38 300 RU des Antikörpers auf beiden Flusszellen immobilisiert. Nach den *cappen* der beiden Flusszellen mit Ethanolamin, wurde zunächst auf einen Calcium(II)-haltigen TBS gewechselt. Die CRD des L-SIGN wurde nun über die Interaktion

zwischen FLAG-Peptid und Antikörper auf die Messzelle des Chips gebracht. Dafür wurde die CRD im Original-TBS (pH 8.0) mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Messzelle geleitet. Dadurch gelang es 230 RU zu immobilisieren, was einer Belegung von 14.4 fmol entspricht.

Auch die Immobilisierung der CRD über die Interaktion des FLAG-tags mit einem Anti-FLAG Antikörper ergibt nur eine Chip-Belegung in niedrigen femtomolaren Bereich. Für die zu analysierenden Kohlenhydrate, Peptide und Glycopeptide ergeben sich somit theoretische $RU_{max,theo}$ -Antworten zwischen 2.7 RU für das α -MeMan und 13.2 RU für das Glycopeptid **21**. Wie schon beschrieben, trägt das FLAG-Peptid eine hohe negative Ladung. Daher muss das Bindungsmotiv des FLAG-Peptids auf den Antikörper positiv geladen sein, was durch Lysine im Bindungsmotiv verursacht werden könnte. Es wäre also möglich, dass ein großer Teil des Antikörpers über sein Bindungsmotiv auf den SPR-Chip gebracht wurde. Dadurch wäre das Bindungsmotiv blockiert und es kann zu keiner Wechselwirkung zwischen dem Antikörper und dem FLAG-Peptid kommen. Als alternative Immobilisierung kann die doppelte *antibody-based-capture* -Methode angewendet werden, die im folgenden Abschnitt beschreiben wird.

4.7.6 Immobilisierung der CRD mittels doppelter *antibody-based-capture*-Methode

Bei der doppelten *antibody-based-capture*-Methode wird zunächst ein „Anti-Antikörper-Sandwich“ dargestellt, indem ein Anti-Maus-Antikörper kovalent auf den Chip immobilisiert wird und der monoklonale Anti-FLAG-Antikörper, der aus der Maus stammt, an den Anti-Maus Antikörper gebunden wird. An den Anti-FLAG-Antikörper wird dann die CRD über ihren FLAG-tag immobilisiert. Als Anti-Maus-Antikörper wurde ein Anti-Maus-IgG aus der Ziege verwendet. Der Antikörper wurde nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in einen Phosphat-Puffer (pH 7.4) gebracht. Es wurden 2.8 μg des Antikörpers zur Immobilisierung nach der Standard-Amid-Methode verwendet, wobei es gelang etwa 6000 RU auf die Messzelle und die Referenzzelle zu immobilisieren. Anschließend wurde der Anti-FLAG-Antikörper in PBS über die Zellen geleitet, wobei es gelang 320 RU auf die Messzelle und 370 RU auf die Referenzzelle zu bringen. Bevor die CRD am den „Anti-Antikörper-Sandwich“ gebracht wurde, wurde auf den Calcium(II)-haltigen TBS gewechselt. Bei der Injektion der CRD des L-SIGN über die Messzelle konnte keine Zunahme der RU-Antwort beobachtet werden. Eine Immobilisierung der CRD über die *antibody-based-capture*-Methode ist also auf diesen Weg nicht möglich.

4.7.7 SPR-screening

Zunächst wurden SPR-Studien mit dem Chip durchgeführt, auf dem 6.3 fmol der CRD kovalent immobilisiert waren. Es wurden die Kohlenhydrate α -MeMan, Man5, GlcNAc, das Peptid **24** und das Glycopeptid **25** vermessen. Die vermessenen Konzentrationsbereiche und $RU_{max,theo}$ -Werte sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Substanzen für SPR-Studien mit 6.3 fmol der CRD von L-SIGN

Substanz	Sequenz	Molare Masse [g/mol]	$RU_{max,theo}$	Konzentrationsbereich [mM]
α -MeMan	-	194.1	1.2	0.3125 – 40.0
GlcNAc	-	221.2	1.4	0.3125 – 40.0
Man5	-	828.7	5.2	$7.81 \cdot 10^{-3}$ – 2.5
Peptid 24	$^{225}G I N I T N^{230}$	629.7	4.0	$9.76 \cdot 10^{-3}$ – 0.635
Peptid 25	$^{225}G I N(GlcNAc) I T N^{230}$	862.9	5.4	$9.76 \cdot 10^{-3}$ – 1.25

Für alle untersuchten Substanzen ergaben sich negative Bindungskurven, die jedoch eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit aufweisen. In Abbildung 51 sind exemplarisch die Sensorgramme für das α -MeMan gezeigt.

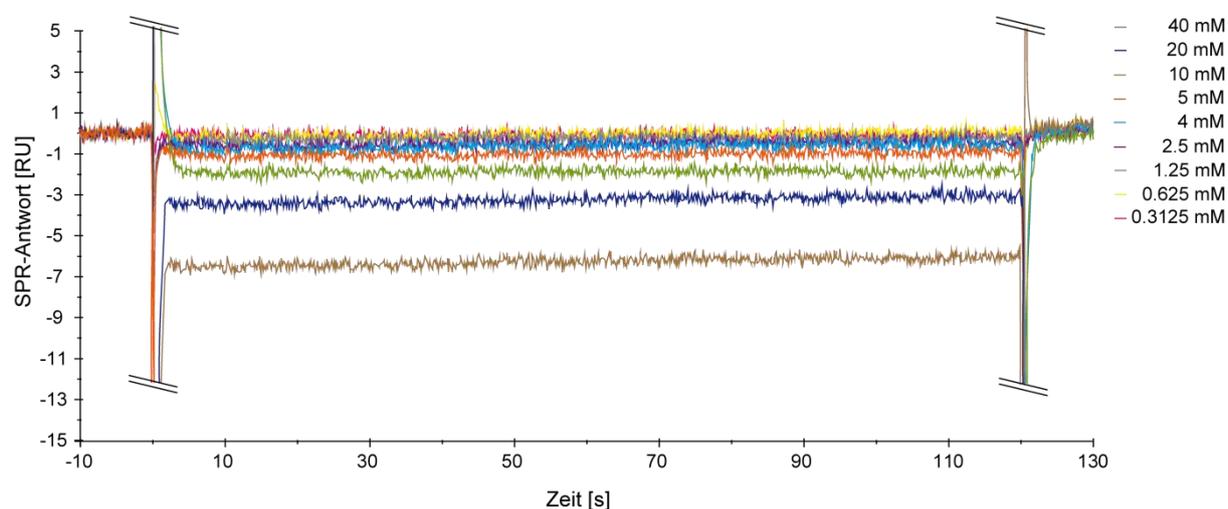


Abbildung 51: SPR-Sensorgramme für Messungen von MeMan gegen 6.3 fmol CRD des L-SIGN. Es wurden Konzentrationen zwischen 0.3125 und 40 mM analysiert.

Der Grund für negative SPR-Sensorgramme ist nicht geklärt, wenn diese allerdings ein konzentrationsabhängiges Verhalten zeigen, ist es möglich einen Fit nach dem *one-site-binding*-Modell durchzuführen.¹³² Dazu musste für alle RU-Antworten das Vorzeichen geändert werden. Somit wurden positive Sensorgramme erhalten, aus denen die thermodynamische

Dissoziationskonstante K_D ermittelt werden konnte. In Abbildung 52 sind die Affinitätsplots für die Kohlenhydrate α -MeMan und GlcNAc gezeigt.

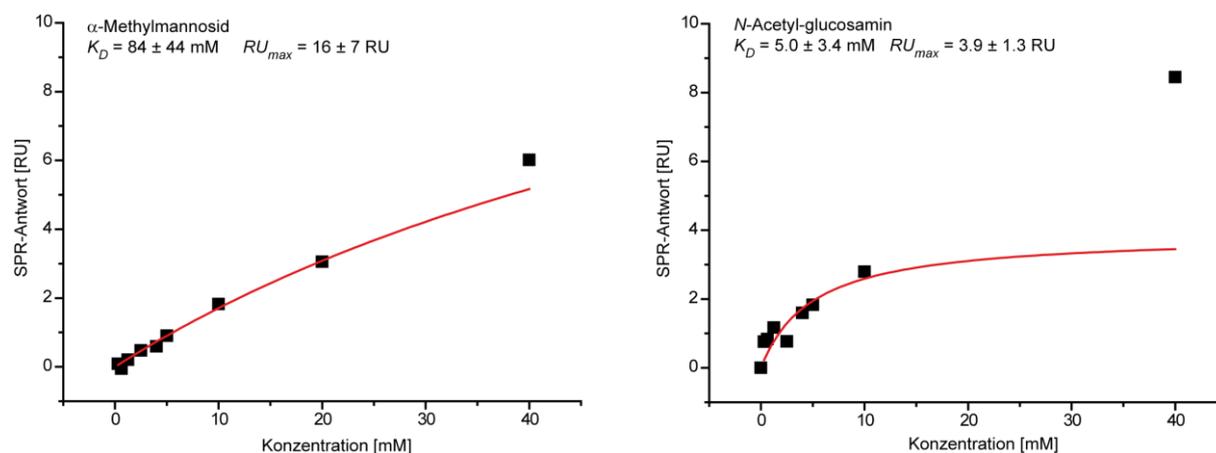


Abbildung 52: Thermodynamische Affinitätsanalyse der Kohlenhydrate α -MeMan und GlcNAc zur CRD des L-SIGN. Es wurden Konzentrationen bis 40 mM vermessen. Beim GlcNAc konnte für die Konzentration von 20 mM wegen Luft in der Probe kein SPR-Sensorgramm erhalten werden. Ab einer Konzentration von 40 mM kommt es bei beiden Kohlenhydraten zu einem unspezifischen Bindungsverhalten. Daher wurde dieser Werte jeweils nicht mit in Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell miteinbezogen.

Sowohl beim α -MeMan als auch beim GlcNAc lässt sich eine Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell durchführen. Es wurde jeweils die höchste Konzentration von 40 mM nicht miteinbezogen, da es ab dieser Konzentration zu einem linearen Kurvenverlauf kommt, was für ein unspezifisches Bindungsverhalten spricht. Für das α -MeMan ergibt sich ein K_D -Wert von 84 ± 44 mM. Für das GlcNAc liegt die Bindungskonstante bei $K_D = 5.0 \pm 3.4$ mM. Der RU_{max} -Wert für das α -MeMan liegt mit 16 ± 7 RU über den theoretisch ermittelten $RU_{max,theo}$ -Wert vom 1.2 RU, was für einen unspezifischen Anteil an der Bindung zwischen α -MeMan und der CRD des L-SIGN sprechen könnte. Der RU_{max} -Wert für das GlcNAc beträgt 3.9 ± 1.3 RU und liegt somit näher an dem $RU_{max,theo}$ -Wert vom 1.4 RU.

Das Man5 wurde in Konzentrationen zwischen 0.00781 und 2.5 mM analysiert. Dabei zeigt der Affinitätsplot ab einer Konzentration von 0.625 mM einen linearen Verlauf, was durch ein unspezifisches Bindungsereignis verursacht wird. Die *one-site-binding*-Analyse für die niedrigen Konzentrationen ergibt einen K_D -Wert von 5.1 ± 2.6 μ M und einen RU_{max} -Wert von 0.58 ± 0.03 RU. Die RU-Antwort liegt damit um eine Faktor 10 unter dem $RU_{max,theo}$ -Wert vom 5.2 RU, was bei der Bewertung der Bindungskonstante mit berücksichtigt werden muss.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

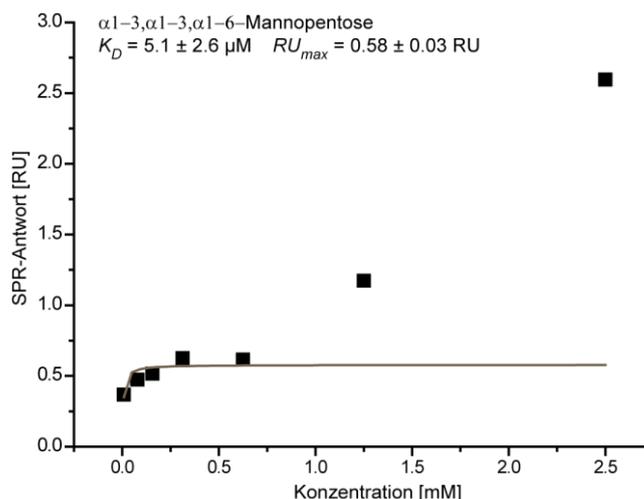


Abbildung 53: Thermodynamische SPR-Analyse der Bindung zwischen Man5 und der CRD des L-SIGN. Da der $R_{U_{max}}$ -Wert unter dem $R_{U_{max,theo}}$ -Wert liegt, muss die Qualität der *one-site-binding*-Analyse kritisch beurteilt werden, was durch einen grauen *fit* verdeutlicht werden soll.

Neben den drei Kohlenhydrat-Molekülen wurden das Peptid **24** und das Glycopeptid **25** mittels SPR-Messungen auf ihre Bindungsaffinität zur CRD des L-SIGN analysiert. Beide Peptide geben die Aminosäuren $^{225}\text{GINITN}^{230}$ der RBD des S-Proteins aus dem SARS-CoV wieder. Das N227 liegt in der RBD mit einem hochmannosidischen *N*-Glycan glycosyliert vor. Stellvertretend für das Glycan ist das Peptid **25** am N227 mit einem GlcNAc glycosyliert. SPR-Messungen mit GlcNAc zeigen, dass es mit einem K_D von 5.0 ± 3.4 mM an die CRD des L-SIGN bindet. Die Affinitätsplots für **24** und **25** sind in Abbildung 54 gezeigt.

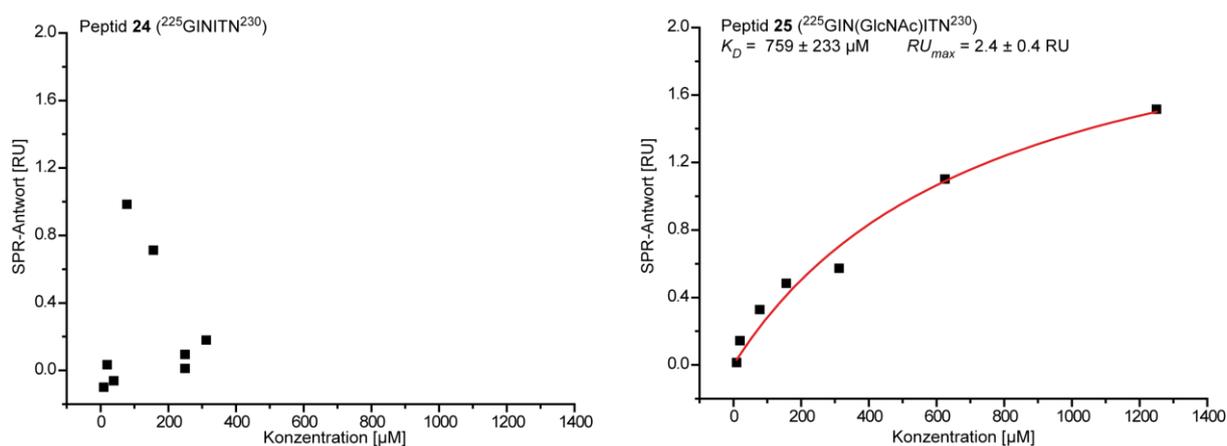


Abbildung 54: Affinitätsplot von Peptid **24** und Glycopeptid **25**

Für das nicht glycosylierte Peptid **24** lässt sich keine Bindung zur CRD detektieren. Ab einer Peptidkonzentration von $624 \mu\text{M}$ treten lediglich unspezifische Wechselwirkungen auf. Das Glycopeptid **25** weist eine konzentrationsabhängige, spezifische Bindung zur CRD des L-SIGN auf. Durch Anwendung des *one-site-binding*-Modells lässt sich eine

Bindungskonstante von $K_D = 0.76 \pm 0.23$ mM und ein RU_{max} -Wert von 2.4 ± 0.4 RU bestimmen. Das mit einer GlcNAc-Einheit glycosylierte Peptid bindet um Faktor 6.5 besser an die CRD als das isolierte Kohlenhydrat. Dies lässt auf einen Anteil der Seitenketten der Aminosäuren an der Bindung schließen. Das nicht glycosylierte Peptid **24** zeigt hingegen keine spezifische Wechselwirkung mit dem Rezeptor. Das Kohlenhydrat ist also essentiell für die Bindung.

Die Ergebnisse für die SPR-Messungen mit dem mittels Standard-Amid-Methode immobilisierten CRD-Protein sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der SPR-Messung mit 6.3 fmol der CRD des L-SIGN, welche durch Standard-Amid-Kupplung auf dem Chip immobilisiert wurde. Da der Fit nach dem *one-site-binding*-Modell für das Kohlenhydrat Man5 kritisch bewertet werden muss, sind die Ergebnisse in Klammern aufgeführt. k.B. = keine Bindung.

Substanz	$RU_{max,theo}$	K_D	RU_{max}	Konzentrationsbereich
α -MeMan	1.2	84 ± 44 mM	16 ± 7	0.3125 – 40 mM
GlcNAc	1.4	5.0 ± 3.5 mM	3.8 ± 1.3	0.3125 – 40 mM
Man5	5.2	$(5.1 \pm 2.6 \mu\text{M})$	(0.58 ± 0.03)	7.81 - 2500 μM
Peptid 24	4.0	k. B.	k. B.	9.765 – 635 μM
Peptid 25	5.4	$758 \pm 233 \mu\text{M}$	2.4 ± 0.4	9.765 – 1250 μM

Anschließend wurden SPR-Messungen mit dem Chip, auf dem 14.4 fmol CRD über die *antibody-based-capture*-Methode immobilisiert wurden, durchgeführt. Als Ligand wurde α -MeMan vermessen. Bei einem 1:1-Bindungsereignis zwischen der CRD und α -MeMan würde ein $RU_{max,theo}$ von 2.7 RU erreicht werden. Es wurden Konzentrationen des α -MeMan von 0.125 - 16.0 mM in TBS auf ihre Bindungsaffinität zur CRD getestet. Dabei ergaben sich negative Sensorgramme, deren Vorzeichen für eine Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell positiviert wurden. Die daraus resultierende Auftragung der maximalen RU-Antworten gegen die jeweilige Kohlenhydratkonzentration ist in Abbildung 55 dargestellt.

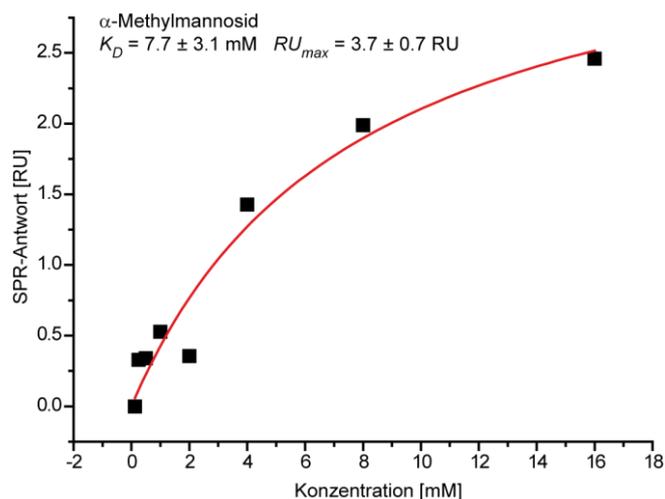


Abbildung 55: Thermodynamische Analyse der Interaktion von α -MeMan mit der CRD des L-SIGN. Es wurden 14.4 fmol der CRD über die *antibody-based-capture*-Methode mittels eines Anti-FLAG Antikörpers auf den Chip immobilisiert.

Durch die *one-site-binding*-Analyse ergibt sich ein Dissoziationskonstante K_D von 7.7 ± 3.1 mM. Der K_D -Wert für die Bindung des α -MeMan an die CRD ist somit um etwa Faktor 20 kleiner, als der K_D -Wert von 84 ± 44 mM, der mit der kovalent immobilisierten CRD bestimmt wurde. Der $R_{U_{max}}$ -Wert liegt mit 3.7 ± 0.7 RU in der Größenordnung des $R_{U_{max,theo}}$ von 2.7 RU, was für ein spezifisches Bindungsereignis spricht.

4.8 STD-NMR-Studien mit CRD

Zur Analyse der Bindung von Liganden an die CRD auf atomarer Ebene sollte ein STD-NMR-System entwickelt werden. Bei allen STD-Messungen mit der CRD lag die Intensität der STD-Signale allerdings in der Größenordnung von Artefaktsignalen in proteinfreien Proben. Ein geeignetes STD-NMR-System konnte im Rahmen dieser Arbeit also nicht gefunden werden.

In der Literatur sind lediglich STD-NMR-Messungen mit dem DC-SIGN-Rezeptor zu finden. Die Experimente wurden dabei mit der extrazellulären Domäne (ECD) des DC-SIGN durchgeführt.^{131, 133-135} Außerdem wurden noch Messungen beschrieben, bei denen ein Sättigungstransfer von Zellen, die DC-SIGN auf ihrer Oberfläche exprimieren, auf Liganden stattfindet.¹³⁶⁻¹³⁷ STD-NMR-Studien mit der CRD des DC-SIGN sind in der Literatur nicht zu finden. STD-Experimente mit dem L-SIGN-Rezeptor (CRD und ECD) sind bisher nicht beschrieben. Die CRDs der beiden homologen Lektin-Rezeptoren besitzen eine molare Masse von etwa 10 kDa. Damit eine ausreichende Spindiffusion stattfindet muss ein Protein eine

Masse > 10 kDa besitzen.¹⁰⁹ Die CRDs des DC-SIGN und des L-SIGN liegen somit an der Detektionsgrenze für STD-NMR-Experimente.

Um NMR-Experimente mit der CRD des L-SIGN durchführen zu können, wurde das Protein zunächst in einen deuterierten Calcium(II)-haltigen *d*TBS (pH 8.0) gebracht. Dafür wurden 200 μ L der aufkonzentrierten CRD (siehe 4.7.3) nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung umgepuffert. Bei der Umpufferung traten die bereits beschriebenen Probleme auf, das Protein fiel aus und die Proteinkonzentration nahm soweit ab, dass in einem SDS-PAGE-Gel keine Bande mehr zu detektieren war. Trotz der sehr geringen Konzentration der CRD wurden STD-NMR-Messungen durchgeführt. Als Ligand wurde das Kohlenhydrat α -MeMan gewählt. Das HDO-Signal wurde mittels einer *excitation-sculpting*-Pulssequenz unterdrückt. Zunächst wurden die Artefakte bestimmt. Dazu wurden STD-Messungen mit Proben durchgeführt, in denen nur α -MeMan, aber keine CRD enthalten ist. Es wurden jeweils Proben mit einer Ligandkonzentration von 244 μ M, 385 μ M, 826 μ M und 2248 μ M vermessen. Anschließend wurde eine STD-Titration mit 100 μ L der CRD durchgeführt, in der dieselben Konzentrationen an α -MeMan zur CRD gegeben wurden. Die absoluten STD-Effekte aus den Artefaktmessungen und der STD-Titration sind exemplarisch für das H-2, das überlagernde Signal aus H-3 und H-6' und für das Signal der OMe-Gruppe am H-1 in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Absolute STD% für die Artefaktmessungen (*kursiv*) und STD-Titration mit verschiedenen Konzentrationen an α -MeMan in *d*TBS. Die Wasserunterdrückung wurde mit der *excitation-sculpting*-Pulssequenz erhalten. Die Temperatur lag bei 300 K.

	<i>Artefakt</i>	STD	<i>Artefakt</i>	STD	<i>Artefakt</i>	STD
Konz. α -MeMan [μ M]	<i>abs. STD% H-2 ohne CRD</i>	abs. STD% H-2 mit CRD	<i>abs. STD% H-3 / H-6' ohne CRD</i>	abs. STD% H-3 / H-6' mit CRD	<i>abs. STD% OMe ohne CRD</i>	abs. STD% OMe mit CRD
244	-	-	-	-	<i>3.4</i>	3.9
385	-	-	-	-	<i>9.7</i>	3.2
826	-	-	<i>3.1</i>	4.3	<i>2.9</i>	3.1
2248	<i>1.5</i>	1.9	<i>2.5</i>	2.5	<i>2.8</i>	2.4

Die STD-Signale in den 1 H-STD-Spektren liegen für die CRD-haltigen Proben in derselben Größenordnung wie für die CRD-freien Proben. Die Signale entstehen somit nicht durch einen Sättigungstransfer von dem Protein auf den Kohlenhydratliganden, sondern es handelt

sich um Artefaktsignale, die vermutlich aus der Pulssequenz zur Unterdrückung des HDO-Signals resultieren.

Um den Konzentrationsverlust durch das Umpuffern der CRD zu vermeiden, wurden Experimente mit der CRD im Original-TBS durchgeführt. Dazu wurden zu der Lösung der CRD im Original-Puffer 10% D₂O zugefügt. Es wurde für jede vermessende Konzentration ebenfalls eine Artefaktmessung durchgeführt. Die resultierenden absoluten STD-Effekte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Absolute STD% für die Artefaktmessungen (*kursiv*) und STD-Titration mit verschiedenen Konzentrationen an α -MeMan in Original-TBS/D₂O (9/1). Die Wasserunterdrückung wurde mit der *excitation-sculpting*-Pulssequenz erhalten. Die Temperatur lag bei 300 K.

	<i>Artefakt</i>	STD	<i>Artefakt</i>	STD	<i>Artefakt</i>	STD
Konz. α -MeMan [μ M]	<i>abs. STD% H-2 ohne CRD</i>	abs. STD% H-2 mit CRD	<i>abs. STD% H-3 / H-6' ohne CRD</i>	abs. STD% H-3 / H-6' mit CRD	<i>abs. STD% OMe ohne CRD</i>	abs. STD% OMe mit CRD
431	<i>5.0</i>	1.5	<i>2.4</i>	2.0	<i>1.4</i>	2.5
868	<i>9.2</i>	2.3	<i>5.8</i>	0.9	<i>6.2</i>	2.9
1266	<i>4.7</i>	1.7	<i>2.1</i>	1.5	<i>1.4</i>	2.1

Auch hier liegen die STD-Prozente in derselben Größenordnung wie die Artefaktsignale bzw. sind kleiner als die Artefaktsignale. Neben der Wasserunterdrückung durch die *excitation-sculpting*-Pulssequenz stehen noch weitere Methoden zur Wasserunterdrückung zur Verfügung. Um zu überprüfen, ob das Auftreten von Artefaktsignalen abhängig von der *excitation-sculpting*-Pulssequenz ist, wurden STD-NMR-Experimente mit der CRD im Original-Puffer durchgeführt, bei denen das Wassersignal durch eine WATERGATE-Pulssequenz unterdrückt wurde. Da hier bei Konzentrationen unter 1000 μ M kaum STD-Signale detektiert werden konnten, wurden Konzentrationen >1000 μ M untersucht. Zu jeder Konzentration des α -MeMan in der CRD-haltigen Probe wurden Artefaktbestimmungen durchgeführt. Die STD-Effekte für die Experimente mit der WATERGATE-Wasserunterdrückung sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Absolute STD% für die Artefaktmessungen (*kursiv*) und STD-Titration mit verschiedenen Konzentrationen an α -MeMan in Original-TBS/D₂O (9/1), Die Wasserunterdrückung wurde mit der WATERGATE-Pulssequenz erhalten. Die Temperatur lag bei 300 K.

	<i>Artefakt</i>	STD	<i>Artefakt</i>	STD	<i>Artefakt</i>	STD
Konz. α -MeMan [μ M]	<i>abs. STD% H-2 ohne CRD</i>	abs. STD% H-2 mit CRD	<i>abs. STD% H-3 / H-6' ohne CRD</i>	abs. STD% H-3 / H-6' mit CRD	<i>abs. STD% OMe ohne CRD</i>	abs. STD% OMe mit CRD
1569	-	-	<i>1.1</i>	1.4	<i>1.0</i>	1.3
1951	<i>0.8</i>	-	<i>0.9</i>	1.0	<i>1.2</i>	0.9
2330	<i>1.0</i>	0.8	<i>1.2</i>	1.0	<i>0.9</i>	1.0
3077	<i>1.1</i>	0.7	<i>1.4</i>	0.9	<i>1.5</i>	1.0

Bei der WATERGATE-Pulssequenz sind die Artefaktssignale zwar von geringerer Intensität als bei der *excitation-sculpting*-Pulssequenz, allerdings liegen die STD-Signale auch hier in derselben Größenordnung wie die Artefaktssignale. Eine Untersuchung der Bindung des α -MeMan an die CRD des L-SIGN-Rezeptors konnte mittels STD-NMR-Spektroskopie nicht erfolgreich durchgeführt werden.

4.9 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zum Design von peptidomimetischen Strukturen als *entry*-Inhibitoren gegen das SARS-CoV genutzt werden. Im folgenden Abschnitt sollen Fragestellungen, die aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultieren und weiterführende Experimente vorgestellt werden.

4.9.1 ACE2

Die MD-Studien zeigen, dass das *N*-Glycan am N90 des ACE2 an der Bindung zur Leitstruktur **1** beteiligt ist, indem der aromatische Ring des Y440 mit dem Glycan wechselwirkt. Dieses Resultat lässt die Fragestellung aufkommen, ob das Glycan auch eine Rolle bei der Bindung des viralen S-Proteins des SARS-CoV an den humanen Zellrezeptor spielt. Das S-Protein des SARS-CoV würde somit als Lektin fungieren. Der Lektincharakter des S-Proteins ließe sich experimentell überprüfen, indem SPR-Studien zwischen der Leitstruktur **1**, dem rekombinanten S-Fusionsprotein oder der kompletten RBD des S-Proteins und glycanfreiem rhACE2 durchgeführt werden. Auch ein STD-NMR-Experiment mit Peptid **1** und glycanfreiem rhACE2 würde eine Aufklärung über den Lektincharakter liefern.

Wenn die Ergebnisse dieser Studien vergleichbare Ergebnisse zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen liefern, würde das auf keine Beteiligung der Glycane des ACE2 an der Bindung hindeuten. Könnte bei den Experimenten mit glycanfreiem ACE2 eine schwächere oder keine Bindung detektiert werden, würde das auf eine Beteiligung der Glycane an der Interaktion zwischen S-Protein und ACE2 hinweisen. Glycanfreies ACE2 lässt sich durch einen enzymatischen Verdau von rhACE2 mit PNGase F erhalten. Durch das Enzym PNGase F werden *N*-Glycane spezifisch von Proteinen abgespalten.

Eine andere Möglichkeit um die Wechselwirkung zwischen der Leitstruktur und dem Glycanmolekül zu detektieren, ist das Transfer-NOE-NMR-Experiment.^{110, 138-139} Wenn eine Interaktion zwischen dem aromatischen Ring des Y440 und dem Glycanmolekül stattfindet, müsste sich das durch ein Transfer-NOE-Signal zwischen den aromatischen Protonen und einem charakteristischen Kohlenhydratsignal bemerkbar machen. Beim Kohlehydrat könnte z.B. das Signal der *N*-Acetyl-Gruppen der GlcNAc-Einheiten genutzt werden, das im aliphatischen Bereich bei etwa 2 ppm vorliegt.

Die Leitstruktur **1** zeigt im Zellassay sowohl einen inhibitorischen Effekt gegen das SARS-Coronavirus als auch gegen das humane Coronavirus NL63. Allerdings setzt dieser Effekt erst bei relativ hohen Peptidkonzentrationen im niedrigen millimolaren Bereich ein. Um die Spezifität der Inhibition zu klären, wurden die Hexapeptide mit den Sequenzen YKYDYL (**8**), YKYSYL (**9**) und ⁴²⁷NIDATS⁴³² (**18**) synthetisiert und für Biotests an das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin gegeben. Bei der Fertigstellung dieser Arbeit lagen die Ergebnisse noch nicht vor. Diese Peptide dienen als Negativkontrolle für den Assay und sollen keinen inhibitorischen Effekt zeigen. Ein Grund dafür, dass millimolare Peptidkonzentrationen benötigt werden, um die virale Vermehrung der Viren reduzieren, könnten Proteasen sein, die den *backbone* des Peptids enzymatisch verdauen. Um diesem Verdau durch Proteasen entgegen zu wirken, könnte der Peptid-*backbone* der Leitstruktur **1** peptidomimetisch mimikriert werden.

Weitere Daten könnten z.B. durch eine Kokristallisation der Leitstruktur **1** mit dem ACE2 gewonnen werden. Durch anschließende Röntgenkristallstrukturanalyse könnte der Bindungsmodus des Peptids an den humanen Rezeptor weiter geklärt werden. Diese Daten könnten für *molecular-modelling*- und *docking*-Studien genutzt werden, um peptidomimetischen Liganden *in silico* zu designen und anschließend zu synthetisieren. Diese sollte dann auch im RT-PCR-Reduktionsassay auf ihren inhibitorischen Effekt getestet werden. Sollten diese Tests positiv verlaufen, kann erwägt werden die biologischen Aktivität

der peptidomimetischen Liganden als Inhibitoren des SARS-CoV im einen Tiermodell zu testen.

4.9.2 L-SIGN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Experimente durchgeführt, um die Bindung des viralen S-Proteins des SARS-CoV an das Lektin L-SIGN zu untersuchen. Diese Untersuchungen sollten mittels SPR- und STD-NMR-Experimente zwischen verschiedenen Liganden zur kohlenhydraterkennenden Domäne (CRD) des L-SIGN stattfinden. Es gelang erste Ergebnisse mittels SPR-Studien zu erhalten. Diese Ergebnisse sind allerdings noch nicht zufriedenstellend, da nur geringe Mengen des CRD-Proteins auf dem SPR-Chip immobilisiert werden konnten. Daher muss die Immobilisierungsmethode weiter verbessert werden. Eine Möglichkeit für die Immobilisierung von Proteinen bietet die Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin, die mit einem K_D -Wert von 10^{-15} M eine sehr hohe Affinität besitzt. Dazu müsste das Protein zunächst biotinyliert werden. Diese Biotinylierung kann beispielweise am N-Terminus des Proteins erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit um die Wechselwirkung zu untersuchen, wären Studien mit der extrazellulären Domäne (ECD) des L-SIGN. Diese bietet u.a. mehr Lysine für eine Immobilisierung mittels Standard-Amid-Kupplung. Auch STD-NMR-Experimente mit der ECD des L-SIGN könnten vielversprechende Ergebnisse liefern, da die ECD mit einer molaren Masse von 45 kDa größer ist als die CRD mit 10 kDa und somit eine ausreichende Spindiffusion im Protein gewährleistet sein sollte.

5 Zusammenfassung

Das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS) ist eine Erkrankung der Atemwege, die durch das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) ausgelöst wird. Die virale Infektion von humanen Zellen findet über eine Interaktion des viralen *spike*-Proteins (S-Proteins) mit dem funktionalen Rezeptor *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) statt.^{2-4, 27}

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bindungsstudien mit humanen Rezeptoren des SARS-CoV durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Wechselwirkung mit dem Rezeptor ACE2 analysiert. Von M. Axmann wurde das Hexapeptid ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ (Peptid **1**), welches den Aminosäuren Y438 bis L443 der Rezeptorbindungsdomäne des SARS-CoV entspricht, als Leitstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors, der spezifisch an den ACE2-Rezeptor bindet, vorgeschlagen.⁶⁴

Um den Bindungsmodus von Peptid **1** an das Glycoprotein ACE2 zu analysieren, wurden *molecular-dynamic* (MD)-Simulationen durchgeführt. Dabei konnte durch die Analyse einer 3000 ps langen MD-Simulation gezeigt werden, dass die Aminosäuren K439, Y440 und R441 der Leitstruktur **1** ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ einen Kontakt zur Oberfläche des humanen Zellrezeptors ACE2 aufweisen. Das K439 und das R441 gehen mit ihren positiv geladenen Seitenketten ionische Wechselwirkungen mit den Carboxylgruppen des E23 und des D30 des Rezeptors ein. Das Y440 zeigt Interaktionen mit einem *N*-Glycan auf der Rezeptoroberfläche.

Durch ein SPR-*screening* der Peptide eines Alaninscans des Hexapeptids **1** ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ sollte die Rolle der einzelnen Aminosäuren an der Bindung zum ACE2 geklärt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Tripeptidmotiv ⁴³⁹KYR⁴⁴¹ einen großen Einfluss auf die Bindung an den ACE2-Rezeptor besitzt. Wenn eine der Aminosäuren dieses Tripeptidmotivs sukzessiv gegen die Aminosäure Alanin substituiert wird, nimmt die Bindung zum ACE2 ab. Ein *screening* von weiteren punktmutierten Peptiden bestätigt den wichtigen Beitrag der positiv geladenen Aminosäuren K439 und R441. Das Peptid **17** RYYYLK, welches die Aminosäuren der Leitstruktur in einer anderen Reihenfolge wiedergibt, zeigt in SPR-Messungen nur unspezifische Wechselwirkung mit dem humanen Wirtsrezeptor, was die Spezifität der Bindung für die Leitstruktur bestätigt.

Die Bindung der Leitstruktur an das Zellrezeptorprotein ACE2 wurde auch mittels STD-NMR-Spektroskopie analysiert, wobei sowohl die thermodynamische Dissoziationskonstante

K_D als auch das Bindungsepitop bestimmt werden konnten. Der K_D -Wert liegt im niedrigen mikromolaren Bereich und bestätigt den per SPR bestimmten K_D -Wert von 41 μM .

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin wurde der inhibitorische Effekt der Leitstruktur **1** auf Coronaviren getestet. Dabei zeigte sich, dass sowohl beim SARS-Coronavirus als auch beim humanen Coronavirus NL63 eine Inhibition auf die Vermehrung der viralen RNA detektiert werden kann.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte der Bindungsmodus des Hexapeptids **1** an den ACE2-Rezeptor aufgeklärt werden und ein inhibitorischer Effekt gegen humane Coronaviren gezeigt werden. Das Peptid **1** eignet sich also zum Design von peptidomimetischen *entry*-Inhibitoren gegen das SARS-CoV und andere Coronaviren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Interaktion des S-Proteins mit dem Lektin L-SIGN untersucht werden, welches als alternativer Rezeptor für den SARS-CoV vorgeschlagen wurde.²⁸ Mittels SPR sollte ein *screening* von Kohlenhydraten, Peptiden und Glycopeptiden durchgeführt werden. Dazu wurde die kohlenhydraterkennende Domäne (CRD) des L-SIGN über unterschiedliche Methoden auf einem SPR-Chip immobilisiert. Dabei gelang es lediglich Mengen <15 fmol zu immobilisieren. Trotz der geringen Mengen an immobilisierten CRD konnten Kohlenhydrate und peptidische Liganden analysiert werden. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit also erste Ergebnisse für die Entwicklung eines SPR-System mit der CRD des L-SIGN erhalten.

6 Summary

The severe acute respiratory syndrome (SARS) is a respiratory disease which is caused by the SARS coronavirus (SARS-CoV). The receptor binding domain (RBD) of the spike (S) protein of SARS-CoV mediates the attachment of the virus to its functional receptor on human cells, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2).^{2-4, 27}

In the current studies the binding events of SARS-CoV to its human cell receptors, the glycoprotein ACE2 and the lectin L-SIGN, were determined. Work from M. Axmann yielded the hexapeptide ⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ (peptide **1**) that stretches from amino acid Y438 to L443 of the RBD and shows specific binding to ACE2. Peptide **1** was suggested as lead structure to design potential entry inhibitors against the attachment of the SARS-CoV to its cell receptor ACE2.⁶⁴

Molecular dynamic (MD) simulations were performed to investigate the binding mode of peptide **1** to ACE2. In a 3000 ps MD simulation the amino acids K439, Y440 and R441 show interactions with the receptor surface. The positively charged residues of K439 and R441 form ionic interactions with the carboxyl groups of E23 and D30 of ACE2. The aromatic side chain of Y440 shows contact to an *N*-glycan of the glycoprotein.

A peptide library corresponding to an alanine scan of the hexapeptide **1** was analyzed using SPR to evaluate the importance of individual amino acids for binding to ACE2. The alanine scan reveals that the tripeptide motif ⁴⁴⁰YRY⁴⁴² is essential for the binding of peptide **1** to ACE2. This fact confirms the results of the *in silico* studies. A second library with point mutated peptides was screened using SPR. Here it could be shown that the positively charged side chains of the amino acids K439 and R441 are important for the receptor binding. In the SPR screening the peptide **17** RYYYLK, which reflects the amino acids of the lead structure in a different order, reveals only unspecific interaction with the human cell receptor. This result confirms the specific interaction between the lead structure peptide **1** and the human cell receptor ACE2.

STD NMR spectroscopy was used to characterize the binding event and binding epitope of peptide **1** to ACE2. The NMR experiments yielded the dissociation constant K_D in the low micromolar range. This K_D -value is consistent with the K_D -value 41 μ M determined by SPR.

To test the biological activity the inhibitory effect of peptide **1** to corona viruses was assayed in cooperation with the Bernhard Nocht Institute for tropical medicine. *In vitro* the

SUMMARY

hexapeptide **1** reduces the virus replication of SARS-CoV and human coronavirus NL63 as shown by real time RT-PCR assays.

These results clarify the binding mode of hexapeptide **1** to the receptor ACE2 and demonstrate an inhibitory potential for human corona viruses. Using this information peptide **1** can be used to design potential antiviral drugs against the attachment of the SARS-CoV and related corona viruses to human cells.

In the second part of this thesis the analysis of the interaction of the viral S protein to the lectin receptor L-SIGN was investigated. L-SIGN was suggested as an alternative receptor for SARS-CoV.²⁸ In order to develop an SPR system for the screening of carbohydrates, peptides and glycopeptides the carbohydrate recognition domain (CRD) of L-SIGN was immobilized on a SPR sensor chip in different ways. It was only possible to immobilize <15 fmol of the CRD on the chip surface. Despite of the small amount of immobilized CRD the binding of carbohydrates and peptide ligands to L-SIGN could be analyzed. The results of this screening can be used to design an SPR system for the lectin L-SIGN.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien und Geräte

7.1.1 Chemikalien

Hersteller/Lieferant	Chemikalien
Acros	Acetonitril (HPLC for gradient analysis), Tri- <i>iso</i> -propylsilan
Biacore	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS), <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC), Ethanolamin, Acetatpuffer
Cambridge Isotope Lab	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- <i>d</i> ₁₁
Deutero	CDCI ₃ (99.8%), Deuteriumoxid, (99.9%), DMSO- <i>d</i> ₆ (99.8%)
Fluka	Methanol (abs.), di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat, Natriumdihydrogenphosphat, Zink(II)chlorid
Iris Biotech	DIPEA, DMF, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu), Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-Rink-Amid-AM-Harz, Piperidin, TBTU
J.T. Baker	Natriumchlorid
Merck	Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform, Dichlormethan, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethanol, Ethylacetat, Essigsäure (100%) Essigsäureanhydrid, Hydrazinhydrat, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, 2-Propanol, Pyridin, Trifluoressigsäure, Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, TRIS-HCl, SDS
Pierce	BCA-Test-Kit
Sigma-Aldrich	2,5-Dihydroxybenzoesäure, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Ammoniumsulfat

7.1.2 Proteine und Antikörper

Produkt	Hersteller	Spezifikation	Puffer
rhACE2	R&D Systems	AS 1 – 740 C-terminaler His-tag c = 1 mg/mL MW = 120 kDa	25 mM Tris, 0.2 M NaCl, 5 µM ZnCl ₂ , pH 8.0
SARS spike (m) protein recombinant (S-Fusionsprotein)	BioMarket Ltd	aus <i>E.coli</i> AS 408-470/540-573 C-terminaler GST-tag c = 1.2 mg/mL MW = 36 kDa	25 mM Tris-HCl, 5mM Glutation, 0.4% Sarcosyl, 0.25% Triton X100, 50% Glycerol, pH 8.0
Glutathione S-Transferase (GST) <i>Schistosoma japonicum</i>	GenScript	aus <i>E.coli</i> c = 1 mg/mL MW = 26 kDa	Gefriergetrocknet mit 1xPBS
Monoklonal Anti-GST Antibody	Sigma-Aldrich	Aszite Flüssigkeit aus <i>Mus musculus</i> (Maus) c = 8.6 mg/mL MW = 27 kDa	15 mM NaN ₃
CRD des L-SIGN	Arbeitsgruppe von K. Holmes, University of Colorado	AS 265-394 C-terminaler FLAG-tag c = 32 µg/mL MW = 15 kDa	TBS (genauere Angaben nicht bekannt)
Monoklonal Anti-FLAG M2 Antibody	Sigma-Aldrich	aus <i>Mus musculus</i> (Maus) c = 1 mg/mL	50% Glycerol, 10 mM Na ₃ P ₀ ₄ , 150 mM NaCl, pH 7.5
Anti-Mouse IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich	aus <i>Capra hircus</i> (Ziege) c = 1 mg/mL	0.05 M Tris, 1% BSA, 1 mM MgCl ₂ , 50% Glycerol, 15 mM NaN ₃ , pH 8.0

7.1.3 Materialien

Material	Produkt	Hersteller
Dialyse-Cap	Mini Dialyse Kit, 250 µL MWCO 1.0 kDa	GE Healthcare
Dialyse-Cap	Slide-A-Lyzer MINI MWCO 3.5 kDa	Thermo Scientific
Dialyse-Cap	Slide-A-Lyzer MINI MWCO 7.0 kDa	Thermo Scientific
NMR-Röhrchen	3mm <i>match</i>	Hilgenberg
NMR-Röhrchen	3mm Shigemi	Shigemi inc.
NMR-Röhrchen	5 mm Typ502, Typ507-HP7	Norell
RP-Säule (analytisch)	EC250/4 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule (präparativ)	VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
Spin-Tubes	SpinX tubes (0.22 µm Celluloseacetat)	CoStar
SPR-Sensorchip	CM5-Chip	GE Healthcare
Spritzenfiltereinheiten	0.22 µm-Filtereinheit, Filtropur S	Sarstedt
TFA-Entfernungseinheiten	VariPure IPE	Varian (jetzt: Agilent)
Western-Blot Membran	ProtranNitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell
Zentrifugalkonzentratoren	Amicon Ultra 4mL MWCO 5.0 kDa	Millipore

7.1.4 Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
ELISA-Reader	GENios	Tecan
HPLC	Biocad 700E Perfusion	BioCAD
HPLC	Merck/Hitachi LaChrom L-7000-Serie	VWR International
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 , Alpha 1-4	Christ
MALDI-TOF-MS	Biflex III	Bruker Daltonics
Mikrowellen-Reaktor	<i>Mono-mode System Discover</i>	CEM
Mikrowellen-Synthesizer	<i>Liberty</i>	CEM
NanoDrop	ND-1000, Photometer	Peqlab
NMR 500 MHz	DRX500, 11.67 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz Probenkopf mit z-Gradient	Bruker Biospin
NMR 700 MHz	Avance700, 16.35 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit z-Gradient	Bruker Biospin
Parellesyntheseroboter	ACT MOS Ω 496	Advanced Chem Tech
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 M Ω	SGwater
SDS-PAGE Vorrichtung	Minigel-Apparatur LKB 2050 MIDGET	Hoefer Scientific Instruments
SPR	Biacore T100	GE Healthcare
Western Blot	Trans-Blot SD Transfer Cell	BioRad
Zentrifugen	5084, 5417C, 5417R	Eppendorf

7.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
AP-Detektionspuffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl
BCIP	0.5 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat in DMF
Calcium(II)-haltiger BisTris-Puffer	0.2 µm filtriert, 25 mM BisTris, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl ₂ , pH 7.2
Calcium(II)-haltiger <i>d</i> TBS	0.2 µm filtriert, 25 mM Tris- <i>d</i> ₁₁ , 150 mM NaCl, 4 mM CaCl ₂ in D ₂ O, pH 8.0
Calcium(II)-haltiger TBS	0.2 µm filtriert, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 4 mM CaCl ₂ , pH 8.0
Coomassie-Färbelösung	0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 1% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Eisessig
Zink(II)-haltiger <i>d</i> TBS	0.2 µm filtriert, 25 mM Tris- <i>d</i> ₁₁ , 0.2 M NaCl, 5µM ZnCl ₂ in D ₂ O, pH 8.0
Zink(II)-haltiger TBS	0.2 µm filtriert, 25 mM Tris, 200 mM NaCl, 5µM ZnCl ₂ , pH 8.0
MPBS	5% (w/v) Milchpulver in PBS
NBT	0.1% (w/v) NBT, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5
PAGE-Laufpuffer (5x)	125 mM Tris-HCl, 96 mM Glycin, 0.5% (w/v) SDS, pH 8.3
PAGE-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris-HCl, 40% (w/v) Glycerol, 8% (w/v) SDS, 0.004% (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8
PAGE-Trenngel-Puffer (4x)	1.5 M Tris-HCl, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8
PBS	125 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
TPBS	0.1% (v/v) Tween 20 in PBS

7.1.6 Software

Software	Version	Hersteller
Adobe Illustrator	CS 4	Adobe
Biacore T 100 Control Software	1.1.1	GE Healthcare
Biacore T 100 Evaluation Software	1.1.1	GE Healthcare
Maestro (Desmond)	9.0	Schrödinger
Origin Pro	7.5	OriginLab
Topspin	2.1	Bruker Biospin

7.2 Molecular Modelling

Die MD-Simulationen wurden mit der Software Maestro 9.0/Desmond auf einer HP Z600 Workstation mit einer Quadcore CPU durchgeführt. Als Kraftfeld wurde das OPLS_AA/2005 eingesetzt. Als Startstruktur wurde die Kristallstruktur der RBD des S-Proteins im Komplex mit ACE2 (PDB: 2AJF) gewählt und alle Aminosäuren der RBD bis auf das Hexapeptid **1**⁴³⁸YKYRYL⁴⁴³ entfernt.⁶⁰ Die Startstruktur der MD wurde in eine *waterbox* mit orthorombischen *boundary conditions* gesetzt (Lösungsmittelmodell: SPC, 18145 Wassermoleküle, 200 mmol/L NaCl, 78 x 88 x 102 Å). Zur Equilibrierung wurden MD-Simulationen über 11000 ps bei einer Temperatur von 300 K durchgeführt. Nach der Equilibrierung wurde zur Analyse eine MD-Simulation über 3000 ps verwendet. Diese MD wurde mit der Nose-Hoover Thermostat-Methode und einer Relaxationszeit von 2.0 ps bei 300 K simuliert. Das Aufnahmeintervall betrug dabei 0.12 ps. Vor Beginn jeder MD-Simulation wurde das System dreimal über 2000 Schritte minimiert. Über die gesamten MD-Simulationen beträgt der RMSD des Protein-Ligand-Komplex 3.607 Å.

7.3 Peptid- und Glycopeptidsynthesen

7.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)

AAV 1 Automatisierte Mikrowellen-unterstützte Festphasenpeptidsynthese

Die mikrowellen-unterstützte automatisierte Festphasenpeptidsynthese fand am Syntheseroboter *Liberty* der Firma CEM statt. Als Festphase wurde ein Rink-Amid-AM-Harz mit einer Belegung von 0.72 mmol/g verwendet, welches vor Beginn der Synthese über Nacht in DMF zum Quellen gebracht wurde. Die Aminosäurederivate wurden als 0.2 M Lösungen in DMF, der Aktivator TBTU als 0.5 M Lösung in DMF und die Aktivatorbase DIPEA als 2.0 M Lösung in DMF eingesetzt. Die Entschützung der Fmoc-Gruppe wurde mit einer 10%-Lösung von Piperidin in DMF und die Acetylierung der freien Aminofunktionen mit einer 10%-Lösung von Ac₂O in DMF durchgeführt. Alle Syntheseschritte wurden automatisiert in einem Mikrowellen-Reaktionsgefäß durchgeführt. Jedes Aminosäurederivat wurde für 300 s mit 25 Watt bei einer Temperatur von 75 °C gekuppelt. Alle Kupplungsschritte wurden doppelt durchgeführt. Nach der Synthese wurde das Harz in eine Glasfritte überführt und das Peptid nach AAV 7 abgespalten.

AAV 2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Für die automatisierte Parallelfestphasenpeptidsynthese mit dem Synthesizer *ACT MOS 469 Ω* der Firma *Advanced ChemTech* wurde ein Rink-Amid-AM-Harz mit einer Belegung von 0.95 mmol/g eingesetzt. Das Harz wurde in die Reaktionskammern des Syntheseroboters gegeben und mit DMF gequellt. Die Peptidsynthesen wurden automatisiert mit 0.5 M Lösungen der Aminosäurederivate in DMF und 0.5 M Lösungen des Aktivators TBTU und der Aktivatorbase DIPEA in DMF durchgeführt. Dabei wurde während der Reaktion das Verhältnis der Lösungen so gewählt, dass die Aminosäurederivate in einem vierfachen Überschuss und der Aktivator und die Aktivatorbase in einem fünffachen Überschuss, bezogen auf die feste Phase, vorlagen. Für die Entschützung der Fmoc-Gruppe wurde eine 10%-Lösung von Piperidin in DMF und für die Acetylierung der freien Aminofunktionen eine 10%-Lösung von Ac₂O in DMF gewählt. Während aller Reaktionszyklen wurde durch Vortexen des Syntheseblocks für eine Durchmischung von Harz und Reaktionslösung gesorgt. Nach beendeter Synthese wurden die jeweiligen Harze in eine Glasfritte überführt und die Peptide durch AAV 7 erhalten.

AAV 3 Manuelle Kupplung der Aminosäurederivate

Für die manuelle Kupplung der Aminosäurederivate wurde je nach Ansatzgröße eine definierte Menge Harz in eine Glasfritte überführt. Als Harz wurden Rink-Amid-AM-Harze mit einer Belegung von 0.95 mmol/g und 0.72 mmol/g verwendet. Vor Beginn der Synthese wurde das Harz zum Quellen über Nacht mit DMF bedeckt. Anschließend wurden die Fmoc-Schutzgruppen auf dem Harz nach AAV 4 abgespalten. Bei der Kupplungsreaktion wurden die Aminosäurederivate im vierfachen Überschuss und die Kupplungsreagenzien TBTU und DIPEA im fünffachen Überschuss bezogen aufs Harz eingesetzt. Für die Kupplung wurden die Aminosäure, das TBTU und die Base DIPEA je nach Ansatzgröße in 0.5-2 mL DMF gelöst und die Lösung aufs Harz gegeben. Die Reaktionslösung wurde für mindestens 60 min durchmischt. Die Kupplungsreaktion wurde jeweils zweimal mit frischer Reaktionslösung durchgeführt. Nach Entfernung der Reaktionslösung wurden nicht umgesetzte Aminofunktionen nach AAV 5 acetyliert. Der Kupplungszyklus wurde bis zur gewünschten Peptidlänge durchgeführt und das Peptid anschließend nach AAV 7 von der Festphase abgespalten.

AAV 4 Manuelle Fmoc-Abspaltung

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde das Harz je zweimal mit Piperidin/DMF (1:4) versetzt und für 60 min geschüttelt. Das Volumen des Gemisches variierte je nach Ansatzgröße und Belegung des Harzes zwischen 1 mL und 5 mL. Nach dem Abspalten wurde die Abspalllösung entfernt und das Harz mit DMF gewaschen.

AAV 5 Manuelles capping

Zur Acetylierung der nicht reagierten Aminofunktionen wurde das Harz in einer Glasfritte jeweils mit einer 10%-igen Lösung von Essigsäureanhydrid in DMF bedeckt und für 60 min geschüttelt. Das *capping* wurde jeweils zweimal in Folge durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz 8-mal mit DMF gespült.

AAV 6 O-Deacetylierung der Glycopeptide

Die O-Acetylschutzgruppen von Glycopeptiden wurden manuell entfernt, indem das Harz für 5 h mit Hydrazinhydrat/MeOH im Verhältnis 1:5 geschüttelt wurde.

AAV 7 Abspaltung der Peptide von der Festphase

Das Harz wurde in eine Glasfritte überführt. Vor der Abspaltung wurde das Harz zunächst mit 2-Propanol und mit Dichlormethan gewaschen um das DMF vollständig zu entfernen. Anschließend wurde eine frisch angesetzte Abspalllösung aus TFA/TIPS/H₂O im Verhältnis 95/3/2 auf das Harz gegeben und für 90 min geschüttelt. Die Lösung wurde dann in einen Kolben überführt und der Abspaltvorgang mit frischer Abspalllösung wiederholt. Anschließend wurde die Abspalllösung im Feinvakuum entfernt und das Peptidrohprodukt erhalten.

AAV 8 Fällung des Peptidrohprodukts

Zur Fällung wurde das Rohprodukt mit *tert*-Butylmethylether überschichtet und die erhaltene Suspension dreimal mit je 3 mL H₂O extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und der erhaltene Feststoff für die Reinigung per *RP*-HPLC verwendet.

AAV 9 Reinigung der Peptide über *RP*-HPLC

Die Reinigung der Peptide und Glycopeptide erfolgte mittels *reversed-phase (RP)*-HPLC über eine präparative C18 Säule bei einer Flussrate von 20 mL/min. Dazu wurden Gradientenläufe aus den Laufmitteln A und B durchlaufen (Laufmittel A: 95% H₂O, 5% MeCN, 0.1% TFA; Laufmittel B: 95% MeCN, 5% H₂O, 0.1% TFA). Die Peptide wurden standardisiert mit der Methode 1 gereinigt. Nur bei Peptid **18** und **20** wurden über die Methode 2 gereinigt.

Methode 1:

0.5 CV	100% A / 0% B
5.0 CV	100% A / 0% B nach 50% A / 50% B
0.5 CV	50% A / 50% B nach 0 % A / 100% B
1.0 CV	0% A / 100% B
1.0 CV	0% A / 100% B nach 100% A / 0% B

Methode 2:

0.5 CV	100% A / 0% B
5.0 CV	100% A / 0% B nach 70% A / 30% B
0.5 CV	70% A / 30% B nach 0 % A / 100% B
1.0 CV	0% A / 100% B
1.0 CV	0% A / 100% B nach 100% A / 0% B

Für die Reinigung wurden jeweils etwa 50 mg des gefriergetrockneten Rohprodukts der Peptide in 1 mL Laufmittel A gelöst und durch ein Spin-Tube (0.22 µm) zentrifugiert. Nach der HPLC-Reinigung wurden die einzelnen Fraktionen nach AAV 11 identifiziert, gefriergetrocknet und nach AAV 12 charakterisiert.

AAV 10 TFA-Entfernung aus Peptiden

Die Ionenauschromatographie zur TFA-Entfernung aus Peptiden wurde mit dem VariPure IPE Ionentauscher der Firma Varian (jetzt Agilent) durchgeführt. Der Ionentauscher wurde zunächst mit 3 mL *n*-Hexan, 3 mL Ethanol, 3 mL Methanol und 3 mL eines Gemisches aus H₂O/MeCN im Verhältnis 95:5 gespült. Dann wurden bis zu 100 mg Peptid, gelöst in 3 mL eines Gemisches aus H₂O/MeCN im Verhältnis 95:5, auf den Ionentauscher gegeben. Es wurde mit 3 mL desselben H₂O/MeCN-Gemisches und 3 mL MeCN gespült und die Lösungen in einem Kolben aufgefangen. Nach Neutralisieren mit 1 M HCl wurde das Peptid durch Gefriertrocknung erhalten.

AAV 11 Charakterisierung der Peptide mittels MALDI-TOF-MS

Die Charakterisierung der Peptide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie erfolgte mit Hilfe einer DHB-Matrix (DHB-Lösung in 95% H₂O/5% MeCN). Dazu wurden jeweils 0.5 µL der Matrix auf einen Probenhalter gegeben. Nach Trocknung der Matrix wurden 0.5 µL der zu analysierenden Lösung auf die Matrix gegeben. Die Messungen erfolgten im positiven Ionenmodus bei einer Attenuation zwischen 35 und 50 dB mit 50 Laserpulsen.

AAV 12 Charakterisierung der Peptide mittels NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Peptide wurde an einem 500 MHz-Spektrometer vorgenommen. Dazu wurde eine etwa 3 mM Lösung des jeweiligen Peptids in H₂O/D₂O (9:1, pH 3) angesetzt. Es wurden Spektren mit Wasserunterdrückung bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Die Wasserunterdrückung erfolgt mit der WATERGATE- oder der *excitation sculpting* Pulssequenz. Die einzelnen Signale der Peptide wurden mit Hilfe von TOCSY-Spektren zugeordnet und die Peptidsequenz durch ROESY-Spektren überprüft. Bei Glycopeptiden erfolgte die genaue Zuordnung der Kohlenhydratsignale durch H,H-COSY-Spektren. Die Aufnahme der 2D-Experimente erfolgte mit 128 oder 256 Inkrementen und 4096 Datenpunkten. Es wurden je nach Pulsprogramm die Aufnahmetechniken echo-antiecho, QF, TPPI oder states-TPPI verwendet. Bei der Verwendung von *pulsed field gradients* wurde ein SINE.100 Puls mit einer Länge von

1 ms gewählt. Der *gradient recovery delay* wurde auf 100 μ s eingestellt. Zur Verbesserung der Auflösung wurde ein *zero-filling* durchgeführt. Alle Spektren wurden mit der Software Topspin prozessiert und auf das HDO-Signal bei 4.745 kalibriert.¹⁴⁰

Tabelle 17: Parameter und Pulsprogramme für die NMR-Charakterisierung von Peptiden

Pulsprogramm-TOCSY	<i>mlevgpwh5</i>
Pulsprogramm-ROESY	<i>roesygpw5.dt</i>
Wasserunterdrückung	WATERGATE
Temperatur	300 K

AAV 13 ¹⁹Fluor-NMR von Peptiden

Die ¹⁹F-NMR-Spektren wurden an einem 500 MHz Spektrometer erhalten. Dazu wurden jeweils eine 3 mM Lösung des Peptids in D₂O mit 2 μ M Fluorethanol als interner Standard versetzt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem Pulsprogramm *zgflqn*.

7.3.2 Darstellung des Glycobausteins Asn-GlcNAc-OH

Zur Darstellung der Glycopeptide **21**, **23** und **25** wurde zunächst der Glycobaustein Asn-GlcNAc-OH

nach einer literaturbekannten Synthese dargestellt.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Der Baustein wurde anschließend als Aminosäurederivat in der automatisierten Synthese nach AAV 1 eingesetzt.

7.3.3 Synthese und Charakterisierung der Peptide

Alle Peptide und Glycopeptide wurden nach AAV 9 gereinigt, bis eine Reinheit von > 95% erreicht wurde.

Peptid 1	YKYRYL
Molmasse (g/mol)	904.07
Exakte Masse (g/mol)	903.50
Summenformel	C ₄₅ H ₆₅ N ₁₁ O ₉
Ansatzgröße (μM)	300
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.37
Ausbeute	165 mg (182 μmol, 61%)
MALDI-TOF (m/z)	904.1 (M+H ⁺), 926.1 (M+Na ⁺)

Tabelle 18: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 1 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Tyr	-	4.142	3.014	3.014	-	-	7.007	7.007	6.796	6.796	-
Lys	8.320	4.270	1.616	1.616	1.255	1.255	1.616	1.616	2.926	2.926	Hζ 7.486
Tyr	8.132	4.499	2.976	2.976	-	-	7.092	7.092	6.811	6.811	-
Arg	8.097	4.182	1.642	1.642	1.428	1.428	3.107	3.107	7.089	-	-
Tyr	8.099	4.466	2.904	2.904	-	-	7.139	7.139	6.821	6.821	-
Leu	8.122	4.211	1.517	1.517	1.517	-	0.869	0.791	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 2	AKYRYL
Molmasse (g/mol)	811.97
Exakte Masse (g/mol)	811.47
Summenformel	C ₃₉ H ₆₁ N ₁₁ O ₈
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.20
Ausbeute	15 mg (19 μmol, 37%)
MALDI-TOF (m/z)	811.8 (M+H ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 19: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 2 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Ala	-	4.046	1.441	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	8.503	4.216	1.630	1.630	1.274	1.274	1.630	1.630	2.919	2.919	H ζ 7.495
Tyr	8.205	4.483	2.863	2.863	-	-	7.054	7.054	6.788	6.788	-
Arg	8.103	4.171	1.593	1.593	1.437	1.437	3.072	3.072	7.067	-	-
Tyr	8.121	4.473	2.951	2.951	-	-	7.146	7.146	6.827	6.827	-
Leu	8.129	4.188	1.502	1.502	1.502	-	0.863	0.793	-	-	CONH ₂ 7.098 / 6.962

Peptid 3	YAYRYL
Molmasse (g/mol)	846.97
Exakte Masse (g/mol)	846.44
Summenformel	C ₄₂ H ₅₈ N ₁₀ O ₉
Ansatzgröße (μ M)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.51
Ausbeute	15 mg (18 μ mol, 35%)
MALDI-TOF (m/z)	847.0 (M+H ⁺), 870.4 (M+Na ⁺), 885.4 (M+K ⁺)

Tabelle 20: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 3 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.124	3.013	3.013	-	-	7.031	7.031	6.783	6.783	-
Ala	8.369	4.347	1.265	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.050	4.442	2.899	2.899	-	-	7.068	7.068	6.804	6.804	-
Arg	8.039	4.203	1.625	1.625	1.438	1.438	3.102	3.102	7.084	-	-
Tyr	8.143	4.487	2.972	2.972	-	-	7.134	7.134	6.820	6.820	-
Leu	8.115	4.210	1.521	1.521	1.521	-	0.864	0.787	-	-	CONH ₂ n.d.

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 4	YKARYL
Molmasse (g/mol)	811.97
Exakte Masse (g/mol)	811.47
Summenformel	C ₃₉ H ₆₁ N ₁₁ O ₈
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.05
Ausbeute	13 mg (16 μmol, 32%)
MALDI-TOF (m/z)	812.9 (M+H ⁺)

Tabelle 21: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 4 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Tyr	-	4.175	3.092	3.092	-	-	7.091	7.091	6.812	6.812	-
Lys	8.312	4.237	1.652	1.652	1.336	1.336	1.652	1.652	2.949	2.949	Hζ 7.481
Ala	8.315	4.237	1.334	-	-	-	-	-	-	-	-
Arg	8.283	4.196	1.687	1.687	1.515	1.515	3.141	3.141	7.105	-	-
Tyr	8.195	4.558	2.979	2.979	-	-	7.116	7.116	6.825	6.825	-
Leu	8.135	4.221	1.523	1.523	1.523	-	0.869	0.802	-	-	CONH ₂ 6.970/6.888

Peptid 5	YKYAYL
Molmasse (g/mol)	818.96
Exakte Masse (g/mol)	818.43
Summenformel	C ₄₂ H ₅₈ N ₈ O ₉
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.56
Ausbeute	12 mg (15 μmol, 30%)
MALDI-TOF (m/z)	818.6 (M+H ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 22: ^1H -chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 5 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.131	2.989	2.989	-	-	6.998	6.998	6.791	6.791	-
Lys	8.317	4.237	1.590	1.590	1.204	1.204	1.590	1.590	2.919	2.919	H ζ 7.479
Tyr	7.990	4.480	2.872	2.872	-	-	7.107	7.107	6.814	6.814	-
Ala	8.180	4.217	1.277	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	7.915	4.492	2.985	2.985	-	-	7.123	7.123	6.816	6.816	-
Leu	8.000	4.220	1.526	1.526	1.526	-	0.879	0.810	-	-	CONH $_2$ n.d.

Peptid 6 **YKYRAL**

Molmasse (g/mol)	811.97
Exakte Masse (g/mol)	811.47
Summenformel	$\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_{11}\text{O}_8$
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.06
Ausbeute	12 mg (15 μmol , 29%)
MALDI-TOF (m/z)	811.9 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Tabelle 23: ^1H -chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 6 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.148	3.017	3.017	-	-	7.020	7.020	6.805	6.805	-
Lys	8.314	4.276	1.620	1.620	1.273	1.273	1.620	1.620	2.935	2.935	H ζ 7.489
Tyr	8.185	4.468	2.973	2.92	-	-	7.124	7.124	6.806	6.806	-
Arg	8.074	4.189	1.651	1.651	1.538	1.538	3.131	3.131	7.106	-	-
Ala	8.218	4.269	1.362	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	8.194	4.17	1.622	1.622	1.622	-	0.913	0.848	-	-	CONH $_2$ n.d.

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 7	YKYRYA
Molmasse (g/mol)	861.99
Exakte Masse (g/mol)	861.45
Summenformel	C ₄₂ H ₅₉ N ₁₁ O ₉
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	2.84
Ausbeute	13 mg (15 μmol, 30%)
MALDI-TOF (m/z)	862.9 (M+H ⁺)

Tabelle 24: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 7 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Tyr	-	4.134	3.004	3.004	-	-	6.999	6.999	6.787	6.787	-
Lys	8.302	4.267	1.608	1.608	1.250	1.250	1.608	1.608	2.923	2.923	Hζ 7.479
Tyr	8.131	4.458	2.899	2.899	-	-	7.085	7.085	6.787	6.787	-
Arg	8.122	4.176	1.618	1.618	1.394	1.394	3.095	3.095	7.073	-	-
Tyr	7.99	4.42	2.91	2.91	-	-	7.134	7.134	6.818	6.818	-
Ala	8.173	4.198	1.315	-	-	-	-	-	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 8	YKYDYL
Molmasse (g/mol)	862.97
Exakte Masse (g/mol)	862.42
Summenformel	C ₄₃ H ₅₈ N ₈ O ₁₁
Ansatzgröße (μM)	200
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.34
Ausbeute	86 mg (100 μM, 50 %)
MALDI-TOF (m/z)	863.6 (M+H ⁺), 885.6 (M+Na ⁺), 910.6 (M+K ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 25: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 8 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.345	3.185	3.185	-	-	7.211	7.211	6.994	6.994	-
Lys	8.384	4.441	1.793	1.793	1.424	1.424	1.793	1.793	3.118	3.118	H ζ 7.597
Tyr	8.155	4.666	3.057	3.057	-	-	7.271	7.271	7.003	7.003	-
Asp	8.396	4.804	3.001	2.879	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.019	4.620	3.167	3.167	-	-	7.301	7.301	7.012	7.012	-
Leu	8.048	4.666	1.731	1.731	1.624	-	1.058	1.000	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 9	YKYSYL
Molmasse (g/mol)	834.96
Exakte Masse (g/mol)	834.43
Summenformel	C ₄₂ H ₅₈ N ₈ O ₁₀
Ansatzgröße (μ M)	250
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.24
Ausbeute	136 mg (161 μ M, 65%)
MALDI-TOF (m/z)	835.6 (M+H ⁺), 857.9 (M+Na ⁺)

Tabelle 26: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 9 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.357	3.207	3.207	-	-	7.216	7.216	7.001	7.001	-
Lys	8.389	4.462	1.804	1.804	1.433	1.433	1.804	1.804	3.132	3.132	H ζ 7.601
Tyr	8.115	4.679	3.056	3.056	-	-	7.305	7.305	7.011	7.011	-
Ser	8.242	4.570	3.954	3.954	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.099	4.697	3.211	3.211	-	-	7.324	7.423	7.025	7.025	-
Leu	8.042	4.439	1.741	1.741	1.631	-	1.072	1.019	-	-	CONH ₂ n.d.

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 10	YDYRYL
Molmasse (g/mol)	890.98
Exakte Masse (g/mol)	890.43
Summenformel	C ₄₃ H ₅₈ N ₁₀ O ₁₁
Ansatzgröße (μM)	25
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	n.d.
Ausbeute	8 mg (9 μmol, 34%)
MALDI-TOF (m/z)	891.0 (M+H ⁺)

Tabelle 27: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 10 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Tyr	-	4.084	2.934		-	-	6.931	6.931	6.785	6.785	-
Asp	8.483	4.718	2.726	2.726	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.120	4.445	2.932	2.932	-	-	7.104	7.104	6.801	6.801	-
Arg	8.022	4.182	1.629	1.629	1.429	1.429	3.108	3.108	7.113	-	-
Tyr	8.065	4.501	2.977	2.977	-	-	7.122	7.122	6.816	6.816	-
Leu	8.069	4.218	1.536	1.536	1.536	-	0.868	0.795	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 11	YSYRYL
Molmasse (g/mol)	862.97
Exakte Masse (g/mol)	862.43
Summenformel	C ₄₂ H ₅₈ N ₁₀ O ₁₀
Ansatzgröße (μM)	25
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.17
Ausbeute	10 mg (12 μmol, 47%)
MALDI-TOF (m/z)	861.0 (M+H ⁺), 886.3 (M+Na ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 28: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 11 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.183	3.028	3.028	-	-	7.024	7.024	6.796	6.796	-
Ser	8.371	4.481	3.737	3.737	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.177	4.489	2.935	2.935	-	-	7.088	7.088	6.800	6.800	-
Arg	8.030	4.204	1.626	1.626	1.414	1.414	3.111	3.111	7.075	-	-
Tyr	8.133	4.503	2.980	2.980	-	-	7.134	7.134	6.824	6.824	-
Leu	8.060	4.168	1.485	1.485	1.485	-	0.873	0.796	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 12

YRYRYL

Molmasse (g/mol)	932.08
Exakte Masse (g/mol)	931.50
Summenformel	C ₄₅ H ₆₅ N ₁₃ O ₉
Ansatzgröße (μ M)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.36
Ausbeute	18 mg (19 μ mol, 34%)
MALDI-TOF (m/z)	931.6 (M+H ⁺), 953.6 (M+Na ⁺)

Tabelle 29: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 12 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-				-	-	6.996	6.996	6.783	6.783	-
Arg	8.322	4.286	1.626	1.626	1.463	1.463	3.114	3.114	7.086	-	-
Tyr	8.144	4.471	2.905	2.905	-	-	7.109	7.109	6.791	6.791	-
Arg	8.107	4.193	1.638	1.638	1.422	1.422	3.102	3.102	7.070	-	-
Tyr	8.112	4.498	2.968	2.968	-	-	7.126	7.126	6.814	6.814	-
Leu	8.110	4.226	1.518	1.518	1.518	-	0.864	0.788	-	-	CONH ₂ n.d.

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 13	YSYDYL
Molmasse (g/mol)	821.87
Exakte Masse (g/mol)	821.36
Summenformel	C ₄₀ H ₅₁ N ₇ O ₁₂
Ansatzgröße (μM)	300
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.33
Ausbeute	129 mg (157 μmol, 52%)
MALDI-TOF (m/z)	822.6 (M+H ⁺), 844.6 (M+Na ⁺), 860.6 (M+K ⁺)

Tabelle 30: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 13 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Tyr	-	3.992	2.812	2.812	-	-	6.838	6.838	6.608	6.608	-
Ser	8.328	4.302	3.592	3.592	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.111	4.295	2.735	2.735	-	-	6.877	6.877	6.624	6.624	-
Asp	8.161	4.453	2.571	2.571	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	7.888	4.196	2.824	2.824	-	-	6.940	6.940	6.630	6.630	-
Leu	7.898	4.033	1.372	1.372	1.372	-	0.698	0.622	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 14	YSYSYL
Molmasse (g/mol)	793.86
Exakte Masse (g/mol)	793.36
Summenformel	C ₃₉ H ₅₁ N ₇ O ₁₁
Ansatzgröße (μM)	30
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.28
Ausbeute	n.d.
MALDI-TOF (m/z)	793.9 (M+H ⁺), 815.9 (M+Na ⁺), 831.9 (M+K ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 31: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 14 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Tyr	-	4.161	2.969	2.969	-	-	7.005	7.005	6.780	6.780	-
Ser	8.384	4.449	3.724	3.724	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.136	4.525	2.915	2.915	-	-	7.088	7.088	6.793	6.793	-
Ser	8.108	4.351	3.726	3.726	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	8.059	4.507	3.001	3.001	-	-	7.112	7.112	6.811	6.811	-
Leu	7.953	4.192	1.512	1.512	1.512	-	0.862	0.801	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 15	FSFSFL
Molmasse (g/mol)	745.86
Exakte Masse (g/mol)	745.38
Summenformel	C ₃₉ H ₅₁ N ₇ O ₈
Ansatzgröße (μM)	30
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	4.65
Ausbeute	5 mg (6 μmol, 21 %)
MALDI-TOF (m/z)	746.3 (M+H ⁺)

Tabelle 32: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 14 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Phe	-	4.210	3.054	3.054	-	-	*	*	*	*	H ζ *
Ser	8.368	4.444	3.715	3.715	-	-	-	-	-	-	-
Phe	8.252	4.562	2.996	2.996	-	-	*	*	*	*	H ζ *
Ser	8.134	4.508	3.714	3.714	-	-	-	-	-	-	-
Phe	8.155	4.570	3.072	3.072	-	-	*	*	*	*	H ζ *
Leu	8.052	4.222	1.531	1.531	1.531	-	0.869	0.810	-	-	CONH ₂ n.d.

* = Multiplett zwischen 7.376 und 7.213 ppm

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 16	NYNYKYRYL
Molmasse (g/mol)	1295.44
Exakte Masse (g/mol)	1294.65
Summenformel	C ₆₂ H ₈₆ N ₁₆ O ₁₅
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.21
Ausbeute	28 mg (21 μmol, 43%)
MALDI-TOF (m/z)	1296.1 (M+H ⁺), 1318.0 (M+Na ⁺)

Tabelle 33: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 16 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Asn	-	4.214	2.865	2.865	-	-	7.074	7.024	-	-	-
Tyr	8.604	4.462	2.822	2.822	-	-	6.942	6.942	6.714	6.714	-
Asn	8.241	4.578	2.659	2.564	-	-	6.994	6.941	-	-	-
Tyr	7.983	4.347	2.892	2.892	-	-	6.994	6.994	6.736	6.736	-
Lys	7.990	4.053	1.522	1.522	1.102	1.102	1.522	1.522	2.863	2.863	Hζ 7.452
Tyr	7.780	4.418	2.904	2.805	-	-	7.022	7.022	6.768	6.768	-
Arg	7.875	4.116	1.590	1.590	1.357	1.357	3.028	3.028	7.029	-	-
Tyr	8.078	4.454	2.932	2.932	-	-	7.074	7.074	6.810	6.810	-
Leu	8.030	4.170	1.491	1.491	1.491	-	0.809	0.735	-	-	CONH ₂ n.d.

Peptid 17	RYYYLK
Molmasse (g/mol)	904.07
Exakte Masse (g/mol)	903.50
Summenformel	C ₄₅ H ₆₅ N ₁₁ O ₉
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	3.25
Ausbeute	17 mg (19 μmol, 32%)
MALDI-TOF (m/z)	903.5 (M+H ⁺), 925.4 (M+Na ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 34: ^1H -chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 17 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Arg	-	3.920	1.800	1.800	1.427	1.427	3.101	3.101	6.998	-	-
Tyr	8.576	4.558	2.832	2.832	-	-	7.027	7.027	6.759	6.759	-
Tyr	8.101	4.449	2.796	2.796	-	-	7.031	7.031	6.774	6.774	-
Tyr	7.938	4.440	2.912	2.912	-	-	7.078	7.078	6.789	6.789	-
Leu	7.965	4.248	1.511	1.511	1.511	-	0.889	0.837	-	-	-
Lys	8.083	4.177	1.715	1.715	1.402	1.402	1.715	1.715	2.969	2.969	H ζ 7.500

Peptid 18	NIDATS
Molmasse (g/mol)	618.64
Exakte Masse (g/mol)	618.30
Summenformel	$\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_{11}$
Ansatzgröße (μM)	400
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 2
Retentionszeit (CV)	2.32
Ausbeute	75 mg (121 μmol , 30%)
MALDI-TOF (m/z)	618.7 ($\text{M}+\text{H}^+$), 640.7 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 656.7 ($\text{M}+\text{K}^+$)

Tabelle 35: ^1H -chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 18 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Asn	-	4.197	2.802	2.802	-	-	7.480	6.904	-	-	-
Ile	8.505	4.036	1.698	-	1.282	1.282	0.732	-	-	-	H γ'' 1.018
Asp	8.510	4.539	2.710	2.710	-	-	-	-	-	-	-
Ala	8.242	4.204	1.250	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr	8.058	4.189	4.189	-	1.044	-	-	-	-	-	-
Ser	8.107	4.261	3.712	3.712	-	-	-	-	-	-	CONH $_2$ 7.586/7.061

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 19	FERDIS
Molmasse (g/mol)	764.83
Exakte Masse (g/mol)	764.38
Summenformel	C ₃₃ H ₅₂ N ₁₀ O ₁₁
Ansatzgröße (μM)	20
Synthese	AAV 3
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	2.46
Ausbeute	4 mg (5.2 μmol, 26%)
MALDI-TOF (m/z)	763.1(M+H ⁺), 784.9 (M+Na ⁺),

Tabelle 36: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 19 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Phe	-	4.255	3.194	3.194	-	-	7.355	7.355	7.227	7.227	-
Glu	8.528	4.376	1.956	1.956	2.397	2.397	-	-	-	-	-
Arg	8.428	4.245	1.742	1.742	1.679	1.679	3.202	3.202	7.175	-	-
Asp	8.553	4.719	2.863	2.863	-	-	-	-	-	-	-
Ile	8.170	4.215	1.902	-	1.418	1.418	0.883	-	-	-	Hγ'' 1.157
Ser	8.236	4.410	3.844	3.844	-	-	-	-	-	-	CONH ₂ 7.488/7.109

Peptid 20	MNNKSQ
Molmasse (g/mol)	719.81
Exakte Masse (g/mol)	719.34
Summenformel	C ₂₇ H ₄₉ N ₁₁ O ₁₀ S
Ansatzgröße (μM)	25
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 2
Retentionszeit (CV)	1.43
Ausbeute	6 mg (8 μmol, 32%)
MALDI-TOF (m/z)	719.5 (M+H ⁺), 741.5 (M+Na ⁺), 757.4 (M+K ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 37: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 20 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Met	-	3.969	2.001	2.001	2.423	2.423	-	-	1.938	-	-
Asn	8.818	4.594	2.703	2.609	-	-	7.534	6.853	-	-	-
Asn	8.482	4.514	2.644	2.644	-	-	7.507	6.807	-	-	-
Lys	8.284	4.145	1.645	1.645	1.273	1.273	1.522	1.522	2.825	2.825	H ζ 7.394
Ser	8.255	4.241	3.711	3.711	-	-	-	-	-	-	-
Gln	8.280	4.145	1.985	1.813	2.204	2.204	7.436	6.749	-	-	CONH ₂ 7.467/7.049

Peptid 21

MNN(GlcNAc)KSQ

Molmasse (g/mol)	923.00
Exakte Masse (g/mol)	922.42
Summenformel	C ₃₅ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₅ S
Ansatzgröße (μ M)	50
Synthese	AAV 1 und nach 7.3.2
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	1.23
Ausbeute	14 mg (15 μ mol, 30%)
MALDI-TOF (m/z)	922.3 (M+H ⁺), 944.2 (M+Na ⁺), 960.2 (M+K ⁺)

Tabelle 38: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 21 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Met	-	3.972	2.009	2.009	2.434	2.434	-	-	1.941	-	-
Asn	8.808	4.565	2.658	2.658	-	-	7.528	6.854	-	-	-
Asn	8.518	4.530	2.657	2.657	-	-	-	-	-	-	-
Lys	8.240	4.134	1.578	1.578	1.271	1.271	1.578	1.578	2.839	2.839	H ζ 7.393
Ser	8.239	4.238	3.715	3.715	-	-	-	-	-	-	-
Gln	8.248	4.147	1.811	1.811	2.198	2.198	7.413	6.751	-	-	CONH ₂ 7.452/7.045

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a,b	Ac
GlcNAc	8.554	8.070	4.890	3.636	3.371	3.371	3.636	3.636/3.371	1.842

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 22	IINNST
Molmasse (g/mol)	659.73
Exakte Masse (g/mol)	659.36
Summenformel	C ₂₇ H ₄₉ N ₉ O ₁₀
Ansatzgröße (μM)	25
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	1.97
Ausbeute	15 mg (22 μmol, 88%)
MALDI-TOF (m/z)	660.2 (M+H ⁺)

Tabelle 39: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 22 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Ile	-	3.741	1.819	-	1.349	1.349	0.830	-	-	-	H γ'' 1.072
Ile	8.428	4.075	1.688	-	1.367	1.367	0.753	-	-	-	H γ'' 1.045
Asn	8.586	4.592	2.660	2.660	-	-	7.520	6.813	-	-	-
Asn	8.464	4.621	2.681	2.681	-	-	7.520	6.790	-	-	-
Ser	8.302	4.372	3.781	3.781	-	-	-	-	-	-	-
Thr	8.068	4.198	4.198	-	1.076	-	-	-	-	-	CONH ₂ 7.451/7.096

Peptid 23	IIN(GlcNAc)NST
Molmasse (g/mol)	862.92
Exakte Masse (g/mol)	862.44
Summenformel	C ₃₅ H ₆₂ N ₁₀ O ₁₅
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1 und nach 7.3.2
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	1.62
Ausbeute	26 mg (30 μmol, 60%)
MALDI-TOF (m/z)	862.4 (M+H ⁺), 884.4 (M+Na ⁺), 900.3 (M+K ⁺)

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 40: ^1H -chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 22 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Ile	-	3.707	1.785	-	1.305	1.305	0.801	-	-	-	H γ'' 1.045
Ile	8.413	3.999	1.646	-	1.324	1.324	0.712	-	-	-	H γ'' 1.016
Asn	8.606	4.565	2.727	2.558	-	-	-	-	-	-	-
Asn	8.407	4.586	2.648	2.648	-	-	7.495	6.754	-	-	-
Ser	8.270	4.328	3.748	3.748	-	-	-	-	-	-	-
Thr	8.048	4.149	4.149	-	1.038	-	-	-	-	-	CONH ₂ 7.32/7.077

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a,b	Ac
GlcNAc	8.553	8.090	4.870	3.639	3.348	3.348	3.639	3.639/3.348	1.842

Peptid 24

GINITN

Molmasse (g/mol)	629.71
Exakte Masse (g/mol)	629.35
Summenformel	C ₂₆ H ₄₇ N ₉ O ₉
Ansatzgröße (μM)	25
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	2.81
Ausbeute	12 mg (18 μmol , 72%)
MALDI-TOF (m/z)	630.2 (M+H ⁺)

Tabelle 41: ^1H -chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 24 in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	Sonstige
Gly	-	3.729	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	8.378	4.088	1.705	-	1.310	1.310	0.769	-	-	-	H γ'' 1.042
Asn	8.546	4.636	2.636	2.636	-	-	7.505	6.815	-	-	-
Ile	8.228	4.122	1.773	-	1.324	1.324	0.767	-	-	-	H γ'' 1.060
Thr	8.207	4.209	4.209	-	1.057	-	-	-	-	-	-
Asn	8.346	4.563	2.662	2.662	-	-	7.513	6.802	-	-	CONH ₂ 7.432/7.065

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid 25	GIN(GlcNAc)ITN
Molmasse (g/mol)	832.90
Exakte Masse (g/mol)	832.43
Summenformel	C ₃₄ H ₆₀ N ₁₀ O ₁₄
Ansatzgröße (μM)	50
Synthese	AAV 1 und nach 7.3.2
HPLC	Methode 1
Retentionszeit (CV)	2.35
Ausbeute	4 mg (5 μmol, 10%)
MALDI-TOF (m/z)	832.6 (M+H ⁺), 854.6 (M+Na ⁺), 870.5 (M+K ⁺)

Tabelle 42: ¹H-chemische Verschiebung in [ppm] von Peptid 25 in H₂O/D₂O (9:1), pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer bei 300 K aufgenommen und auf HDO bei 4.745 ppm kalibriert.

	NH	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Hε	Hε'	Sonstige
Gly	-	3.688	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	8.351	4.018	1.657	-	1.288	1.288	0.723	-	-	-	Hγ''0.999
Asn	8.554	4.599	2.660	2.562	-	-	-	-	-	-	-
Ile	8.119	4.077	1.655	-	1.290	1.290	0.723	-	-	-	Hγ'' 1.005
Thr	8.163	4.165	4.130	-	1.027	-	-	-	-	-	-
Asn	8.302	4.516	2.620	2.620	-	-	7.494	6.770	-	-	CONH ₂ 7.397/7.040

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a,b	Ac
GlcNAc	8.531	8.079	4.860	3.648	3.355	3.355	3.648	3.648/3.355	1.842

7.4 SPR-Experimente

Alle SPR-Messungen wurden an einem Biacore T100 Gerät (GE Healthcare) durchgeführt und erfolgten unter Verwendung eines CM5-Chips der Firma GE Healthcare. Alle thermodynamischen Auswertungen nach dem *one-site-binding*-Modell erfolgten mit der Software Origin Pro 7.5.

7.4.1 Immobilisierung nach der Standard-Amid-Methode

Für die SPR-Messungen wird immer einen Flusszellepaar (Fc1/2 oder Fc3/4) bestehend aus Messzelle (Fc2 + Fc4) und Referenzzelle (Fc1 + Fc3) verwendet. Zunächst wurden beide Flusszellen mit einer Flussrate von 10 μL/min für 900 s mit einer frisch angesetzten Lösung

aus 0.05 M NHS und 0.2 M EDC (1:1) aktiviert. Dabei betrug die RU-Differenz auf beiden Flusszellen etwa 300 RU. Anschließend wurde nur die Messzelle angesteuert und das zu immobilisierende Protein mit einer Flussrate von 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Zelle geleitet. Für die Immobilisierung wurde das jeweilige Protein mit einem Acetat-Puffer (pH 4.0 - 4.5) versetzt. Nach der Immobilisierung wurden die freien Carboxylfunktionen auf beide Flusszellen bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 900 s mit einer 1M Ethanolamin-Lösung blockiert.

7.4.2 SPR-Messungen mit dem rhACE2-Protein

Für die SPR-Messungen mit dem rhACE2 der Firma R&D Systems wurden zwei CM5-Chips verwendet. Die Immobilisierungen fanden jeweils in PBS (pH 7.2) statt. Auf dem einen SPR-Chip wurde auf der Messzelle wie in 7.4.1 beschrieben 31 fmol ($\Delta\text{RU} = 3975$) und auf dem anderen SPR-Chip wurden 108 fmol ($\Delta\text{RU} = 12914$) immobilisiert. Dafür wurden jeweils 10 μL (10 μg) des rhACE2 zunächst nach der in 7.6.1 beschriebenen Methode (MWCO = 7 kDa) in den PBS gebracht und dann im Verhältnis 1:4 mit Acetat-Puffer (pH 4.0) verdünnt. Die Immobilisierung erfolgte bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Als Laufpuffer für die Messungen wurde ein Zink(II)-haltiger TBS verwendet. Es wurden verschiedene Konzentrationen der zu vermessenden Substanzen in TBS bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ über den Chip geleitet. Die Injektion erfolgte jeweils für 20 s und die Dissoziationszeit betrug 600 s. Anschließend wurde jeweils für 120 s mit dem Laufpuffer regeneriert. Die Konzentrationen der vermessenden Substanzen sind in Tabelle 43 zusammengefasst.

Tabelle 43: SPR-Messungen mit 31 fmol bzw. 108 fmol des ACE2-Rezeptors. Die Injektionszeit betrug 20 s.

Peptid	SPR-Chip [fmol]	Konzentration [μM]
1	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
2	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
3	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
4	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
5	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32
6	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
7	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
1 (2. Messung)	108	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64

EXPERIMENTELLER TEIL

Peptid	SPR-Chip [fmol]	Konzentration [μM]
8	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
9	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
10	108	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
11	108	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
12	31	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
13	31	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
14	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
15	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
16	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
17	31	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
18	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
19	108	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
S-Fusionsprotein	31	0.0459, 0.0918, 0.18359, 0.36719, 0.73438, 1.46875, 2.9375, 5.875, 11.75

7.4.3 SPR-Messungen mit dem S-Fusionsprotein

Als Negativkontrolle wurden zunächst 52 fmol ($\Delta\text{RU} = 1360$) GST-Protein der Firma Gen Script nach 7.4.1 auf der Messzelle eines CM5-Chips immobilisiert. Dazu wurden 10 μL (10 μg) des GST in PBS mit Acetatpuffer (Verdünnung:1:10, pH 4.0) versetzt und für 120 min über die Messzelle (Fc2) geleitet.

Die Immobilisierung des S-Fusionsproteins erfolgte über die *antibody-based-capture*-Methode. Dazu wurden zunächst 430 μg eines Anti-GST-Antikörper der Firma Sigma mittels 7.6.1 in einen PBS (pH 7.4) gebracht und anschließend 30 μL (256 μg) des Antikörpers in PBS im Verhältnis 1:2 mit Acetat-Puffer (pH 4.5) versetzt. Als Immobilisierungspuffer diente PBS. Es wurden 17000 RU des Antikörpers auf beiden Flusszellen (Fc3/4) nach 7.4.1 mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ immobilisiert.

Es wurde auf den Zink(II)-haltigen TBS als Laufpuffer gewechselt. Es wurden 23 μL (27 μg) des S-Fusionsproteins nach 7.6.1 in den Laufpuffer gebracht und das Volumen auf 150 μL eingestellt. Anschließend wurde das S-Fusionsprotein für 20 min mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Messzelle (Fc4) des Chips geleitet. Dadurch wurden 38 fmol

(Δ RU = 1300) S-Fusionsprotein immobilisiert. Auf der Referenzzelle (Fc3) wurden unter denselben Bedingungen 15 fmol (Δ RU = 400) GST gebracht.

Die Messungen mit Peptid **1** erfolgten bei einer Flussrate von 30 μ L/min mit Konzentrationsreihen des Peptids in TBS. Die Injektion betrug 60 s und die Dissoziation 600 s. Anschließend wurde für 120 s mit dem Laufpuffer regeneriert. Die Konzentration von Peptid **1** sind in Tabelle 45 aufgeführt.

Tabelle 44: SPR-Messungen mit Peptid 1 mit 52 fmol GST bzw. 38 fmol S-Fusionsprotein. Die Injektionszeit betrug 60 s.

Peptid	immo. Protein	Konzentration [μ M]
1	GST	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
1	S-Fusionsprotein	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256

7.4.4 SPR-Messungen mit der CRD des L-SIGN

Die Immobilisierung der CRD des L-SIGN erfolgte zunächst nach der in 7.4.1 beschriebenen Durchführung. Zunächst wurde die CRD nach 7.6.2 in einen Calcium(II)-haltigen BisTris-Puffer gebracht und zusätzlich die Konzentration erhöht, so dass sie 72 μ g/mL betrug. Zur Immobilisierung wurden 50 μ L (3.6 μ g) der CRD im Verhältnis 1:3 mit Acetatpuffer (pH 4.0) versetzt. Es wurden 6.3 fmol (Δ RU = 100) der CRD mit einer Flussrate von 5 μ L/min auf der Messzelle des Chips immobilisiert.

Die Injektion der zu vermessenden Substanzen erfolgte für 120 s bei einer Flussrate von 30 μ L/min. Anschließend fand eine Dissoziationsphase von 600 s statt. Auf eine Regeneration der Chipoberfläche wurde verzichtet. Die Konzentrationen der vermessenden Substanzen in TBS sind in Tabelle 45 zusammengefasst.

Tabelle 45: SPR-Messungen mit 6.3 fmol CRD bei einer Injektionszeit von 120 s.

Substanz	Konzentration [mM]
α -MeMan	0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 4, 5, 10, 20, 40
GlcNAc	0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 4, 5, 10, 40
Man5	$7.8125 \cdot 10^{-3}$, $78.125 \cdot 10^{-3}$, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5
Peptid 24	$9.765 \cdot 10^{-3}$, $19.53 \cdot 10^{-3}$, $39.0625 \cdot 10^{-3}$, $78.125 \cdot 10^{-3}$, 0.15625, 0.25, 0.3125, 0.635
Peptid 25	$9.765 \cdot 10^{-3}$, $19.53 \cdot 10^{-3}$, $39.0625 \cdot 10^{-3}$, $78.125 \cdot 10^{-3}$, 0.15625, 0.25, 0.3125, 0.635, 1.25

Für eine Immobilisierung der CRD nach der *antibody-based-capture*-Methode wurde zunächst ein Anti-FLAG-M2-Antikörper auf der Dextranmatrix eines SPR-Chips immobilisiert. Es wurden 30 μL (30 μg) des Antikörpers nach 7.6.1 in einen BisTris-Puffer (pH 7.2) gebracht. Anschließend wurde die Lösung mit 90 μL Acetatpuffer (pH 4.5) versetzt. Die Immobilisierung erfolgte mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Dadurch wurden 38 300 RU auf beiden Messzellen immobilisiert.

Es wurde auf einen Calcium(II)-haltigen TBS (pH 8.0) als Laufpuffer gewechselt. Zur Immobilisierung der CRD auf der Messzelle wurde die CRD im Original-TBS mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 1200 s über die Messzelle geleitet. Dadurch gelang es 14.4 fmol ($\Delta\text{RU} = 230$) zu immobilisieren.

Es wurde eine Konzentrationsreihe von α -MeMan in TBS über den Chip geleitet. Die Injektionszeit betrug dabei 60 s und die Dissoziationszeit 600 s. Auf eine Regenerierung wurde verzichtet. Die Konzentrationen des α -MeMan sind in Tabelle 46 aufgeführt.

Tabelle 46: SPR-Messungen mit α -MeMan mit 14.4 fmol der CRD über die *antibody-based-capture*-Methode. Die Injektionszeit betrug 60 s.

Substanz	Konzentration [mM]
α -MeMan	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16

Für eine Immobilisierung der CRD über die doppelte *antibody-based-capture*-Methode wurden 2.8 μL (2.8 μg) eines Anti-Maus-IgG (*Capra hircus*, goat) der Firma Sigma Aldrich in PBS (pH 7.4) im Verhältnis 1:10 mit Acetatpuffer (pH 4.5) versetzt und mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ über beide Flusszellen geleitet. Dadurch wurden jeweils 6000 RU des Antikörpers immobilisiert. Anschließend wurde der Anti-FLAG-M2-Antikörper in PBS ($c = 1 \text{ mg}/\text{mL}$) über den Chips geleitet. Dadurch stieg die RU-Antwort auf der Messzelle um 320 RU und die RU-Antwort auf der Referenzzelle um 370 RU. Für die Immobilisierung der CRD auf der Messzelle wurde auf den Calcium(II)-haltigen TBS gewechselt und die CRD im Original-TBS mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Es konnte kein Anstieg der RU-Antwort auf der Messzelle beobachtet werden.

7.5 STD-NMR-Experimente

Alle STD-NMR-Experimente wurden an einem Bruker Avance 700 Spektrometer mit einem Cryoprobekopf durchgeführt. Die Aufnahmebedingungen wurden analog zu denen in der AAV 12 beschriebenen gewählt.

7.5.1 STD-NMR mit ACE2 und Peptid 1

Die STD-NMR-Titration des Peptids **1** gegen rhACE2 der Firma R&D Systems wurden in einem 3mm Shigemi[®]-NMR-Röhrchen mit einem Probenvolumen von 100 μ L durchgeführt. Dazu wurden 10 μ L (10 μ g, 0.83 μ M) rhACE2 mittels der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in einen Zink(II)-haltigen *d*TBS gebracht und verschiedene Konzentrationen von Peptid **1** in der Proteinlösung eingestellt. Zur Einstellung der Peptidkonzentration wurde eine 3 mM Lösung von Peptid **1** in *d*TBS verwendet. Die Bedingungen für die STD-NMR-Experimente sind in Tabelle 47 und die Konzentrationen von Peptid **1** in Tabelle 48 zusammengefasst. Die Bestimmung der STD% erfolgte über die Integrale in den jeweiligen Spektren.

Tabelle 47: Bedingungen für die STD-NMR-Experimente von ACE2 und Peptid 1

Pulsprogramm	<i>stddiffesgp2d.th¹⁴¹</i>
Wasserunterdrückung	<i>excitation sculpting</i>
Temperatur	300 K
<i>on</i> -resonance	-0.5 ppm
<i>off</i> -resonance	40 ppm
Sättigungszeit	4 s

Tabelle 48: Konzentration und Überschuss von Peptid 1 in einer 0.83 μ M Lösung von ACE2. Der Überschuss des Peptids bezieht sich auf das ACE2-Protein.

Konzentration [μM]	14.9	29.7	44.3	58.8	115.4	222.2
Überschuss	18	36	54	72	144	288

Zur Bestimmung von Artefakten wurde eine 222 μ M Lösung von Peptid **1** in Zink(II)-haltigen *d*TBS analog zu den Bedingungen aus Tabelle 47 vermessen. Die absoluten STD-Prozente für diese Messung sind in Tabelle 49 aufgeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 49: Absolute STD-Artefakt-Prozente für eine 222 μM -Lösung von Peptid 1 in *d*TBS. Diese Peptidkonzentration entspricht in der STD-Titration einem 288-fachen Ligandüberschuss.

δ [ppm]	Aminosäure	abs. STD [%]
7.076	Y442-H δ/δ'	2.62
7.012	Y440- H δ/δ'	3.12
6.948	Y438- H δ/δ'	2.21
6.761	Y442-H ϵ/ϵ'	5.24
6.733	Y440- H ϵ/ϵ'	3.49
6.712	Y438- H ϵ/ϵ'	2.27
4.430	Y442-H α	2.85
4.384	Y440-H α	2.38
4.145	L443-H α	3.54
4.082	K439-H α R441-H α	3.31
3.026	R441- H δ/δ'	2.26
2.833	K439-H ϵ/ϵ' Y(all)-H β/β'	2.62
0.804	L443-H δ R441-H β/β'	3.28
0.725	L443-H δ'	3.81

EXPERIMENTELLER TEIL

In Tabelle 50 sind alle absoluten STD-Prozente der Titration von Peptid 1 gegen ACE2 zusammengefasst. Alle STD-Prozente wurden durch die Artefakte aus Tabelle 49 korrigiert.

Tabelle 50: Zusammenfassung der STD% für die Titration verschiedener Konzentrationen von Peptid 1 in eine 0.83 μ M Lösung von ACE2. Der Überschuss von Peptid 1 bezieht sich auf das ACE2. Alle Werte wurden um die Artefakte aus Tabelle 49 korrigiert.

Überschuss		18	36	54	72	144	288
δ [ppm]	Aminosäure						
7.076	Y442-H δ / δ'	14.04	5.39	5.05	4.22	2.93	1.97
7.011	Y440-H δ / δ'	9.47	5.75	2.69	2.86	2.02	1.42
6.948	Y438-H δ / δ'	6.09	3.35	3.56	3.45	2.62	1.96
6.761	Y442-H ϵ / ϵ'	9.11	6.64	3.42	3.35	2.57	1.70
6.733	Y440-H ϵ / ϵ'	8.40	8.55	5.86	5.09	4.05	2.81
6.713	Y438-H ϵ / ϵ'	11.04	8.55	5.19	5.23	3.46	3.26
4.430	Y442-H α	21.05	6.24	-16.52	0.58	3.62	5.46
4.385	Y440-H α	2.97	1.52	-2.24	1.00	1.82	3.63
4.145	L443-H α	4.93	2.31	0.86	0.71	1.85	1.53
4.082	K439-H α R441-H α	3.98	2.68	0.62	1.92	1.35	1.29
3.026	R441-H δ / δ'	4.61	6.31	-0.55	1.46	0.70	0.47
2.833	K439-H ϵ / ϵ' Y(all)-H β / β'	4.97	3.96	-0.16	1.87	0.56	0.61
0.804	L443-H δ R441-H β / β'	1.68	2.87	1.95	1.58	0.59	0.57
0.725	L443-H δ'	4.84	4.44	2.37	1.83	0.92	0.62

EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D wurde nach Gleichung 2-3 der STD-Amplifikationsfaktor für die jeweiligen Protonen aufgestellt.

Tabelle 51: Zusammenfassung der STD-Amplifikationsfaktoren für die Titration verschiedener Konzentrationen Peptid von 1 in eine 0.83 μ M Lösung von ACE2. Der Überschuss von Peptid 1 bezieht sich auf das ACE2.

Überschuss		18	36	54	72	144	288
δ [ppm]	Aminosäure						
7.076	Y442-H δ/δ'	2.53	1.94	2.73	3.04	4.22	5.67
7.011	Y440-H δ/δ'	1.70	2.07	1.45	2.06	2.91	4.08
6.948	Y438-H δ/δ'	1.10	1.21	1.92	2.49	3.77	5.64
6.761	Y442-H ϵ/ϵ'	1.64	2.39	1.85	2.41	3.70	4.90
6.733	Y440-H ϵ/ϵ'	1.51	3.08	3.16	3.66	5.84	8.09
6.713	Y438-H ϵ/ϵ'	1.99	3.08	2.80	3.76	4.99	9.39
4.430	Y442-H α	3.79	2.25	-8.92	0.42	5.22	15.73
4.385	Y440-H α	0.53	0.55	-1.21	0.72	2.62	10.46
4.145	L443-H α	0.89	0.83	0.46	0.51	2.66	4.42
4.082	K439-H α R441-H α	0.72	0.97	0.34	1.38	1.95	3.73
3.026	R441-H δ/δ'	0.83	2.27	-0.30	1.05	1.00	1.34
2.833	K439-H ϵ/ϵ' Y(all)-H β/β'	0.89	1.43	-0.09	1.35	0.81	1.75
0.804	L443-H δ R441-H β/β'	0.30	1.03	1.05	1.14	0.85	1.65
0.725	L443-H δ'	0.87	1.60	1.28	1.32	1.32	1.78

Für die aromatischen Protonen der Tyrosine und die H δ/δ' -Protonen des L443 wurden die jeweiligen STD-Amplifikationsfaktor gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Um den K_D -Wert zu erhalten, wurden mit der Software Origin 7.5 das *one-site-binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst. Die K_D -Werte sind in Tabelle 52 zusammengefasst.

Tabelle 52: Thermodynamische Dissoziationskonstanten K_D für die Bindung einzelnen Protonen des Peptids 1 an den ACE2-Rezeptor. Der χ^2 -Wert und der R^2 -Wert geben die Qualität der jeweiligen Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell an.

δ [ppm]	Protonen	K_D [μ M]	χ^2	R^2
7.076	Y442-H δ/δ'	60 ± 25	0.35	0.90
7.012	Y440-H δ/δ'	57 ± 29	0.28	0.85
6.948	Y438-H δ/δ'	199 ± 36	0.035	0.99
6.761	Y442-H ϵ/ϵ'	71 ± 28	0.23	0.92
6.733	Y440-H ϵ/ϵ'	119 ± 23	0.13	0.98
6.712	Y438-H ϵ/ϵ'	222 ± 114	0.63	0.93
0.804	L443-H δ	30 ± 21	0.07	0.80
0.725	L443-H δ'	10 ± 6	0.05	0.89

7.5.2 STD-NMR-Experimente von Peptid 1 mit dem S-Fusionsprotein

Die NMR-Experimente mit Peptid 1 und dem S-Fusionsprotein der Firma BioMarket Ltd wurden in einem 3mm-*match*-Röhrchen mit einem Probenvolumen von 180 μ L durchgeführt. Es wurden 50 μ L (60 μ g) des S-Fusionsproteins mittels der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in den Zink(II)-haltigen *d*TBS gebracht. Anschließend wurde eine 0.31 μ M Proteinlösung in *d*TBS in das NMR-Röhrchen gegeben. Die Parameter der STD-NMR-Experimente der folgenden Messungen sind in Tabelle 53 zusammengefasst. Die Bestimmung der STD% erfolgte über die Integrale in den jeweiligen Spektren.

Tabelle 53: Parameter für die STD-NMR Experimente von Peptid 1 mit dem GST-tag und für die Experimente von Peptid 1 und dem S-Fusionsprotein

Pulsprogramm	<i>stddiffesgp2d.th</i> ¹⁴¹
Wasserunterdrückung	<i>excitation sculpting</i>
Temperatur	300 K
<i>on</i> -resonance	-0.5 ppm
<i>off</i> -resonance	40 ppm
Sättigungszeit	4 s

Um das Bindungsereignis zwischen dem S-Fusionsprotein und dem Peptid 1 zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen von Peptid 1 in der Proteinlösung eingestellt (Tabelle 54).

Tabelle 54: Konzentration und Überschuss von Peptid 1 in einer 0.31 μM Lösung des S-Fusionsproteins. Der Überschuss des Peptids bezieht sich auf das Protein.

Konzentration [μM]	16.6	33.0	49.2	65.2	127.7	244.9
Überschuss	55	109	164	218	437	874

Um die Messdaten durch Artefakte zu korrigieren, wurde zunächst eine Artefaktmessung mit einer 65 μM Lösung (entspricht dem Titrationspunkt mit einem 218-fachen Überschuss) von Peptid 1 in *d*TBS durchgeführt. Die daraus resultierenden absoluten STD% sind in Tabelle 55 dargestellt.

Tabelle 55: Absolute STD% der Artefaktmessung einer 65 μM Lösung von Peptid 1

δ [ppm]	Aminosäure	abs. STD [%]
7.091	Y442-H δ/δ'	1.51
7.023	Y440-H δ/δ'	1.34
6.960	Y438-H δ/δ'	1.29
6.773	Y442-H ϵ/ϵ'	1.99
6.751	Y440-H ϵ/ϵ'	1.95
6.732	Y438-H ϵ/ϵ'	2.24
4.448	Tyr442-H α	2.21
4.402	Tyr440-H α	2.00
4.161	Leu443-H α	1.81
4.100	K439-H α R441-H α	1.68
3.046	R441-H δ/δ'	1.32
2.940	Y442-H β/β'	1.64
2.860	K439-H ϵ/ϵ'	1.28
2.778	Y(all)-H β/β'	1.35
0.824	L443-H δ	2.08
0.745	L443-H δ'	2.35

Alle nachfolgenden Experimente wurden durch die Artefakt-Prozente korrigiert. Die absoluten STD% für die STD-Titration von Peptid 1 in eine 0.31 μM Lösung des S-Fusionsproteins sind in Tabelle 56 zusammengefasst.

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 56: Zusammenfassung der STD% für die Titration verschiedener Konzentrationen von Peptid 1 in eine 0.31 μ M Lösung des S-Fusionsproteins. Der Überschuss von Peptid 1 bezieht sich auf das Protein. Alle Werte wurden um die Artefakte aus Tabelle 55 korrigiert.

Überschuss		55	109	164	218	437	874
δ [ppm]	Aminosäure						
7.091	Y442-H δ/δ'	48.22	52.27	53.68	51.91	38.87	23.11
7.026	Y440-H δ/δ'	51.28	52.75	54.47	52.06	39.89	23.51
6.966	Y438-H δ/δ'	45.55	51.90	54.18	52.65	38.77	22.32
6.776	Y442-H ϵ/ϵ'	50.64	52.47	54.63	52.45	41.07	25.52
6.754	Y440-H ϵ/ϵ'	50.90	52.95	55.79	53.46	41.49	25.49
6.734	Y438-H ϵ/ϵ'	48.83	54.09	55.98	53.88	41.15	25.47
4.452	Tyr442-H α	40.03	46.33	46.35	41.79	32.59	19.28
4.403	Tyr440-H α	23.53	29.65	37.52	32.52	30.10	19.29
4.161	Leu443-H α	36.47	41.14	44.66	42.57	32.79	19.86
4.100	K439-H α R441-H α	34.78	40.46	45.32	43.24	31.28	17.99
3.046	R441-H δ/δ'	27.75	35.01	37.97	34.19	24.72	12.05
2.940	Y442-H β/β'	23.63	30.77	35.27	33.96	27.21	14.02
2.860	K439-H ϵ/ϵ'	32.25	37.46	40.31	37.73	26.84	13.91
2.778	Y(all)-H β/β'	26.87	32.58	38.96	36.35	27.07	13.82
0.822	L443-H δ	33.11	36.35	42.45	40.05	29.76	14.63
0.748	L443-H δ'	52.68	53.19	51.39	45.83	31.10	15.41

EXPERIMENTELLER TEIL

Aus den absoluten STD% lässt sich nach Gleichung 2-3 der STD-Amplifikationsfaktor berechnen. In Tabelle 57 sind die jeweiligen STD-Amplifikationsfaktoren für die STD-Titration von Peptid 1 und dem S-Fusionsprotein zusammengefasst.

Tabelle 57: Zusammenfassung der STD-Amplifikationsfaktoren für die Titration verschiedener Konzentrationen von 1 in eine 0.31 μ M Lösung des S-Fusionsproteins. Der Überschuss von Peptid 1 bezieht sich auf das Protein.

Überschuss		55	109	164	218	437	874
δ [ppm]	Aminosäure						
7.091	Y442-H δ / δ'	26.33	57.08	87.93	113.37	169.79	201.92
7.026	Y440-H δ / δ'	28.00	57.60	89.22	113.71	174.26	205.35
6.967	Y438-H δ / δ'	24.87	56.67	88.75	114.98	169.34	195.03
6.776	Y442-H ϵ / ϵ'	27.65	57.29	89.48	114.55	179.41	222.91
6.754	Y440-H ϵ / ϵ'	27.79	57.82	91.38	116.75	181.21	222.72
6.734	Y438-H ϵ / ϵ'	26.66	59.07	91.69	117.67	179.75	222.52
4.452	Tyr442-H α	21.86	50.59	75.92	91.27	142.37	168.43
4.403	Tyr440-H α	12.85	32.37	61.45	71.03	131.46	168.50
4.161	Leu443-H α	19.91	44.92	73.16	92.97	143.22	173.51
4.100	K439-H α R441-H α	18.99	44.18	74.24	94.43	136.63	157.14
3.046	R441-H δ / δ'	15.15	38.23	62.20	74.66	107.97	105.26
2.940	Y442-H β / β'	12.90	33.60	57.77	74.18	118.87	122.52
2.860	K439-H ϵ / ϵ'	17.61	40.90	66.02	82.41	117.22	121.53
2.778	Y(all)-H β / β'	14.67	35.58	63.81	79.38	118.25	120.71
0.822	L443-H δ	18.08	39.69	69.53	87.47	130.00	127.82
0.748	L443-H δ'	28.77	58.08	84.17	100.10	135.86	134.66

Das Auftragen der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration und anschließende Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell mit der Software Origin 7.5 ergibt die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D . In Tabelle 58 sind die K_D -Werte für die aromatischen Protonen der drei Tyrosine von Peptid **1** aufgeführt.

Tabelle 58: K_D -Werte der einzelnen aromatischen Protonen für die Bindung von Peptid **1** an das S-Fusionsprotein. Der χ^2 -Wert und der R^2 -Wert geben die Qualität der jeweiligen Analyse nach dem *one-site-binding*-Modell an.

δ [ppm]	Protonen	K_D [μ M]	χ^2	R^2
7.076	Y442-H δ/δ'	126 ± 23	74	0.99
7.012	Y440-H δ/δ'	128 ± 23	78	0.99
6.948	Y438-H δ/δ'	116 ± 25	105	0.98
6.761	Y442-H ϵ/ϵ'	154 ± 24	61	0.99
6.733	Y440-H ϵ/ϵ'	148 ± 25	70	0.99
6.712	Y438-H ϵ/ϵ'	146 ± 24	66	0.99

7.5.3 STD-NMR-Experimente mit Peptid **1** und dem GST-tag

Die STD-NMR-Experimente mit Peptid **1** und dem GST-tag der Firma Gen Script wurden ebenfalls in einem 3mm-*match*-Röhrchen mit einem Probenvolumen von 180 μ L durchgeführt. Sie dienen als Negativkontrolle zu der in 7.5.2 beschriebenen STD-Titration. Daher wurden die Parameter der Experimente analog zu Tabelle 53 gesetzt. Es wurden 160 μ L (160 μ g, $c = 1$ mg/mL) des GST-tags in den Zink(II)-haltigen *d*TBS gebracht (Durchführung siehe 7.6.1). Anschließend wurde im NMR-Röhrchen mittels *d*TBS eine Proteinkonzentration von 2.14 μ M eingestellt. Um die Bindung von Peptid **1** an den GST-tag zu untersuchen wurden die Peptidkonzentrationen von 432.99 μ M sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit (Artefaktmessung) des GST-tags vermessen. Die absoluten STD% und die Artefakt-STD% (kursiv) sind in Tabelle 59 aufgeführt.

Tabelle 59: Absolute STD% und Artefakt-STD% (kursiv) von 433 μM Peptid 1. In einer 2.14 μM GST-tag Probe entspricht dies einen 218-fachen Ligandüberschuss.

δ [ppm]	Aminosäure	abs. STD% mit GST	<i>abs. STD% ohne GST Artefakt</i>
7.114	Y442-H δ/δ'	1.90	<i>1.19</i>
7.048	Y440-H δ/δ'	1.87	<i>1.08</i>
6.983	Y438-H δ/δ'	1.53	<i>1.36</i>
6.801	Y442-H ϵ/ϵ'	3.25	<i>1.67</i>
6.777	Y440-H ϵ/ϵ'	3.13	<i>1.53</i>
6.755	Y438-H ϵ/ϵ'	2.61	<i>1.81</i>
4.473	Tyr442-H α	1.43	<i>2.25</i>
4.428	Tyr440-H α	1.80	<i>1.51</i>
4.186	Leu443-H α	2.24	<i>1.35</i>
4.123	K439-H α , R441-H α	2.11	<i>1.27</i>
3.070	R441-H δ/δ'	0.88	<i>1.06</i>
2.966	Y442-H β/β'	1.29	<i>1.21</i>
2.889	K439-H ϵ/ϵ'	1.36	<i>1.05</i>
2.801	Y(all)-H β/β'	1.33	<i>1.29</i>
0.847	L443-H δ	2.13	<i>1.78</i>
0.769	L443-H δ'	2.27	<i>2.02</i>

7.5.4 STD-NMR-Experimente mit der CRD des L-SIGN und α -MeMan

Um ein STD-System für die CRD des L-SIGN mit α -MeMan als Liganden zu entwickeln wurden sowohl Experimente mit dem Protein in einem deuterierten Puffersystem als auch in einem $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1) Puffersystem durchgeführt. Für alle Experimente wurde ein 3mm-match-Röhrchen mit einem Probenvolumen von 180 μL verwendet. Alle Konzentrationen von α -MeMan wurden sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des CRD-Proteins STD-NMR-spektroskopisch untersucht. Für die Messungen im deuterierten Puffer wurden 200 μL der CRD in BisTris ($\sim 14.4 \mu\text{g}$, $c \sim 72 \mu\text{g}/\text{mL}$) nach der in 7.6.1 beschriebenen Durchführung in einen Calcium(II)-haltigen $d\text{TBS}$ gebracht. Da das Protein während des Umpufferns ausfiel konnte die resultierende Proteinkonzentration nicht bestimmt

werden Für die Messungen im H₂O/D₂O-Puffersystem wurden 162 µL der CRD im Original-TBS mit 18 µL D₂O versetzt. Es wurden STD-Experimente mit einer *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung (Tabelle 60) und einer WATERGATE-Wasserunterdrückung (Tabelle 61) durchgeführt. Aufgrund des sehr geringen Signal/Rausch-Verhältnis im den STD-Spektren erfolgte die Bestimmung der STD% über die Intensitäten. Es wurden jeweils nur für die Signale des H-2, der H-3/H-6' und der Methyl-Gruppe des α-MeMan bestimmt. Die absoluten STD% und die Konzentrationen von α-MeMan sind tabellarisch im Abschnitt 4.8 (Seite 101) aufgeführt.

Tabelle 60: Parameter für die STD-Experimente mit der *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung. Es wurde die CRD im *d*TBS und die CRD im H₂O/D₂O-Puffer untersucht.

Pulsprogramm	<i>stddiffesgp2d.th</i>
Wasserunterdrückung	<i>excitation sculpting</i>
Temperatur	300 K
<i>on</i> -resonance	+0.9 ppm
<i>off</i> -resonance	40 ppm
Sättigungszeit	2 s

Tabelle 61: Parameter für die STD-Experimente mit der *watergate*-Wasserunterdrückung. Es wurde die CRD im H₂O/D₂O-Puffer untersucht.

Pulsprogramm	<i>stddiffgp 19</i>
Wasserunterdrückung	WATERGATE
Temperatur	300 K
<i>on</i> -resonance	+0.9 ppm
<i>off</i> -resonance	40 ppm
Sättigungszeit	2 s

Zur Zuordnung der STD-Signale wurde eine NMR-Charakterisierung des α-MeMan in D₂O durchgeführt.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 4.692 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-1}, \text{H-2}} = 1.8$ Hz, H-1), 3.863 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-2}, \text{H-1}} = 1.8$ Hz, H-2), 3.856 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H-6}, \text{H-5}} = 1.7$ Hz, H-6), 3.706-3.664 (*m*, 2H, H-3, H-6'), 3.593-3.532 (*m*, 2H, H-4, H-5), 3.337 (*s*, 3H, O-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 100.8 (C-1), 72.5 (C-5), 70.5 (C-2), 69.9 (C-3), 66.7 (C-4), 60.9 (C-6), 54.7 (O-CH₃).

7.6 Proteinchemische Methoden

Das Umpuffern von Proteinen wurde entweder in einem Dialyse-Cap oder in einem Zentrifugalkonzentrator durchgeführt. Die Zentrifugalkonzentratoren können zusätzlich zum Konzentrieren von Proteinproben verwendet werden.

7.6.1 Dialyse von Proteinen

Für die Dialyse von Proteinen wurden Dialyse-Caps der Firma GE Healthcare (MWCO = 1 kDa) und der Firma Thermo Scientific (MWCO = 3.5 kDa und MWCO = 7 kDa) verwendet. Vor der Dialyse wurden die Caps jeweils dreimal für 5 min mit *ddH*₂O gespült. Anschließend wurde die Proteinprobe, die in einen anderen Puffer gebracht werden sollte, auf die Dialyse-Membran gegeben. Zur Umpufferung in einen nichtdeutierten Puffer wurde das Dialyse-Cap in einem Schwimmer auf 2 L des Puffers gegeben. Die Dialyse erfolgt über Nacht bei 4 °C. Zur Umpufferung in einem deutierten Puffer wurde das Dialyse-Cap auf 20 mL des deutierten Puffers gegeben. Die Umpufferung erfolgt bei 4 °C, wobei der Puffer dreimal gewechselt wurde. Dabei betrug jeder einzelne Umpufferschritt mindestens 6 h.

7.6.2 Zentrifugalkonzentratoren

Es wurden Zentrifugalkonzentratoren der Firma Millipore mit einer Ausschlussgröße von MWCO = 5 kDa für ein Volumen < 4 mL verwendet. Bevor die Proteinprobe auf die Ausschlussgrößenmembran gegeben wurde, wurde diese zunächst dreimal mit *ddH*₂O gespült. Dazu wurden jeweils 4 mL *ddH*₂O in die Einheit gegeben. Anschließend wurde bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinprobe auf die Membran gegeben und durch Zentrifugieren bei 4000 rpm das Probenvolumen reduziert, was zu einer Erhöhung der Konzentration des Proteins führt. Zum Wechseln des Puffers wurde jeweils dreimal 4 mL Puffer in die Einheit gegeben und durch Zentrifugieren das Volumen reduziert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

7.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 140 V begonnen, die nach etwa 30 min auf 160 V erhöht wurde. Es wurden jeweils 10 μL der Proteinproben in PBS mit 2.5 μL Probenpuffer (reduzierend, 5x) versetzt. Die Proben wurden 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend in eine Tasche des PA-Gels gefüllt. Eine der Probenaschen wurde mit 3 μL eines Proteinstandards beladen. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde für einen anschließenden Western Blot ein vorgefärbter (*prestained*) Proteinstandard und für nachfolgende Coomassie-Färbung der entsprechende nicht-vorgefärbte (*unstained*) Standard aufgetragen.

7.6.4 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen

Nach abgeschlossener elektrophoretischer Auftrennung wurde das SDS-PAGE-Gel für 2 h bei RT mit einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung gefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel anschließend für 1 h bei RT mit 20%iger Essigsäure inkubiert. Die Entfärbelösung wird dabei mehrfach erneuert, bis das Gel eine sichtbare Bandenfärbung mit geringem Hintergrund aufweist.

7.6.5 Western Blot

Der Western Blot findet im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese statt. Durch Anlegen eines elektrischen Feld werden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst ein etwa 8 x 5 cm großes Stück Membran zugeschnitten. Der elektrochemische Transfer erfolgte horizontal in einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur. Dazu wurde mit Transferpuffer getränktes Filterpapier auf die Platinelektrode (Anode) gelegt. Anschließend wurde auf das Filterpapier die Membran und auf diese das luftfreie SDS-PAGE-Gel gelegt. Das Gel wurde mit einer erneuten Schicht angefeuchtetem Filterpapier bedeckt und die Kathode aufgesetzt. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA/cm² durchgeführt und nach etwa 1 h beendet.

7.6.6 Immunprinting

Durch Immunprinting erfolgt die spezifische Detektion bestimmter Proteine auf einer NC-Membran durch Inkubation mit einem primären bzw. sekundären Antikörper. Zunächst wurde die mit PBS gewaschene NC-Membran für 60 min in 4% MPBS blockiert. Anschließend wurde für 60 min mit dem primären Antikörper (1:2500 in 2% MPBS) inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit TPBS (0.2%) und PBS wurde der Alkalische Phosphatase (AP)-

konjugierte sekundäre Antikörper (1:20000 in 2% MPBS) hinzugegeben. Es wurde für 1 h inkubiert und die Membran dreimal mit TPBS und dreimal mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit Detektionslösung (125 μ L NBT-Lsg, 125 μ L BCIP-Lsg. in 11.5 mL AP-Detektionspuffer) behandelt. Durch die eingeleitete AP-katalysierte Farbreaktion wurden die mit Antikörper markierten Proteinbanden sichtbar. Nach abgeschlossener Entwicklung wurde die Membran mit H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet.

7.6.7 BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung

Für die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode wurde ein BCA-Test-Kit der Firma Pierce verwendet.¹²⁰ Das Kit enthält die Lösung A (BCA) und die Lösung B (4% CuSO₄ x H₂O). Die Proteinproben wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 μ L der BCA-Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil Lösung B zusammengesetzt wurde, versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe des Enzyms Lysozym bekannter Konzentration konnte die Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

8 Toxikologie

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225, 319, 336 EUH066	210, 233, 305+351+338
Acetonitril (MeCN)		225, 302+312+332, 319	210, 305+351+338, 403+235
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoro- borat (TBTU)		228, 315, 319, 335	210, 302+352, 304+340, 305+351+338
<i>tert</i> -Butylmethylether		225, 315	210, 302+352
Calciumchlorid		319	305+351+338
Chloroform		351, 302, 373, 315	302+352, 314
Deuteriumoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dichlormethan		351	281, 308+313
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (DIPEA)		225, 301, 314, 412	210, 273, 280, 301+330+331, 305+351+338
2,5-Dihydroxybenzoesäure		302, 315, 319, 335	261, 264, 280, 305+351+338
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodi- imidhydrochlorid (EDC)		335, 315, 319	302+352, 305+351+338
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)		360D, 226, 332, 312, 319	201, 302+352, 302+351+338, 308+313
Essigsäure (100%)		226, 314	280, 301+330+331, 305+351+338
Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O)		226, 332, 302, 314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338

TOXIKOLOGIE

Ethanol		225	210
Ethanolamin		302+312+332, 314	280, 302+352, 301+330+331, 305+351+338
Ethylacetat		225, 319, 336, EUH066	210, 240, 305+351+338
Fmoc-Aminosäurederivate	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Fmoc-Rink-Amid-AM-Harz	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Hydrazinhydrat		226, 350, 301+311+331, 314, 317, 410	201, 210, 273, 280, 301+330+331, 302+352, 304+340 305+351+338
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Kaliumchlorid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Methanol		225, 301+311+331, 370	210, 233, 240, 280, 302+352, 304+340, 403+235
Natriumazid		300, 410, EUH032	273
Natriumchlorid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Piperidin		225, 331, 311, 314	210, 280, 302+352, 301+330+331, 305+351+338
Pyridin		225, 302+352+332	210, 233, 302+352

TOXIKOLOGIE

Salzsäure (32%)		314, 335, 290	280, 301+330+331, 305+351+338
Trifluoressigsäure (TFA)		332, 314, 412	271, 273, 301+330+331, 305+351+338
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Triisopropylsilan (TIPS)		226	210, 260, 262
Zink(II)chlorid		302, 314, 335, 410	273, 280, 301+330+331, 305+351+338

9 Anhang

9.1 Proteinsequenzen

Die Proteinsequenzen stammen aus der UniProt-Datenbank (www.uniprot.org).¹⁴²⁻¹⁴³

9.1.1 Proteinsequenz S-Protein des SARS-CoV

UniProt Nummer: P59594

¹MFIFLLFLTL TSGSDLDRCT TFDDVQAPNY TQHTSSMRGV YYPDEIFRSD TLYLTQDLFL
 PFYSNVTGFH TINHTFGNPV IPFKDGIYFA ATEKSNVVRG WVFGSTMNNK SQSVIIINNS
 TNVVIRACNF ELCDNPFFAV SKPMGTQTHT MIFDNAFNCT FEYISDAFSL DVSEKSGNFK
 HLREFVFKNK DGFLYVYKGY QPIDVVRDLP SGFNTLKPIF KLPLGINITN FRAILTAfsp
 AQDIWGTSAA AYFVGYLKPT TFMLKYDENG TITDAVDCSQ NPLAELKCSV KSFEIDKGIY
 QTSNFRVVPs GDVVRFPNIT NLCPFGEVFN ATKFPSVYAW ERKKISNCVA DYSVLYNSTF
 FSTFKCYGVS ATKLNDLCFS NVYADSFVVK GDDVRQIAPG QTGVIADYNY KLPDDFMGCV
 LAWNTRNIDA TSTGNYNYKY RYLRHGKLRP FERDISNVPF SPDGKPCPP ALNCYWPLND
 YGFYTTTGIG YQPYRVVLS FELLNAPATV CGPKLSTDLI KNQCVNFNFN GLTGTGVLTP
 SSKRFQPFQQ FGRDVSDFTD SVRDPKTSEI LDISPCSFGG VSVITPGTNA SSEVAVLYQD
 VNCTDVSTAI HADQLTPAWR IYSTGNNVFQ TQAGCLIGAE HVDTSYECDI PIGAGICASY
 HTVSLLRSTS QKSIVAYTMS LGADSSIAYS NNTIAIPTNF SISITTEVMP VSMAKTSVDC
 NMYICGDSTE CANLLQYGS FCTQLNRALS GIAAEQDRNT REVFAQVKQM YKTPTLKYFG
 GFNFSQILPD PLKPTKRSFI EDLLFNKVTI ADAGFMKQYG ECLGDINARD LICAQKFNGL
 TVLPPLTDD MIAAYTAALV SGTATAGWTF GAGAALQIPF AMQMAYRFNG IGVTQNVLYE
 NQKQIANQFN KAISQIQESL TTTSTALGKL QDVVNQNAQA LNTLVKQLSS NFGAISSVLN
 DILSRLDKVE AEVQIDRLIT GRLQSLQTYV TQQLIRAAEI RASANLAATK MSECVLGQSK
 RVDFCGKGYH LMSFPQAAPH GVVFLHVTYV PSQERNFTTA PAICHEGKAY FPREGVVFVN
 GTSWFITQRN FFSPQIITD NTFVSGNCDV VIGIINNTVY DPLQPELDSF KEELDKYFKN
 HTSPDVLGD ISGINASVVN IQKEIDRLNE VAKNLNESLI DLQELGKYEQ YIKWPWYVWL
 GFIAGLIAIV MVTILLCCMT SCCSCLKGAC SCGSCCKFDE DDSEPVLKGV KLHYT¹²⁵⁵

9.1.2 Proteinsequenz GST-tag

UniProt Nummer: P08515¹⁴⁴

¹MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID
 GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
 DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK
 KRIEAIQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPK²¹⁸

9.1.3 Proteinsequenz rekombinantes S-Fusionsprotein mit GST-tagUniProt Nummer: P59594 und P08515¹⁴⁴

⁴⁰⁸YNYKLPDDFM GCVLAWNTRN IDATSTGYNY KYRYLRHGKL RPFERDISNV PFSPDGKPC⁴⁷⁰
⁵⁴⁰PPSSKRFQPF QQFGRDVSDF TDSVRDPKTS EILDI⁵⁷³ ¹MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE
 HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA
 EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH
 PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK KRIEAIPQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF
 GGGDHPPK²¹⁸

9.1.4 Proteinsequenz rhACE2 mit His-tagUniProt Nummer: Q9BYF1⁴⁰

¹MSSSSWLLLS LVAVTAAQST IEEQAKTFLD KFNHEAEDLF YQSSLASWNY NTNITEENVQ
 NMNNAGDKWS AFLKEQSTLA QMYPLQEIQN LTVKLQLQAL QQNGSSVLSE DSKSKRLNTIL
 NTMSTIYSTG KVCNPDNPQE CLLLEPGLNE IMANSLDYNE RLWAWESWRS EVGKQLRPLY
 EEYVVLKNEM ARANHYEDYG DYWRGDYEVN GVDGYDYSRG QLIEDVEHTF EEIKPLYEHL
 HAYVRAKLMN AYPYSISPIG CLPAHLLGDM WGRFWTNLYS LTVPFQKPN IDVTDAMVDQ
 AWDAQRFKE AEKFFVSVGL PNMTQGFVEN SMLTDPGNVQ KAVCHPTAWD LGKGDFRILM
 CTKVTMDDFL TAHHEMGHIQ YDMAYAAQPF LLRNGANEGF HEAVGEIMSL SAATPKHLKS
 IGLLSPDFQE DNETEINFLL KQALTIVGTL PFTYMLEKWR WMVFKGEIPK DQWMKKWWEM
 KREIVGVVEP VPHDETYCDP ASLFHVSNDY SFIRYYTRTL YQFQFQEQALC QAAKHEGPLH
 KCDISNSTEA GQKLFNMLRL GKSEPWTAL ENVVGAKNMN VRPLLNYFEP LFTWLKDQNK
 NSFVGVSTDW SPYADQSIKV RISLKSALGD KAYEWNENEM YLFRSSVAYA MRQYFLKVKN
 QMILFGEDV RVANLKPRIS FNFFVTAPKN VSDIIPRTEV EKAIRMSRSR INDAFRLNDN SLEFLGIQPT
 LGPPNQPPVS⁷⁴⁰ ¹MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWGS³⁶

9.1.5 Proteinsequenz L-SIGN

UniProt Nummer: Q9H2X3

¹MSDSKEPRVQ QLGLLEEDPT TSGIRLFPRD FQFQQIHGHK SSTGCLGHGA LVLQLLSFML
 LAGVLVAILV QVSKVPSSLS QEQSEQDAIY QNLTQLKAAV GELSEKSLQ EIYQELTQLK
 AAVGELPEKS KLQEIQELT RLKAAVGELP EKSKLQEIQ ELTRLKAAVG ELPEKSKLQE
 IYQELTRLKA AVGELPEKSK LQEIQELTE LKAAVGELPE KSKLQEIQE LTQLKAAVGE
 LPDQSKQQQI YQELTDLKTA FERLCRHCPK DWTFQGNQCY FMSNSQRNWH DSVTACQEV
 AQLVVIKTAE EQNFLQLQTS RSNRFSWMGL SDLNQEGTWQ WVDGSPLSPS FQRYWNSGEP
 NNSGNEDCAE FSGSGWVNDNR CDVDNYWICK KPAACFRDE³⁹⁹

9.1.6 Proteinsequenz rekombinante CRD-FLAG des L-SIGN

UniProt Nummer: Q9H2X3

²⁶⁴CRHCPKDWTF FQGNCYFMSN SQRNWHDSVT ACQEVRAQLV VIKTAEQNF LQLQTSRSNR
FSWMGLSDLN QEGTWQWVDG SPLSPSFQRY WNSGEPNNSG NEDCAEFSGS GWNDNRCDVD
NYWICKKPAA³⁹⁴ ¹DYKDDDDK⁸

10 Literatur

1. WHO, SARS-lessons from a new disease. In *World Health Report 2003*, World Health Organisation: 2004.
2. Drosten, C.; Gunther, S.; Preiser, W., et al., Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **2003**, *348* (20), 1967-1976.
3. Stadler, K.; Massignani, V.; Eickmann, M., et al., SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* **2003**, *1* (3), 209-218.
4. Holmes, K. V., SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* **2003**, *348* (20), 1948-1951.
5. Ksiazek, T. G.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S., et al., A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **2003**, *348* (20), 1953-1966.
6. Kuiken, T.; Fouchier, R. A.; Schutten, M., et al., Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **2003**, *362* (9380), 263-270.
7. Peiris, J. S.; Lai, S. T.; Poon, L. L., et al., Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **2003**, *361* (9366), 1319-1325.
8. Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S., et al., Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **2003**, *300* (5624), 1394-1399.
9. Cyranoski, D.; Abbott, A., Virus detectives seek source of SARS in China's wild animals. *Nature* **2003**, *423* (6939), 467.
10. Peiris, J. S., Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *J Clin Virol* **2003**, *28* (3), 245-247.
11. Wang, L. F.; Eaton, B. T., Bats, civets and the emergence of SARS. *Curr Top Microbiol Immunol* **2007**, *315*, 325-344.
12. Tyrrell, D. A.; Bynoe, M. L., Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *Br Med J* **1965**, *1* (5448), 1467-1470.
13. Mahy, B. W., Molecular biology of the coronaviruses. *Nature* **1983**, *305* (5934), 474-475.
14. Sturman, L. S.; Holmes, K. V., The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **1983**, *28*, 35-112.
15. Spaan, W.; Cavanagh, D.; Horzinek, M. C., Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol* **1988**, *69*, 2939-2952.
16. Hamre, D.; Procknow, J. J., A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* **1966**, *121* (1), 190-193.
17. Almeida, J. D.; Tyrrell, D. A., The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol* **1967**, *1* (2), 175-178.
18. McIntosh, K.; Dees, J. H.; Becker, W. B., et al., Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1967**, *57* (4), 933-940.
19. Mounir, S.; Talbot, P. J., Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* **1993**, *74* (Pt 9), 1981-1987.
20. Mounir, S.; Labonte, P.; Talbot, P. J., Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **1993**, *342*, 61-67.
21. Kunkel, F.; Herrler, G., Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* **1993**, *195* (1), 195-202.
22. van der Hoek, L.; Pyrc, K.; Jebbink, M. F., et al., Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **2004**, *10* (4), 368-373.
23. Abdul-Rasool, S.; Fielding, B. C., Understanding Human Coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol J* **2010**, *4*, 76-84.

LITERATUR

24. Woo, P. C.; Lau, S. K.; Chu, C. M., et al., Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **2005**, *79* (2), 884-895.
25. Woo, P. C.; Lau, S. K.; Huang, Y., et al., Phylogenetic and recombination analysis of coronavirus HKU1, a novel coronavirus from patients with pneumonia. *Arch Virol* **2005**, *150* (11), 2299-2311.
26. Kliger, Y.; Levanon, E. Y.; Gerber, D., From genome to antivirals: SARS as a test tube. *Drug Discov Today* **2005**, *10* (5), 345-352.
27. Li, W.; Moore, M. J.; Vasilieva, N., et al., Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **2003**, *426* (6965), 450-454.
28. Jeffers, S. A.; Tusell, S. M.; Gillim-Ross, L., et al., CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (44), 15748-15753.
29. Qinfen, Z.; Jinming, C.; Xiaojun, H., et al., The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *Journal of Medical Virology* **2004**, *73* (3), 332-337.
30. Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhwani, P., et al., Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **2003**, *300* (5626), 1763-1767.
31. Du, L.; He, Y.; Zhou, Y., et al., The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* **2009**, *7* (3), 226-236.
32. Tripet, B.; Howard, M. W.; Jobling, M., et al., Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J Biol Chem* **2004**, *279* (20), 20836-20849.
33. Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U., et al., *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg, Berlin, 2010; Vol. 3.
34. Dimitrov, D. S., The secret life of ACE2 as a receptor for the SARS virus. *Cell* **2003**, *115* (6), 652-653.
35. Hofmann, H.; Pyrc, K.; van der Hoek, L., et al., Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (22), 7988-7993.
36. Li, W.; Sui, J.; Huang, I. C., et al., The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology* **2007**, *367* (2), 367-374.
37. Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R., Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews* **2006**, *86* (3), 747-803.
38. Ehlers, M. R.; Riordan, J. F., Angiotensin-converting enzyme: zinc- and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis isozymes. *Biochemistry* **1991**, *30* (29), 7118-7126.
39. Danilczyk, U.; Eriksson, U.; Crackower, M. A., et al., A story of two ACEs. *J Mol Med* **2003**, *81* (4), 227-234.
40. Tipnis, S. R.; Hooper, N. M.; Hyde, R., et al., A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* **2000**, *275* (43), 33238-33243.
41. Towler, P.; Staker, B.; Prasad, S. G., et al., ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem* **2004**, *279* (17), 17996-18007.
42. Geijtenbeek, T. B.; Torensma, R.; van Vliet, S. J., et al., Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **2000**, *100* (5), 575-585.
43. Pohlmann, S.; Soilleux, E. J.; Baribaud, F., et al., DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (5), 2670-2675.
44. Bashirova, A. A.; Geijtenbeek, T. B.; van Duijnhoven, G. C., et al., A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* **2001**, *193* (6), 671-678.
45. Khoo, U.-S.; Chan, K.; Chan, V., et al., DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *Journal of Molecular Medicine* **2008**, *86* (8), 861-874.

LITERATUR

46. Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K., et al., Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **2001**, *294* (5549), 2163-2166.
47. Mitchell, D. A.; Fadden, A. J.; Drickamer, K., A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* **2001**, *276* (31), 28939-28945.
48. Feinberg, H.; Guo, Y.; Mitchell, D. A., et al., Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Biol Chem* **2005**, *280* (2), 1327-1335.
49. Feinberg, H.; Tso, C. K.; Taylor, M. E., et al., Segmented helical structure of the neck region of the glycan-binding receptor DC-SIGNR. *J Mol Biol* **2009**, *394* (4), 613-620.
50. Geijtenbeek, T. B.; van Duijnhoven, G. C.; van Vliet, S. J., et al., Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* **2002**, *277* (13), 11314-11320.
51. Curtis, B. M.; Scharnowske, S.; Watson, A. J., Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89* (17), 8356-8360.
52. Gattegno, L.; Ramdani, A.; Jouault, T., et al., Lectin-carbohydrate interactions and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *AIDS Res Hum Retroviruses* **1992**, *8* (1), 27-37.
53. Soilleux, E. J.; Morris, L. S.; Rushbrook, S., et al., Expression of human immunodeficiency virus (HIV)-binding lectin DC-SIGNR: Consequences for HIV infection and immunity. *Hum Pathol* **2002**, *33* (6), 652-659.
54. Pohlmann, S.; Zhang, J.; Baribaud, F., et al., Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* **2003**, *77* (7), 4070-4080.
55. Gardner, J. P.; Durso, R. J.; Arrigale, R. R., et al., L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (8), 4498-4503.
56. Martinez-Avila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M., et al., Gold manno-glyconanoparticles: multivalent systems to block HIV-1 gp120 binding to the lectin DC-SIGN. *Chemistry* **2009**, *15* (38), 9874-9888.
57. Xiao, X.; Chakraborti, S.; Dimitrov, A. S., et al., The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *312* (4), 1159-1164.
58. Babcock, G. J.; Eshaki, D. J.; Thomas, W. D. J., et al., Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol* **2004**, *78* (9), 4552-4560.
59. Wong, S. K.; Li, W.; Moore, M. J., et al., A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* **2004**, *279* (5), 3197-3201.
60. Li, F.; Li, W.; Farzan, M., et al., Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **2005**, *309* (5742), 1864-1868.
61. Han, D. P.; Penn-Nicholson, A.; Cho, M. W., Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor. *Virology* **2006**, *350* (1), 15-25.
62. Yi, C. E.; Ba, L.; Zhang, L., et al., Single amino acid substitutions in the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein determine viral entry and immunogenicity of a major neutralizing domain. *J Virol* **2005**, *79* (18), 11638-11646.
63. He, Y.; Li, J.; Jiang, S., A single amino acid substitution (R441A) in the receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein disrupts the antigenic structure and binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *344* (1), 106-113.
64. Axmann, M. Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Wirkstoffdesign: Ligandbindung an membranständige Proteine in lebenden Zellen und die Identifizierung einer Leitstruktur als entry-Inhibitor der SARS-CoV Infektion, Dissertation. Universität Hamburg, 2007.
65. Struck, A.-W. Synthese und Charakterisierung von Peptidanaloga als Inhibitoren der SARS-Infektion, Diplomarbeit. Universität Hamburg, 2007.

LITERATUR

66. Drosten, C.; Chiu, L. L.; Panning, M., et al., Evaluation of advanced reverse transcription-PCR assays and an alternative PCR target region for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Clin Microbiol* **2004**, *42* (5), 2043-2047.
67. Hu, H.; Li, L.; Kao, R. Y., et al., Screening and identification of linear B-cell epitopes and entry-blocking peptide of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus using synthetic overlapping peptide library. *J Comb Chem* **2005**, *7* (5), 648-656.
68. Guo, Y.; Tisoncik, J.; McReynolds, S., et al., Identification of a new region of SARS-CoV S protein critical for viral entry. *J Mol Biol* **2009**, *394* (4), 600-605.
69. Ho, T. Y.; Wu, S. L.; Chen, J. C., et al., Design and biological activities of novel inhibitory peptides for SARS-CoV spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res* **2006**, *69* (2), 70-76.
70. Zheng, B. J.; Guan, Y.; Hez, M. L., et al., Synthetic peptides outside the spike protein heptad repeat regions as potent inhibitors of SARS-associated coronavirus. *Antivir Ther* **2005**, *10* (3), 393-403.
71. Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R., et al., Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *J Virol* **2005**, *79* (11), 7195-7206.
72. Sainz, B. J.; Mossel, E. C.; Gallaher, W. R., et al., Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) infectivity by peptides analogous to the viral spike protein. *Virus Res* **2006**, *120* (1-2), 146-155.
73. Yuan, K.; Yi, L.; Chen, J., et al., Suppression of SARS-CoV entry by peptides corresponding to heptad regions on spike glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *319* (3), 746-752.
74. Marzi, A.; Gramberg, T.; Simmons, G., et al., DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* **2004**, *78* (21), 12090-12095.
75. Yang, Z. Y.; Huang, Y.; Ganesh, L., et al., pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J Virol* **2004**, *78* (11), 5642-5650.
76. Chan, V. S.; Chan, K. Y.; Chen, Y., et al., Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. *Nat Genet* **2006**, *38* (1), 38-46.
77. Guo, Y.; Feinberg, H.; Conroy, E., et al., Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, *11* (7), 591-598.
78. Han, D. P.; Lohani, M.; Cho, M. W., Specific asparagine-linked glycosylation sites are critical for DC-SIGN- and L-SIGN-mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol* **2007**, *81* (21), 12029-12039.
79. Feinberg, H.; Castelli, R.; Drickamer, K., et al., Multiple modes of binding enhance the affinity of DC-SIGN for high mannose N-linked glycans found on viral glycoproteins. *J Biol Chem* **2007**, *282* (6), 4202-4209.
80. Kunz, R., *Molecular Modelling für Anwender*, Teubner Verlag Stuttgart, 2. Auflage. **1997**, (27), 52.
81. Sharma, A.; Gupta, H., *Molecular modeling. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **2009**, *1* (1), 16-27.
82. Gallop, M. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J., et al., Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37* (9), 1233-1251.
83. Whittaker, R. G.; Bryant, K. J.; Hamilton, E. A., et al., Enzymatic Peptide Synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1992**, *672* (1), 387-395.
84. Merrifield, R. B., Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* **1962**, *21*, 412-412.
85. Fields, G. B.; Noble, R. L., Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35* (3), 161-214.

LITERATUR

86. Reid, G. E.; Simpson, R. J., Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids. *Anal Biochem* **1992**, *200*, 301-309.
87. Carpino, L. A., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 4397-4398.
88. Carpino, L. A.; Elfaham, A.; Albericio, F., Racemization Studies during Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (15), 2279-2282.
89. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A., et al., The uronium/guanidinium Peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41* (3), 441-445.
90. Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37* (22), 3404-3405.
91. Wellings, D. A.; Atherton, E., Standard Fmoc protocols. *Solid-Phase Peptide Synthesis* **1997**, 289, 44-67.
92. Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L., et al., Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic-Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30* (21), 2739-2742.
93. Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T., Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (18), 4781-4784.
94. Matsushita, T.; Hinou, H.; Kuroguchi, M., et al., Rapid microwave-assisted solid-phase glycopeptide synthesis. *Organic Letters* **2005**, *7* (5), 877-880.
95. Ferguson, J. D., Focused™ microwave instrumentation from CEM corporation. *Molecular Diversity* **2003**, *7* (2), 281-286.
96. Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G., Glycoprotein Synthesis: An Update. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (1), 131-163.
97. Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R., Synthetic glycopeptides and glycoproteins as tools for biology. *Chemical Society Reviews* **2005**, *34* (1), 58-68.
98. Bodanszky, M.; Kwei, J. Z., Side Reactions in Peptide-Synthesis .7. Sequence Dependence in Formation of Aminosuccinyl Derivatives from Beta-Benzyl-Aspartyl Peptides. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1978**, *12* (2), 69-74.
99. Likhoshesterov, L. M.; Novikova, O. S.; Derevitskaja, V. A., et al., A New Simple Synthesis of Amino Sugar Beta-D-Glycosylamines. *Carbohydrate Research* **1986**, *146* (1), 1-5.
100. Likhoshesterov, L. M.; Piskarev, V. E.; Derevitskaia, V. A., et al., [Synthesis of N-glycoproteins with a native type of carbohydrate-peptide bond]. *Bioorg Khim* **1990**, *16* (1), 124-126.
101. Jonsson, U.; Fagerstam, L.; Ivarsson, B., et al., Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **1991**, *11* (5), 620-627.
102. Turbadar, T., Complete absorption of light by thin metal films. *Proc Phy Soc* **1959**, *73*, 40-44.
103. Ritchie, R. H., Photon excitation of surface plasmons. *Surface Science* **1965**, *3* (5), 497-499.
104. Marston, P. L., Scattering of acoustic evanescent waves by circular cylinders: Partial wave series solution. *Acoustical Society of America Journal* **2002**, *111* (5), 2378-2378.
105. Biacore, *Biacore Sensor Surface Handbook*. Biacore AB: 2003; Vol. Version AA.
106. Biacore, *Biacore Concentration Analysis Handbook*. Biacore AB: 2001; Vol. Version AA.
107. Homola, J.; Löfås, S.; McWhirter, A., The Art of Immobilization for SPR Sensors. In *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Wolfbeis, O. S., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2006; Vol. 4, pp 117-151.
108. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Edit* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
109. Mayer, M.; 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* **2001**, *123* (25), 6108-6117.

LITERATUR

110. Meyer, B.; Peters, T., NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Edit* **2003**, *42* (8), 864-890.
111. Zheng, G.; Price, W. S., Solvent signal suppression in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **56** (3), 267-288.
112. Hwang, T. L.; Shaka, A. J., Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1995**, *112* (2), 275-279.
113. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **1992**, *2* (6), 661-665.
114. Liu, M. L.; Mao, X. A.; Ye, C. H., et al., Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *132* (1), 125-129.
115. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65* (1-2), 55-63.
116. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680-681.
117. Kang, D., Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc* **2002**, *23* (11), 1511-1512.
118. Rabilloud, T.; Carpentier, G.; Tarroux, P., Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **1988**, *9* (6), 288-291.
119. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76* (9), 4350-4354.
120. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**, *150* (1), 76-85.
121. Sui, J.; Li, W.; Murakami, A., et al., Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (8), 2536-2541.
122. Boguszewski, P., StratoSpheres™ SPE for Efficient, Flow Through Removal of Formic Acid. *Varian Application Note* **2007**, *SI-01043*, 1-2.
123. Pawlizki, K. H.; Kelly, G. J.; Latzko, E., Inhibition of dehydrogenases of sulfonated polystyrene, a possible contaminant of cation-exchange resins. *Anal Biochem* **1976**, *73* (2), 434-438.
124. Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T., Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1989**, *96* (3), 736-749.
125. Hull, R. N.; Cherry, W. R.; Johnson, I. S., The adaption and maintenance of mammalian cells to continuous growth in tissue culture. *Anat. Rec.* **1956**, *124* (2), 483-484.
126. Tesh, R. B., Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu Rev Med* **1982**, *33*, 31-40.
127. Wang, K. S.; Kuhn, R. J.; Strauss, E. G., et al., High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol* **1992**, *66* (8), 4992-5001.
128. Lozach, P. Y.; Lortat-Jacob, H.; de Lacroix de Lavalette, A., et al., DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* **2003**, *278* (22), 20358-20366.
129. Tabarani, G.; Reina, J. J.; Ebel, C., et al., Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett* **2006**, *580* (10), 2402-2408.
130. Reina, J. J.; Maldonado, O. S.; Tabarani, G., et al., Mannose glycoconjugates functionalized at positions 1 and 6. Binding analysis to DC-SIGN using biosensors. *Bioconjug Chem* **2007**, *18* (3), 963-969.
131. Timpano, G.; Tabarani, G.; Anderluh, M., et al., Synthesis of novel DC-SIGN ligands with an alpha-fucosylamide anchor. *Chembiochem* **2008**, *9* (12), 1921-1930.

LITERATUR

132. Mesch, S.; Moser, D.; Strasser, D. S., et al., Low Molecular Weight Antagonists of the Myelin-Associated Glycoprotein: Synthesis, Docking, and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (4), 1597-1615.
133. Angulo, J.; Diaz, I.; Reina, J. J., et al., Saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy characterization of dual binding mode of a mannose disaccharide to DC-SIGN. *Chembiochem* **2008**, *9* (14), 2225-2227.
134. Reina, J. J.; Sattin, S.; Invernizzi, D., et al., 1,2-Mannobioside Mimic: Synthesis, DC-SIGN Interaction by NMR and Docking, and Antiviral Activity. *ChemMedChem* **2007**, *2* (7), 1030-1036.
135. Reina, J. J.; Diaz, I.; Nieto, P. M., et al., Docking, synthesis, and NMR studies of mannosyl trisaccharide ligands for DC-SIGN lectin. *Org Biomol Chem* **2008**, *6* (15), 2743-2754.
136. Mari, S.; Serrano-Gómez, D.; Cañada, F. J., et al., 1D Saturation Transfer Difference NMR Experiments on Living Cells: The DC-SIGN/Oligomannose Interaction. *Angewandte Chemie* **2005**, *117* (2), 300-302.
137. Serrano-Gomez, D.; Martinez-Nunez, R. T.; Sierra-Filardi, E., et al., AM3 Modulates Dendritic Cell Pathogen Recognition Capabilities by Targeting DC-SIGN. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (7), 2313-2323.
138. Balaram, P.; Bothnerb.Aa; Dadok, J., Negative Nuclear Overhauser Effects as Probes of Macromolecular Structure. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (11), 4015-4017.
139. Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Breslow, E., Localization of tyrosine at the binding site of neurophysin II by negative nuclear Overhauser effects. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (11), 4017-4018.
140. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* **1997**, *62* (21), 7512-7515.
141. Hackl, T. Untersuchung von hydrophoben Protein-Ligand-Wechselwirkungen in wässriger Lösung mittels Saturation Transfer Difference NMR am Beispiel der Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthase, Dissertation. Universität Hamburg, 2009.
142. Jain, E.; Bairoch, A.; Duvaud, S., et al., Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 136-145.
143. Consortium, T. U., Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Research* **2011**, *39* (suppl 1), 214-219.
144. Smith, D. B.; Rubira, M. R.; Simpson, R. J., et al., Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli*: *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Mol Biochem Parasitol* **1988**, *27* (2-3), 249-256.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Reihe von Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben. Mein Dank gilt:

- meinen Eltern Gudrun und Klaus und meiner Schwester Rhea für den Glauben an mich und die struck'sche Art.
- Thomas für die letzten tollen Jahre, seine Unterstützung in allen Bereichen, das Ertragen meiner verrückten Anwandlungen und einfach für alles. Ohne Dich hätte ich die Promotion sicher längst nicht so gut gemeistert.
- meinen Jungs aus der 17b - Henning, Martin und Robin - für ihre Freundschaft und eine entspannte und lustige Zeit. Wir waren zwar nie das ordentlichste Labor, aber auf jeden Fall immer auf einer Wellenlänge. Henning danke ich für seine direkte Art und ein bisschen Fuhlsbüttel im AK.
- meinen Mädels aus dem Streber-Computerraum - Meike und Patrizia. Ohne Euch hätte ich die letzten paar Monate längst nicht so gut überstanden. Meike danke ich dafür, dass sie alle meine Launen ertragen hat, für jede Hilfe am NMR und dass ich mich immer 100%-ig auf sie verlassen konnte. Patrizia danke ich für ihren Optimismus und dafür dass ich bei der Disputation eine gute Figur machen werde.
- Katrin, Bea und Miriam für ihre Unterstützung und aufmunternden Worte innerhalb der Uni und den Spaß außerhalb der Uni. Katrin danke ich für ihre „spitzen“ Ideen und das Warten auf Wind. Bea danke ich für Konzerte und ihre Lebenseinstellung. Miriam danke ich für ihr unerschöpfliches Wissen und natürlich auch für jede Hilfe am NMR.
- Moritz, Dirk und Dennis für ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft. Moritz danke ich für seine verrückte und trotzdem extrem kompetente Art. Dirk danke ich für die richtige Balance zwischen Spaß und Ernst. Ohne Dennis wäre ich wohl nie im AKBM gelandet.
- Ilona für ihre mitfühlende Art.
- Bea, Meike, Miriam und Thomas für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Kathrin, Alex, Karsten, Wei-Nien, Felix, Nadja, Katha, Karolina, Martin, Kolja und allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitglieder des AKBM für die angenehme Arbeitsatmosphäre und eine wirklich schöne Zeit.

DANKSAGUNG

- allen meinen OC-F-Praktikanten. Insbesondere danke ich Christoph Hahn für die Durchführung des Alaninscans.
- Sebi aus dem AK Thiem für alle Tipps in jeder chemischen Sachlage.
- Marco Axmann für YKYRYL.
- Christian Schmidt und Sören Ziehe für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung während meiner Admin-Zeit.
- Prof. Dr. Christian Drost und Dr. Susanne Pfefferle für die Durchführung der Inhibitionsassay am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.
- Prof. Kathryn Holmes von der University of Colorado für die Bereitstellung der CRD des L-SIGN.
- den gesamten AK Bredehorst für ihre Hilfe bei den proteinchemischen Arbeiten. Mein Dank gilt insbesondere Melanie Plum, Julia Hecker und Thorsten Mix.
- meinen Freundinnen aus der Lebensmittelchemie Luise, Jeannette und Ria für ihre Freundschaft. Ihr habt es echt immer geschafft mich aufzubauen.
- meiner Lieblings-WG in der Schäferkampsallee für tolle Abende und die Krankenbetreuung.
- Andreas für die regelmäßigen Besuche aus Dänemark.
- meiner Freundin Mieke für das Durchhalte-Paket und nun fast 30 Jahre Freundschaft.

Lebenslauf

Name: Anna-Winona Struck

Geburtsdatum: 02.05.1981

Geburtsort: Henstedt-Ulzburg

AUSBILDUNG

04/2001 - 05/2007 Chemiestudium (Diplom) an der Universität Hamburg
Zwischenprüfung: Vordiplom (06.2003), Gesamtnote: Gut
Abschluss: Diplom, Gesamtnote: Sehr gut

08/1997 – 01/2001 Ausbildung als chemisch-technische Assistentin im doppelqualifizierenden Bildungsgang des Gymnasiums Altona und der Berufsfachschule für Chemisch-technische Assistenz

08/1991 - 06/2000 Gymnasium im Alstertal (Hamburg)
Abschluss: Abitur; Note: 1.8

WISSENSCHAFTLICHER UND BERUFLICHER WERDEGANG

10/2007 - 03/2011 Lehrbeauftragte für das Grundpraktikum in Organischer Chemie für Chemie- und Lehramtsstudierende, Universität Hamburg

07/2007 – 03/2011 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin (Universität Hamburg)

Seit 07/2007 Beginn der Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer, Universität Hamburg
Thema: Bindungsstudien mit humanen Zellrezeptoren für das SARS-Coronavirus

09/2006-05/2007 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer, Universität Hamburg

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Titel: Synthese und Charakterisierung von Peptid-analoga als Inhibitoren der SARS-Infektion , Abschluss: Diplom; Gesamtnote: Sehr gut

AUSLANDSPRAKTIKUM

01/2005-09/2005 Forschungsaufenthalt an der Universität Oslo, Norwegen (Erasmus-Sokrates-Programm)

Wissenschaftliche Publikationen

WISSENSCHAFTLICHE VORTRÄGE

Anna-Winona Struck, Erster Hamburger Biacore Anwendertag, Hamburg (12/2009)

Entwicklung eines entry-Inhibitors gegen den SARS-Coronavirus

Anna-Winona Struck, 6. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie, Hamburg (05/2009)

Entwicklung eines entry-Inhibitors gegen den SARS-Coronavirus

POSTERPRÄSENTATIONEN

Anna-Winona Struck, Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Christian Drosten, Bernd Meyer, Euromar 2010 - European Magnetic Resonance Conference, Florence, Italy (07/2010)

Characterization of the Binding Mode of SARS Coronavirus spike protein by Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy

Anna-Winona Struck, Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Christian Drosten, Bernd Meyer, 51th ENC - Experimental Nuclear Conference, Daytona Beach, Florida, USA (04/2010)

Identification of a Hexapeptide with Strong Antiviral Activity Against the SARS Corona Virus and Characterization of its Binding Mode by Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy

Anna-Winona Struck, Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Christian Drosten, Bernd Meyer, Fifth Peptide Engineering Meeting, Barcelona, Spain (10/2009)

Identification of a Hexapeptide with Strong Antiviral Activity Against the SARS Corona Virus

Anna-Winona Struck, Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Christian Drosten, Bernd Meyer,
3rd ECCLS - European Congress on Chemistry for Life Sciences, Frankfurt, Germany (09/2009)

Identification of a Hexapeptide with Strong Antiviral Activity Against the SARS Corona Virus

Anna-Winona Struck, Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Christian Drosten, Bernd Meyer,
Euromar 2009 - European Magnetic Resonance Conference, Göteborg, Sweden (07/2009)

*Identification of a Hexapeptide with Strong Antiviral Activity Against the SARS Corona Virus and
Characterization of its Binding Mode by Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy*

Anna-Winona Struck, Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Christian Drosten, Bernd Meyer,
30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finland (09/2008)

A Hexapeptide that blocks SARS-Coronavirus

Susanne Pfefferle, Marco Axmann, Anna-Winona Struck, Christian Drosten, Bernd Meyer,
3rd European Congress of Virology, Nürnberg, Germany (09/2007)

A Hexapeptide that blocks SARS-Coronavirus

Erklärung

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

Hamburg, den 23.05.2011

Anna-Winona Struck