

Identifizierung und Charakterisierung neuer E-Selektin Antagonisten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Oliver Schuster
aus Hamburg



Universität Hamburg

August 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1996 bis August 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. P. Margaretha, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die interessante Themenstellung, ständige Diskussionsbereitschaft und stetes Interesse am Verlauf dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Die adaptive Immunantwort der T-Zellen	4
2.2 Nicht adaptive Abwehrreaktionen gegen Infektionen	4
2.3 Interzelluläre Adhäsionsmoleküle	5
2.4 Die Wanderung der Leukocyten ins Endothel	5
2.5 Selektin-Antagonisten	6
2.6 Kombinatorische Kohlenhydrat-Bibliotheken	10
2.7 Die E-Selektin Bindungsstelle	11
2.8 Die bioaktive Konformation des sLe ^x	13
3 METHODEN	15
3.1 Experimentelle Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	16
3.1.1 NMR-Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	16
3.1.2 Der <i>Nuclear Overhauser Effect</i> (NOE)	16
3.1.3 Der <i>transferred Nuclear Overhauser Effect</i> (trNOE)	17
3.1.4 STD NMR-Spektroskopie	18
3.1.5 Relaxationszeit-Messungen	19
3.2 Das <i>molecular modeling</i>	19
3.2.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	20
3.2.2 <i>De novo</i> -Design	21
3.2.3 <i>Docking</i>	22
3.2.4 Konformationsräume	22
3.2.5 Energiefunktionen	23
3.2.6 Clusteranalyse	23
4 PROBLEMSTELLUNG	25
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	27
5.1 Die IgG/E-Selektin Chimäre	28
5.2 Die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek	28
5.3 NMR-Experimente der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek	29
5.3.1 ¹ H-NMR-Experimente	29
5.3.2 ¹ H-Resonanzsignale der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek	30
5.3.3 Relaxationszeiten	31
5.3.4 1D STD NMR-Experimente	34
5.3.5 2D STD NMR-Experimente	38
5.3.6 Selektive ¹ H-Experimente	41
5.3.7 trNOESY-Experimente	43

5.4 NMR-Experimente der 3- und 2'-Fucosyl-Lactose	46
5.4.1 1D STD NMR-Experimente	46
5.4.2 2D STD TOCSY-Experiment	50
5.5 Theoretische Untersuchungen von E-Selektin-Ligand-Wechselwirkungen	53
5.5.1 E-Selektin und sLe ^x – Ein Bindungsmodell	53
5.5.2 <i>De novo</i> -Design von Liganden mit LeapFrog	56
5.5.3 Ein Vergleich: Bindungsmodell sLe ^x – <i>De novo</i> -Design von sulfatierten Trisacchariden mit LeapFrog	65
5.6 MMC-Simulationen	66
5.6.1 MMC-Simulation von Lactose	67
5.6.2 MMC-Simulation der 1-2'-Fucosyl-4'-O-sulfo-lactose	68
5.6.3 MMC-Simulation der 1-6'-Fucosyl-2-O-sulfo-lactose	70
5.6.4 MMC-Simulation der 1-3-Fucosyl-6'-O-sulfo-lactose	72
5.6.5 MMC-Simulation der 1-6-Fucosyl-3-O-sulfo-lactose	75
5.7 Die LeapFrog-Strukturen im Vergleich mit den NMR-spektroskopischen Ergebnissen	77
6 ZUSAMMENFASSUNG	80
6.1 Summary	84
7 EXPERIMENTELLER TEIL	86
7.1 Probenpräparation	87
7.1.1 E-Selektin	87
7.1.2 Die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek	87
7.1.3 Die Mischung aus der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek und dem E-Selektin	87
7.1.4 Die Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose, 3-Fucosyl-lactose und dem E-Selektin	88
7.2 NMR-Experimente	88
7.2.1 ¹ H-NMR-Experimente	88
7.2.2 2D- <i>tr</i> NOESY	89
7.2.3 2D STD NMR-Experimente	89
7.3 Theoretische Verfahren	89
7.3.1 <i>Docking</i> Experimente	90
7.3.1.1 <i>De novo</i> -Design mit LeapFrog	90
7.3.1.2 <i>Docking</i> mit FlexiDock	92
7.3.2 MMC-Simulation	93
7.3.3 Clusteranalyse	93
8 PULSPROGRAMME	95
8.1 1D STD NMR-Experiment	96
8.2 T₂-Relaxationsmessung	96
8.3 <i>tr</i>NOESY-Experiment	97
8.4 2D STD TOCSY-Experiment	97
8.5 2D STD TOCSY-Experiment (<i>epitope mapping</i>)	98
9 LITERATUR	100

1. Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	1-, 2-, 3-dimensional
AS	Aminosäure(n)
APC	<i>antigen presenting cells</i>
Bn	Benzyl
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CoMFA	<i>comparative molecular field analysis</i>
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CLAG	Clusteranalyse von Glycoproteinen
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
DG	<i>distance geometry</i>
DMF	Dimethylformamid
DQF	Doppelquantenfilter
ECEPP	<i>empirical conformational energy program for peptides</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GEGOP	<i>geometry of glycoproteins</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HepG2	<i>human liver tumor cell line</i>
HL60	<i>human liver leukemia cells</i>
HSEA	<i>hard sphere exo-anomeric</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein cells</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IC3b	<i>complement component</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN	Interferon
lec	<i>lectine</i>
LFA	<i>leukocyte function associated antigen</i>
LS180	<i>colon carcinoma cells</i>
LT	Leukotrien
MAdCAM	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight</i>
MBP-A	<i>rat mannose binding protein</i>
MD	Molekül-Dynamik
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMC	<i>metropolis monte carlo</i>
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
MS	<i>mass spectrometry</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
Py	Pyridin
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationship</i>

RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RIA	<i>radio immuno assay</i>
sLe ^x	Sialyl-Lewis ^x
sLe ^a	Sialyl-Lewis ^a
STD	<i>saturation transfer difference</i>
T ₁ , T ₂	longitudinale-, transversale Relaxationszeit
TNF	Tumornekrosefaktor
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
trNOE	<i>transferred nuclear Overhauser effect</i>
UV / VIS	ultraviolett / sichtbar
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA	<i>very late antigen</i>

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

Einleitung

2

2. Einleitung

2.1 Die adaptive Immunantwort der T-Zellen

Die adaptive Immunantwort der T-Zellen ist, neben der humoralen Immunität, eines der wichtigsten Bestandteile zur Abwehr von Krankheitserregern. Nach Reifung im Thymus und Eintritt in das Blut gelangen die nativen T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe. Nach einer weiteren Reifungsperiode treten sie erneut in die Blutbahn ein. Nun beginnt ihre eigentliche Aufgabe, das Aufspüren und Bekämpfen von antigenpräsentierenden Zellen. Der initiale Schritt zur Aktivierung erfolgt bei ihrem ersten Kontakt mit einem spezifischen Antigen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC). Das Antigen wird hierbei zusammen mit MHC-Molekülen präsentiert. Zusätzlich werden von den APCs noch costimulierende Faktoren exprimiert, in der Regel B7.1 und B7.2, die CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen binden. Dies ist notwendig, um eine adäquate Immunantwort auszulösen. Zu den APCs gehören die dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Diese Aktivierung wird oft als *priming* bezeichnet und erfolgt in den peripheren lymphatischen Organen, also nicht am lokalen Infektionsherd. Zu diesen Organen werden die Krankheitserreger oder seine Abbauprodukte in die Lymphe transportiert, die kontinuierlich durch Filtration extrazellulärer Flüssigkeit aus dem Blut produziert wird. Pathogene, die oberflächliche Stellen befallen, werden in den Lymphknoten unterhalb der Infektionsstelle festgehalten. Im Blut befindliche Pathogene werden in der Milz aufgefangen und solche, die Schleimhäute infizieren, werden in den Payerschen Plaques oder den Mandeln gesammelt. Nach spezifischem Kontakt mit dem Antigen werden nun die T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Diese Vorgänge sind von Cytokinen wie dem T-Zell-Wachstumsfaktor (IL-2) und

dessen Bindung an einem Rezeptor auf der aktivierte T-Zelle abhängig.

Ist dieser Prozeß abgeschlossen, verlassen die Effektorzellen die lymphatischen Organe und gelangen über den Blutkreislauf zu den Infektionsstellen. Cytotoxische CD9-T-Zellen töten Zielzellen, deren Cytosol mit Pathogenen infiziert sind. CD4-T_H1-Zellen regen Makrophagen durch ein makrophagenaktivierendes Cytokin (IFN- γ) dazu an intrazelluläre Parasiten abzutöten. CD4-T_H2-Zellen sind für die Aktivierung von B-Zellen nötig, damit entsprechende Antikörper produziert werden.

2.2 Nicht adaptive Abwehrreaktionen gegen Infektionen

Die ersten nichtadaptiven Immunreaktionen sind aus zweierlei Gründen sehr wichtig. Zum einen können sie den Krankheitserreger töten, zum anderen kann der Infektionsherd solange eingedämmt werden, bis die adaptive Immunantwort eingeleitet ist. Diese erste Reaktion erfolgt sehr schnell, da keine klonale Expansion der naiven T-Zellen notwendig ist.

Cytokine, die Phagozyten als Reaktion auf die Infektion sezernieren, umfassen mehrere verschiedenartige Moleküle wie Interleukin 1 (IL-1), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Die Wirkungen dieser Substanzen haben sowohl systemischen als auch lokalen Charakter. Weitere Mediatoren, die aufgrund einer Infektion ausgeschüttet werden, sind die Prostaglandine, Sauerstoffradikale, Peroxide, Stickstoffoxid (NO), Leukotriene und der plättchenaktivierende Faktor (PAF). Das Komplementsystem, das ebenfalls sehr schnell mit seinen Bestandteilen reagiert und Mastzellen aktiviert, die ihrerseits ihren Inhalt der Granula freisetzen (Histamin), ergeben eine Gesamtreaktion, die auch als **Entzündungsreaktion** bezeichnet wird.

Eine Entzündung zeichnet sich durch Schmerzen, Rötung, erhöhte Temperatur und eine lokale Schwellung aus. Als Folge wird der Gefäßdurchmesser vergrößert, das zu einem verstärkten und langsameren

lokalen Blutfluß führt. Die Verlangsamung bewirkt, daß die Leukozyten, die sich normalerweise in der Mitte der Blutgefäße befinden, sich auch am Rand aufhalten können und so mit dem Gefäßendothel wechselwirken. Durch die Ausschüttung von Mediatoren erfolgt eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen. Die Permeabilität der Gefäßwände wird ebenfalls erhöht und der verstärkte Flüssigkeitseintritt in das Gewebe führt zu einer Schwellung¹.

2.3 Interzelluläre Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle spielen bei der Immunantwort eine wesentliche Rolle. Durch eine Vielzahl von schwachen aber doch spezifischen Wechselwirkungen erfolgt eine gezielte Interaktion. Mindestens vier Superfamilien von **Adhäsionsmolekülen**² sind bei der Leukocytenwanderung, bei ihrer Zielortbestimmung (*homing*) und bei Zell-Zell-Interaktionen bekannt. Sie werden auf der Oberfläche der Effektorzellen und auf einer Vielzahl von Gewebetypen exprimiert. Zu ihnen gehören die Selektine, Integreine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, die Cadherine und einige dem Mucin ähnliche Moleküle.

Die Selektine (CD62) sind besonders wichtig, damit die Leukozyten ihren Zielort erreichen. Sie werden entweder auf den Leukozyten selbst (L-Selektin, CD62L) oder auf dem vaskulären Endothel (P-Selektin, CD62P, und E-Selektin, CD62E) exprimiert. Sie gehören zu den zuckerbindenden Zelladhäsionsmolekülen und besitzen einen ähnlichen modularen Aufbau. Am N-Terminus befindet sich eine C-Typ-Lektin-Domäne, gefolgt von einer EGF-Typ-Domäne. Abhängig vom Selektin-Typ folgt dann eine Anzahl von repetitiven Sequenzen analog zum *complement regulatory protein* (zwei im L-, sechs im E- und neun im P-Selektin)³. Die natürlichen Liganden für die Selektine sind noch nicht komplett charakterisiert. Bekannt ist aber, daß es sich um sulfatierte und sialisierte Oligosaccharide, gebunden an Mucin-ähnlichen Glycoproteinen handelt.

Eine Reihe von ihnen wurden bereits identifiziert (Tab. 1, S. 7).

2.4 Die Wanderung der Leukozyten ins Endothel

Die Wanderung der Leukozyten aus den Blutgefäßen ins Endothel wird über lokale Entzündungsvermittler (Mediatoren) gesteuert. Dieser Vorgang wird auch **Extravasation** genannt und verläuft wahrscheinlich in vier Schritten ab^{4,1}.

Der erste Schritt wird durch die Selektine vermittelt. Nach der Ausschüttung von lokalen Mediatoren wie LTB4, C5a oder Histamin wird das in den Weibel-Palade-Körperchen genannten Granula enthaltene P-Selektin an der Oberfläche der Endothelzellen sichtbar. Dieser Vorgang verläuft innerhalb von Minuten. Das E-Selektin erscheint erst einige Stunden nach dem Kontakt mit Liposylsacchariden oder TNF- α auf dem Endothel. Zusätzlich wechselwirkt L-Selektin, das auf der Oberfläche des Neutrophilen vorhanden ist, mit endothelialen Liganden.

Diese polyvalenten Wechselwirkungen^{5,6} mit den Epitopen auf der Oberfläche der Monocyten und Neutrophilen führen zum sogenannten *rolling* entlang der Endothelzellen. Dabei verringert sich die Fließgeschwindigkeit⁷ auf 10-20 $\mu\text{m min}^{-1}$. Bei allen Selektinen findet man als bindendes Epitop einen Grundkörper, der dem Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x α -D-NeuNAc-(2-3)- β -D-Gal-(1-4)[α -L-Fuc-(1-3)]- β -D-GlcNAc (Abbildung 1) Sialyl-Lewis^A α -D-NeuNAc-(2-3)- β -D-Gal-(1-3)[α -L-Fuc-(1-4)]- β -D-GlcNAc und anderen strukturähnlichen Lewis-Blutgruppen Oligosacchariden entspricht^{8,9,10}.

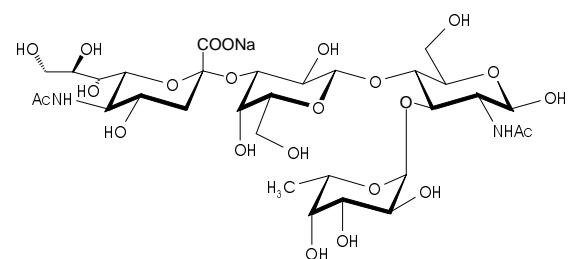


Abbildung 1: Sialyl-Lewis^x (sLe^x).

Im zweiten Schritt erfolgt die Wechselwirkung über Leukocytenintegreine (LFA-1, CR3) und Moleküle des Endothels (ICAM-1). Interleukine (IL-8) bewirken eine Konformationsänderung der Integreine, so daß dessen Adhäsionsstärke vergrößert wird. Die Leukocyten heften sich nun an die Zellwand und können die Blutgefäße verlassen (Abb. 2).

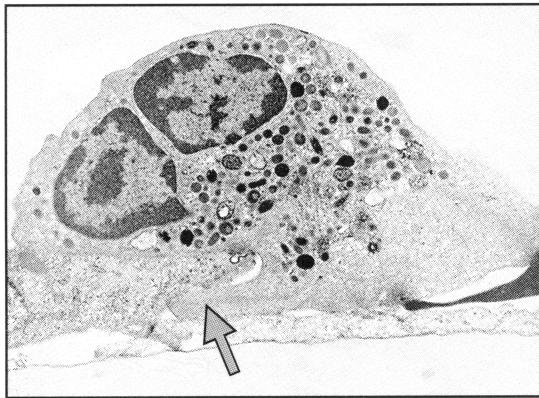


Abbildung 2: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt eine neutrophile Zelle, die zwischen zwei Endothelzellen hindurch wandert. Der Pfeil markiert das Pseudopodium.

Dieser dritte Schritt wird wiederum über Integreine vermittelt und zusätzlich über Immunglobulin-ähnliche Moleküle (PECAM,

CD31), die auf dem Leukocyt und zwischen den Endothelzellen exprimiert werden. Beim Durchstoßen der Basalmembran helfen proteolytische Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix zerstören. Die Passage durch die Gefäßwand wird auch als **Diapedese** bezeichnet.

Im vierten und letzten Schritt wandern die Leukocyten mit Hilfe von Chemokinen zum Infektionsherd.

2.5 Selektin-Antagonisten

Das *rolling* gilt als initialer Schritt bei der Einwanderung von Leukocyten in das Gewebe. Da bei einer Vielzahl von Erkrankungen die Schädigung des Gewebes durch die Entzündungsreaktion selbst hervorgerufen wird (Asthma, Allergische Rhinitis, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis), besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Kohlenhydrat-Mimetika, die diese Phase der Immunantwort blockieren^{11,12,13,14}. Auch bei Transplantat-Abstoßungsreaktionen spielt die Selektin-abhängige Adhäsion eine wichtige Rolle¹⁵.

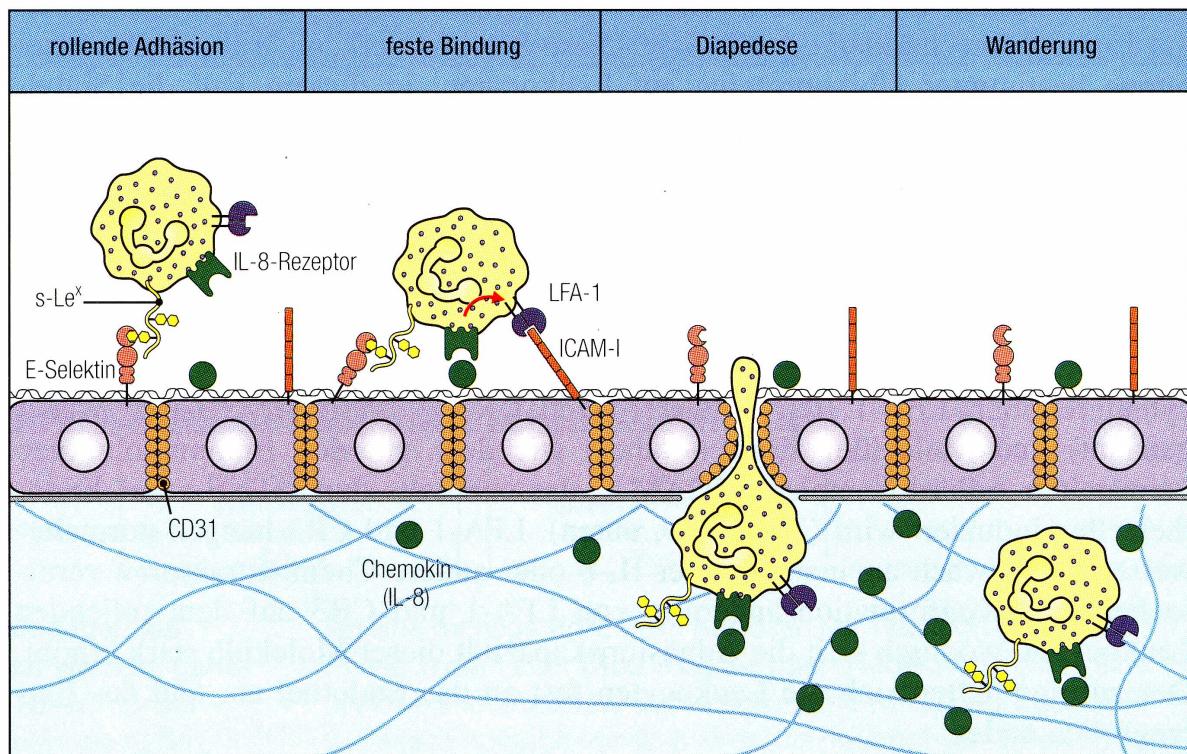


Abbildung 3: Die vier Schritte der Leukocyteneinwanderung (Extravasation).

	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Selektine binden Kohlenhydrate, Leukocyten-Endothel-Wechselwirkung	L-Selektin (MEL-14, CD62L)	naive und einige Gedächtnis-lymphocyten, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile	6'-Sulfo-Sialyl-Lewis ^x , GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1
	P-Selektin (PADGEM, CD62P)	aktiviertes Endothel und Thrombocyten	Sialyl-Lewis ^x , PSGL-1
	E-Selektin (ELAM-1, CD62E)	aktiviertes Endothel	Sialyl-Lewis ^x , ESL-1
mucinähnliche vaskuläre Adressine binden an L-Selektin, Leukocyten-Endothel-Wechselwirkung	CD34,	Endothel	L-Selektin
	GlyCAM-1	Venolen mit hohem Endothel	L-Selektin
	MAdCAM-1	Venolen in lymphatischen Schleimhautgewebe	L-Selektin
Integre binden an Zelladhäsionsmoleküle und an die extrazelluläre Matrix	$\alpha_x\beta_1$ (LFA-1, CD11a/CD18)	Monocyten, T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	ICAMs
	$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CR3, CD11b/CD18)	Neutrophile, Monocyten, Makrophagen	ICAMs, iC3b, Fibrinogen
	$\alpha_x\beta_2$ (CR4, p150, 95, CD11c/CD18)	dendritische Zellen, Makrophagen, Neutrophile	iC3b
	$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4, LPAM-1, CD49d/CD29)	Lymphocyten, Monocyten, Makrophagen	VCAM-1
	$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5, CD49d/CD29)	Monocyten, Makrophagen	Fibronectin
	$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1)	Lymphocyten	MAdCAM-1
	$\alpha_E\beta_7$	Lymphocyten im Epithel	E-Cadherin
	CD2 (LFA-2)	T-Zellen	LFA-3
Immunglobulin-Superfamilie verschiedene Funktionen bei der Zelladhäsion, bindet an Integrein	ICAM-1 (CD54)	aktivierte Gefäße, Lymphocyten, dendritische Zellen	LFA-1, Mac1
	ICAM-2 (CD102)	ruhende Gefäße, dendritische Zellen	LFA-1
	ICAM-3 CD50	Lymphocyten	LFA-1
	LFA-3 (CD58)	Lymphocyten, antigenpräsentierende Zellen	CD2
	VCAM-1 (CD106)	aktiviertes Endothel	VLA-4

Tabelle 1: Adhäsionsmoleküle bei Leukocytenwechselwirkung.

Ausgehend vom natürlichen Liganden des E-Selektins (sLe^x, sLe^a) wurden eine Vielzahl von Modifikationen vorgeschlagen^{16,17}. Man kann die Mimetika in mehreren Klassen einteilen. Als erste Klasse sind die Verbindungen anzusehen, die als Grundkörper sLe^x besitzen und in denen z.B. Hydroxyl-Funktionen gegen N-Acetylgruppen ausgetauscht sind¹¹. Eine andere Klasse enthält nur noch die L-Fucose oder D-Mannose und als „Rückgrat“ ein C-verknüpftes Monopeptid¹³ bzw. ein Di-

peptid^{18,19,20}. Zusätzlich wird ein verzweigter C₁₄-Alkylrest zur Verstärkung von hydrophoben Wechselwirkungen eingesetzt. Andere Inhibitoren ersetzen die negative Ladung der Sialinsäure durch Sulfat- oder Phosphatgruppen²¹ oder verwenden Sulfatid-Analoga²². Mit diesem Analogon, das als Grundkörper einen Galactosyl-Rest besitzt, wurden bereits pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt. Die Halbwertszeit bei einer intravenösen Injektion von 1 mg/kg (Ratte) lag bei sieben Stunden.

Eine dritte Klasse von Substanzen erreicht durch Multivalenz eine Erhöhung der Bindungsaffinität. Hierbei wurde, durch variable Peptid-spacer getrenntes di- und trivalentes sLe^x eingesetzt²³. Auch tetravalentes sLe^x mit einem Poly-Lactosamincore erhöht die Bindungsstärke^{24,25}. Besonders hohe Bindungskonstanten zeigten Liposomen, die auf ihrer Oberfläche sLe^x Moleküle tragen. Abhängig vom Durchmesser und der Belegung der Liposomen, ergab sich für die Bindungsaffinität ein Optimum (IC₅₀ = 74 nM, akt. HUVECs) bei 3 mol% sLe^x und einem Durchmesser von 97 nm ± 21²³. Als vierte Gruppe wurden reine Peptid-Mimetika untersucht²⁶. Es konnte gezeigt werden, daß die core-Struktur von Val41 bis Tyr49, flankiert von weiteren Aminosäuren der Lectin-Domäne, als Antagonist wirksam ist. In Tabelle 2 (S. 9) sind die jeweils besten Selektin-Mimetika mit ihren Bindungskonstanten aufgelistet.

Die Testsysteme reichen von ELISAs, RIAs bis FACScan Analysen, in denen das rekombinante Selektin, aktivierte Zellen (Blutplättchen, HUVEC-Zellen, oder monoklonale Antikörper (CSLEX1) immobilisiert wurden. Die Kompetition wurde entweder gegen sLe^x oder gegen Zellen, die als Oberflächenstrukturen den natürlichen Liganden tragen (HepG2-, HL60- und LS180-Zellen), durchgeführt. In anderen Bindungsstudien wurde ein modifizierter *Stamper-Woodruff-Assay*²⁷ eingesetzt. Ursprünglich wurde dieser Assay zur Charakterisierung des gewebsspezifischen *homings* von Lymphocyten in die Lymphknoten verwendet. Dieses Gewebe wird bei -15°C in dünne Sektionen geschnitten und anschließend fixiert. Es kann nun für beliebige Bindungsexperimente genutzt werden. Einen entscheidenden Vorteil bietet ein anderes Verfahren, das unter Fließbedingungen arbeitet. Mit Hilfe der Intravital-Mikroskopie kann die Fließgeschwindigkeit und Konzentration der Blutzellen, die am Adhäsionsprozeß beteiligt sind, bestimmt werden¹³.

Bisher erwies es sich als außerordentlich schwierig, E-Selektin Antagonisten mit einer

hohen Bindungskonstante zu finden. Nur wenige der bisher vorgeschlagenen Verbindungen wurden auch unter annähernd nativen Bedingungen getestet. Sehr kritisch sind die Bindungskonstanten zu betrachten. Abhängig vom Assay können die Daten um mehrere Größenordnungen variieren. Inhibitoren, die in einem statischen Assay eine nennenswerte Inhibition zeigen, können unter natürlichen Bedingungen, also in einem fließenden System, völlig inaktiv sein. Dies spiegelt nicht nur die Bedeutung der Bindungsstärke, sondern auch die Bedeutung der Kinetik wieder¹³.

Ein wesentlicher Punkt scheint die biologische Funktion bezüglich der Struktur der natürlichen Selektin-Liganden zu sein. Der initiale Adhäsionsprozeß der Leukozyten ist auf eine relativ schwache Wechselwirkung mit dem Endothel optimiert, um lediglich die Fließgeschwindigkeit der Immunzellen zu reduzieren. Die eigentliche Fixierung erfolgt über andere Adhäsionsmoleküle (Integrine). Interessanterweise zeigen sphärische Liposomen, die auf ihrer Oberfläche sLe^x Moleküle tragen, eine besonders hohe Inhibitionsrate. Die dichte Belegung ermöglicht multivalente Wechselwirkungen und vervielfacht die schwache monovalente Bindung.

Das rationale Design von Sialyl-Lewis^x-Mimetika hängt entscheidend von der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur ihrer Komplexe mit E-Selektin ab. Bisher wurde noch keine Röntgenstruktur eines E-Selektin-Ligand-Komplexes veröffentlicht. Die Struktur vom E-Selektin im Kristall und die aus NMR-Daten berechneten Strukturen vom gebundenen Sialyl-Lewis^x sind aber verfügbar. Mit diesen Daten ist es möglich, ein Modell des Komplexes zu erstellen, das als Grundlage für die Entwicklung von wirksamen Inhibitoren dienen kann.

	Struktur	Zielstruktur	Bindungskonstante IC₅₀	Bindungsassay
Klasse I	1-Deoxy sLe ^x sLe ^{x¹¹}	P-Selektin P-Selektin	0.044 mM >1.0 mM	ELISA, P-Selektin-IgG Fusionsprotein, sLe ^x -Pentaceramid.
Klasse II	2-(Tetradecylhexadecyl)-3,6-Di-sulfo- β -D-galacto-pyranosid Dinatriumsalz ²¹	P-Selektin	% Inhibition bei 0.3 mM 65 ± 3	FACScan, immobilisiertes Selektin-IgG Fusionsprotein, HL-60 Zellen.
	2-(Tetradecylhexadecyl)-3,6-Di-sulfo- β -D-galactopyranosid Dinatriumsalz	L-Selektin	94 ± 10	FACScan, immobilisiertes Selektin-IgG Fusionsprotein, HL-60 Zellen.
	2-(Tetradecylhexadecyl-O-(3,4-Bis-phospho- β -D-galacto-pyranosyl)-(1-4)- β -D-glycopyranosid Tetranatriumsalz	E-Selektin	46 ± 5	FACScan, immobilisiertes Selektin-IgG Fusionsprotein, HL-60 Zellen.
	N-(2-Tetradecylhexadecanoyl)-O-(α -L-fucopyranosyl)-L-seryl-D-glutaminsäure-1-methylamid ¹⁸ sLe ^x	P-Selektin L-Selektin E-Selektin P-Selektin L-Selektin E-Selektin	0.5 mM 6.0 mM 13 mM 0.6 mM >1 mM >1 mM	ELISA, Selektin-IgG Fusionsprotein, sLe ^x -Pentaceramid.
	(2S)-3-Cyclohexyl-2-O-1-O-[(1R,2R)2-O-(α -L-fucopyranosyl)-cyclohexyl]- β -D-galactopyranosyl-3-yl-2-methylpropanoat. ¹²	E-Selektin	0.1 mM	ELISA, E-Selektin-IgG, sLe ^x -Polymer.
	(2S,3R,4E)-3-benzoyloxy-2-hexadecanoylamino-1-[2,3-di-O-benzoyl-4,6-di-O-carboxymethyl- α -D-galactopyranosyloxy]-4-octadecen ²²	E-Selektin P-Selektin L-Selektin P-Selektin P-Selektin	11 μ M 9.5 μ M 10 μ M 18 μ M 28 ± 10 μ M	FACScan, immobilisiertes Selektin-IgG Fusionsprotein, HL-60 Zellen. FACScan, immobilisiertes Selektin-IgG Fusionsprotein, LS180-Zellen. FACScan, Blutplättchen, HL-60 Zellen.
Klasse III	Tetra-sLe ^x -Glycan Verzweigter Poly-N-Acetylglactosamincore ²⁴	E-Selektin	< 0.05 μ M	Stamper-Woodruff-binding Assay ²⁷ .
	Tetra-sLe ^x -Glycan Linearer Poly-N-Acetylglactosamincore ²⁵	L-Selektin	1 nM	Stamper-Woodruff-binding assay.
	LysGlyGlyLys[sLe ^x -(CH ₂) ₇] ₃ ²³	mAb CSLEX1 E-Selektin Akt. HUVEC	23 μ M 110 μ M 1000 μ M	RIA, immobilisierte HepG2 Zellen. RIA, immobilisiertes E-Selektin. RIA, aktivierte HUVECs.
	3 mol% sLe ^x Liposomen ²³	mAb CSLEX1 E-Selektin Akt. HUVEC	0.033 nM 6 nM 74 nM	RIA, immobilisierte HepG2 Zellen. RIA, immobilisiertes E-Selektin. RIA, aktivierte HUVECs.
Klasse IV	Tyrosin(37)-Tryptophan(50) ²⁶	P-Selektin E-Selektin	53 μ M 57 μ M	ELISA, immobilisiertes Selektin-IgG Fusionsprotein, Humane Neutrophile

Tabelle 2: Eine Auswahl von Selektin-Inhibitoren mit ihren Bindungskonstanten.

2.6 Kombinatorische Kohlenhydrat-Bibliotheken

Im Gegensatz zur traditionellen Synthese von einzelnen Substanzen, die anschließend auf ihre Bindungsaktivität getestet werden, ist die kombinatorische Chemie in der Lage, in kurzer Zeit eine Vielzahl von Verbindungen in Form von Substanz-Bibliotheken zu erzeugen.

Die Kohlenhydrate sind aber aufgrund ihrer Polyfunktionalität und der aufwendigen Synthese von selektiv geschützten Monosaccharid-Bausteinen nur mit großem Aufwand in der kombinatorischen Chemie einsetzbar. Erschwerend kommt hinzu, daß bei jeder Glycosylierung ein neues stereogenes Zentrum entsteht (α - und β -Anomer). Verzweigungen oder Modifikationen, wie die Sulfatierung oder Phosphatierung können die Synthese zusätzlich komplizieren. Dennoch wurden in den letzten fünf Jahren einige neue Strategien für die Synthese von Kohlenhydrat-Bibliotheken entwickelt²⁸.

Grundsätzlich unterteilt man in Festphasen-Synthesen und Reaktionen, die in Lösung durchgeführt werden. Der Vorteil der Festphase liegt in der wiederholbaren Umsetzung mit Reagenzien und deren leichten Entfernung durch beliebige Reinigungsschritte. Mit einer einfachen *Split*- und *Mix*-Strategie lassen sich so sehr schnell große Substanz-Bibliotheken erzeugen. Allerdings muß nach Erhalt eines *hits* die aktive Komponente durch ein geeignetes Dekonvolutionsverfahren ermittelt werden^{29,30}. Die Identifizierung kann auch ohne Dekonvolution, z.B. mit Hilfe der *frontal affinity chromatography* und mit der Massenspektrometrie erfolgen³¹. Ein weiterer Punkt ist die *on-bead* Präsentation der Zielmoleküle auf der Oberfläche der Festphase, die als Modell für polyvalente Wechselwirkungen dienen kann.

Des Weiteren unterscheidet man bei der Synthese von Kohlenhydrat-Bibliotheken zwischen Synthesen eines geschützten Glycosyldonors mit einem freien³² oder mit einem geschützten Akzeptor³³. Die erste Strategie wurde entwickelt, um die erheblichen Syntheseanforderungen der

orthogonal geschützten Saccharid-Bausteine zu vermeiden³⁴. Nach dem Vorbild dieses Verfahren wurde auch die in dieser Arbeit verwendete fucosyierte und sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek hergestellt. Ausgangspunkt war ein perbenzyliertes Fucosyl-Trichloracetimidat, das an einen freien Lactose-Akzeptor gekoppelt wird. Die Reaktion wurde in Lösung durchgeführt. Der Hauptnachteil dieses Verfahren liegt in der ungenügenden Kontrolle des Glycosylierungsgrads, so daß Mehrfach-Glycosylierungen unvermeidlich sind. Zur Vermeidung dieses Problems wurde eine Strategie entwickelt, in der der Donor und der Akzeptor geschützt sind³⁵. Ein zentraler orthogonal geschützter *building block* wird nach selektiver Entschützung mit einem Thioglycosid-Donor umgesetzt. Nach erneuter Entschützung und anschließender Kopplung erhält man so verzweigte Oligosaccharide.

Als Festphasen-Synthese wurde ein bidirekionaler Ansatz entwickelt. Ein immobilisierter Benzyl- und Tetrahydropyran-geschützter Thioglycosid-Donor reagiert parallel mit mehreren unterschiedlichen Glycosyl-Akzeptoren zu verschiedenen Disacchariden. Nach Vereinigung und Abspaltung der Tetrahydropyran-Schutzgruppe vom ursprünglichen Donor erfolgt eine erneute Umsetzung mit einem weiteren Benzyl-geschützten Thioglycosid-Donor zur Trisaccharid-Bibliothek³⁶.

Trotz des zunehmenden Interesses an den zahlreichen an Glycoproteinen und Zelloberflächen vorkommenden Oligosacchariden, wurden insgesamt nur relativ wenige Strategien zur Synthese von kombinatorischen Kohlenhydrat-Bibliotheken entwickelt. Vielmehr werden oft Parallelansätze gewählt, die jedoch eher Anordnungen analoger Verbindungen darstellen, als wirkliche Bibliotheken³⁷.

2.7 Die E-Selektin Bindungsstelle

Die erste Röntgenstruktur einer Selektinähnlichen Mutante des *rat mannose-binding* Proteins (MBP-A) wurde 1992 mit 1.7 Å Auflösung aufgeklärt³⁸. Die Calciumabhängigkeit der Bindung des zum C-Typ gehörenden Lektins konnte mit der CRD-Domäne (*carbohydrate recognition domain*) im Komplex mit einem Asparaginyl-Oligosaccharid gezeigt werden. Es wurden insgesamt drei gebundene Calciumatome an verschiedenen Stellen gefunden, wobei sich zwei Calciumatome dieselben Aminosäuren (Glu165 und Asp194) teilen.

Nur die terminale Mannose zeigt Kontakte zur CRD-Region und komplexiert mit der an der 3- und 4-Position stehenden Hydroxylgruppe das Calcium zwei zu einer pentagonalen Bipyramide. Die Koordinierung der Mannose erfolgt in apicaler Position, so daß das Calcium 8-fach koordiniert ist. Jeweils ein Elektronenpaar der Hydroxylgruppen ist dem Calcium zugewandt. Das Wasserstoffatom der 3-OH Position bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxylat vom Glu193. Das Sauerstoffatom der 4-OH Gruppe dient als Wasserbrückenakzeptor zum Amidproton der Asparaginseitenkette. In der Kohlenhydrat-freien Kristallstruktur übernimmt ein Wassermolekül die Rolle der Mannose. Dieser Bindungsmodus unterscheidet sich wesentlich von dem der Pflanzenlektine (*Concanavalin A*³⁹, *Erythrina corallodendron* Lektin⁴⁰, *Lathyrus ochrus* Isolektin⁴¹). Bei diesen Lektinen dienen die Metallionen zur strukturellen Integrität und Positionierung der an der Kohlenhydrat-bindung beteiligten Aminosäuren und sind nicht direkt am Zucker koordiniert. Mutagenese-Experimente zeigten, daß bei einer Mutation der Aminosäure Asn187 zu Asp die Fähigkeit zur Bindung des Calciums erhalten bleibt, eine Bindung zur Mannose jedoch nicht mehr zu erkennen ist⁴².

Die Bindungsspezifität des MBP-A ist nicht auf die D-Mannose beschränkt, vielmehr wird auch N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), D-Glucose und L-Fucose erkannt. Ihnen ist gemeinsam, daß bei einer Superpositionierung der Ringatome die 3-

und 4-OH-Gruppen in äquatorialer Lage sind und somit das Calcium koordinieren können. Bei der L-Fucose ist dies nur möglich, wenn die C1- und C6-Position gegenüber der D-Mannose ausgetauscht sind. D-Galactose wird nicht gebunden. Die axiale 4-OH Gruppe kann nicht mit dem Calcium wechselwirken und überlagert sich mit der Position des C³-Atoms vom His189.

Als Basis für viele weitere Arbeiten diente die Röntgenstruktur der lec/EGF-Domäne des E-Selektins von 1994⁴³. Die 3D-Struktur des in CHO-Zellen exprimierten Proteins konnte mit einer Auflösung von 2.0 Å aufgeklärt werden. Zusätzlich wurde das Protein mit N-Glycanase deglycosyliert.

Das generelle Faltungsmuster ist dem des *rat mannose-binding* Protein sehr ähnlich, obwohl die Sequenzhomologie nur ca. 30% beträgt. Die strukturellen Unterschiede verteilen sich auf verschiedene Bereiche. Insertionen bei Aminosäure 45-47 und 95-99 vergrößern einen *Loop* bzw. verlängern einen β -Strang (β 4 und β 5). Eine weitere wesentliche Veränderung ergibt sich im *Loop* einer Calciumbindungsstelle (AS 84-87) (Calciumbindungsstelle eins im MBP-A). Obwohl hier keine Insertion oder Deletion stattfindet, geht durch Austausch von Gly190 und Gly192 in Gln und Asp eine Calcium-Bindungsstelle im E-Selektin verloren. Bemerkenswert ist, daß die Calcium-Bindungsstelle sowohl strukturell als auch sequentiell dem MBP-A entspricht (Tabelle 3). Nur das Glu88 differiert in der Position und kann somit nicht mit dem Calcium koordinieren.

MBP-A	E-Selektin (lec/EGF)
Glu185, Asn187, Glu193, Asn205, Asp206	Glu80, Asn82, Glu88, Asn105, Asp106

Tabelle 3: Sequenzvergleich im Bereich der Calciumbindungsstelle: MBP-A/E-Selektin (lec/EGF). Glu88 ist im E-Selektin nicht mehr an der Calciumbindung beteiligt.

Eine von den insgesamt drei gefundenen Calcium-Bindungsstellen ist durch die Kristallisation bedingt. Im nativen System werden lediglich zwei Metallatome in der CRD-Region koordiniert. Ein Calciumatom am Glu185, Asn187, Glu193, Asn205 und

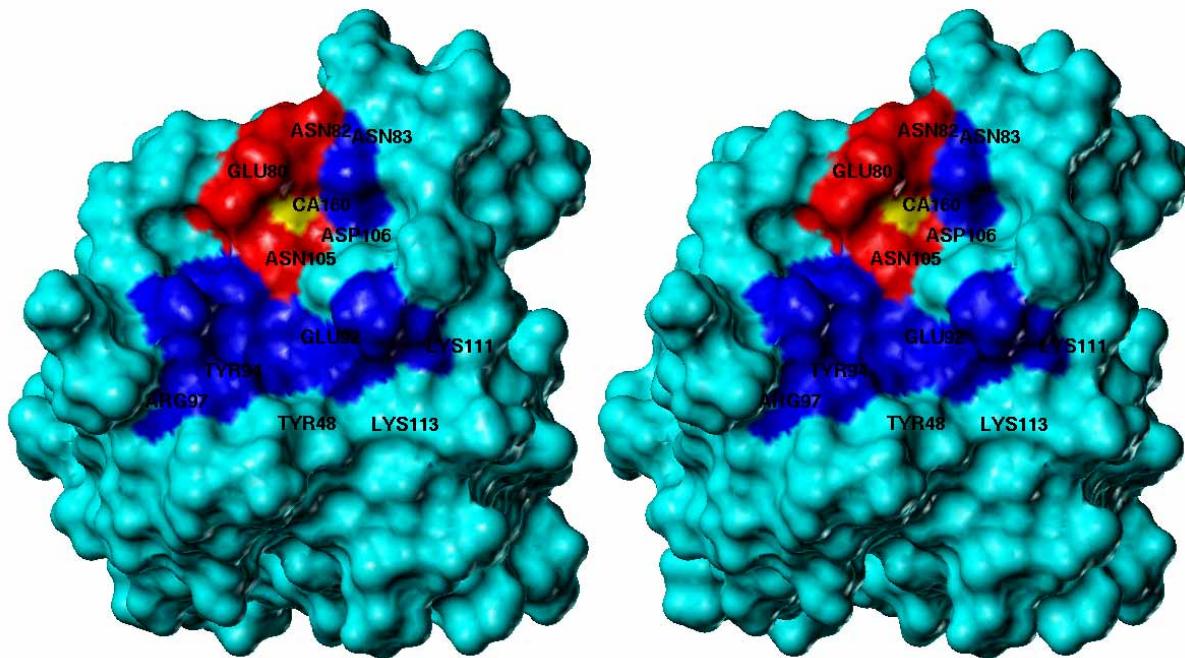


Abbildung 4: Die lec/EGF-Domäne des E-Selektins ist als Connolly-Oberfläche dargestellt. Das koordinierte Calcium ist gelb eingefärbt, die roten Aminosäuren sind an der Calciumbindung beteiligt und die dunkelblauen Aminosäuren sind für die Bindung des sLe^x essentiell.

am Asp 206 und ein Calciumatom am Glu165 und am Asp194.

Mit Hilfe von Mutageneseexperimenten^{44,45} konnte gezeigt werden, daß folgende Aminosäuren für die Bindungsaffinität wichtig sind: Tyr48, Asn82, Asn83, Glu92, Tyr94, Arg97, Lys111 und Lys113. In Abbildung 4 ist die Kohlenhydratbindungs tasche mit dem Calcium und den essentiellen Aminosäuren gezeigt.

In neueren Studien wurde eine MBP-A Mutante, in der die Aminosäuren 211-213 gegen drei Lysine ausgetauscht wurden, einzeln, im Komplex mit sLe^x, 3'-Sulfo-Le^x und 4'-Sulfo-Le^x kristallisiert⁴⁶. Durch die Bindung der Liganden wurde die Kristallstruktur des Proteins kaum beeinflußt. Die Röntgenstrukturanalyse, mit einer Auflösung von 1.95-2.1 Å, zeigte eine Koordinierung der Fucose nicht über die 3-OH und 4-OH Gruppe – wie bei der Mannose (MBP-A) – sondern über die 2-OH und 3-OH Gruppe am Calcium. Das Lys211, welches komplementär zum Lys111 im E-Selektin ist, bildet mit dem Sialyl-Lewis^x und dem 3'-Sulfo-Lewis^x eine Wasserstoffbrücke zur

4-OH Gruppe der Galactose aus. Im 4'-Sulfo-Lewis^x Komplex erfolgt eine Stabilisierung der Bindung in Form einer Salzbrücke zur Sulfatgruppe. Zusätzlich findet sich im Sialyl-Lewis^x Komplex eine Wasserstoffbrücke vom exocyclischen Acetamido Sauerstoff zum N82 des Asn187. Eine weitere Wasserstoffbrücke bildet die 6-OH Gruppe des GlcNAc zum His189 aus. Dieses Histidin ist jedoch im E-Selektin nicht in der Bindungsregion lokalisiert und ist somit nicht an der Bindung zum Liganden beteiligt⁴³. Ebenfalls befindet sich im MBP-A an der Position, in der im E-Selektin das Tyr94 sitzt, das Val199. Dieses Tyr94 scheint aber aufgrund von Mutagenese-Experimenten essentiell für den Bindungsmodus des sLe^x zu sein. In Bindungsmodellen¹¹ verstärkt eine Wasserstoffbrücke zur 6-OH Gruppe der Galactose die Bindungsaffinität zum E-Selektin. Durch chemische Modifikationen an der 4-OH und 6-OH Gruppe der Galactose konnte eine Beteiligung dieser Gruppen am Erkennungsprozeß nachgewiesen werden⁴⁷. Mittels STD NMR-Spektroskopie wurde dieses bestätigt⁴⁸.

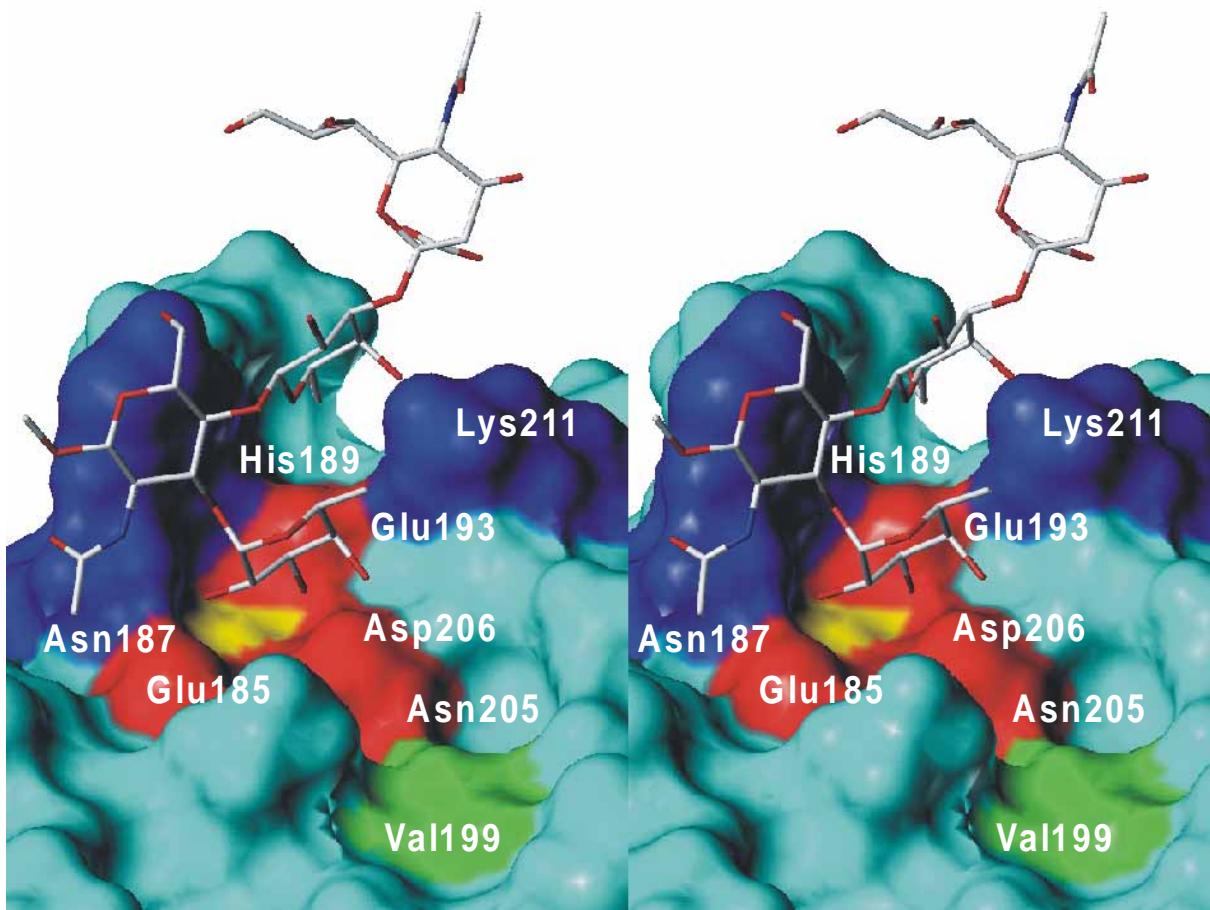


Abbildung 5: Stereodarstellung der MBP-A-Mutante (*rat mannose-binding Protein*) im Komplex mit Sialyl-Lewis^x. Das Protein ist als Connolly-Oberfläche dargestellt. Das koordinierte Calcium ist gelb eingefärbt, die roten Aminosäuren sind an der Calciumbindung beteiligt und die dunkelblauen Aminosäuren sind für die Bindung des sLe^x essentiell. Zusätzlich ist das Val199 grün eingefärbt. An dieser Position befindet sich im E-Selektin das Tyr94, das wichtig für den Bindungsmodus des Sialyl-Lewis^x ist.

Ein Modellkomplex des E-Selektins⁴⁹ zeigt, daß das Arg97 eine ionische Interaktion mit der Carboxylatgruppe der Sialinsäure des Sialyl-Lewis^x ausbildet. In der Röntgenstruktur der MBP-A Mutante zeigt die Sialinsäure keine Proteinkontakte. Die Sialinsäure ist vielmehr in der Nähe von Lys111 lokalisiert.

Ob eine Bindungshomologie des Sialyl-Lewis^x zwischen der MBP-A Mutante und dem E-Selektin besteht, ist unklar. Die Aminosäuren der Calciumbindungsstelle und deren dreidimensionalen Gestalt sind zwar denen des E-Selektin sehr ähnlich, andere Aminosäuren wie das His189, Tyr94, Arg97 unterscheiden sich jedoch maßgeblich. Auch die Position der Sialinsäure im MBP-A Komplex ist wahrscheinlich im Bindungsmodus mit dem E-Selektin nicht wiederzufinden. Im MBP-A Komplex liegt die negative Ladung der Sialinsäure außerhalb

der Kavität – es ist zu vermuten, daß die negative Ladung der Carboxylatgruppe eher durch eine positive Ladung einer Aminosäure auf der Proteinoberfläche abgesättigt wird.

2.8 Die bioaktive Konformation des sLe^x

Alle drei Selektine erkennen das gleiche Grundmotiv, sLe^x und sLe^a. Die bioaktive Konformation des Tetrasaccharids konnte mit Hilfe von NMR-Untersuchungen und *distance-geometry* Verfahren ermittelt werden^{50,51,52,53,54}.

Für die NMR-Analyse sind die *transferred-NOESY* Experimente von besonderer Bedeutung^{55,56,57,58,59}. Mit dieser Methode gelingt es, Liganden im gebundenen Zustand NMR-spektroskopisch zu untersuchen.

Grundlage ist eine reversible Bindung des Liganden am Protein und eine Dissoziationskonstante K_D von 10^{-3} [M] bis 10^{-7} [M]. Die Auswertung von trNOE -Aufbauraten ergibt dann Interprotonendistanzen, die als *constraints* zu einer dreidimensionalen Struktur führen.

In Lösung liegt das sLe^x als komplexes Gemisch von Konformeren vor, das hauptsächlich durch die Variabilität der α -D-NeuNAc-(2-3)- β -D-Gal glycosidischen Bindung geprägt ist^{60,61,62,63}. Am E-Selektin gebunden, liegt das Tetrasaccharid nur in einer Konformation vor (Abb. 6)^{51,52,54}.

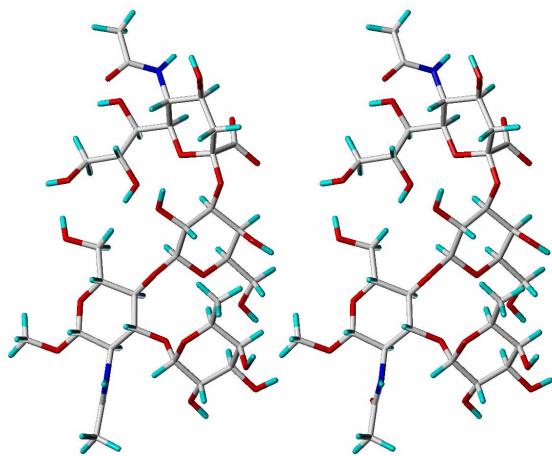


Abbildung 6: Bioaktive Konformation des Tetrasaccharids sLe^x ⁵¹.

Die Torsionswinkel der glycosidischen Bindungen sind in Tabelle 4 gezeigt.

	ϕ (H1-C1-O1-Cx, für NeuNAc C1-C2-O2-Cx)	ψ (C1-O1-Cx-Hx), für NeuNAc C2-O2-Cx-Hx)
NeuNAc/Gal	$-76^\circ \pm 10^\circ$,	$6^\circ \pm 10^\circ$,
	$-58^\circ \pm 5^\circ$	$-22^\circ \pm 5^\circ$
	-43°	-12°
Gal/GlcNAc	$39^\circ \pm 10^\circ$,	$12^\circ \pm 6^\circ$,
	$24^\circ \pm 5^\circ$	$34^\circ \pm 3^\circ$
	45°	19°
Fuc/GlcNAc	$38^\circ \pm 7^\circ$,	$26^\circ \pm 6^\circ$,
	$71^\circ \pm 3^\circ$	$14^\circ \pm 2^\circ$
	29°	41°

Tabelle 4: Glycosidische Winkel der bioaktiven Konformation von sLe^x . Gezeigt sind die Daten von drei NMR-Analysen. Weiß unterlegt⁵¹, hellgrau unterlegt⁵² und dunkelgrau unterlegt⁵⁴.

Obwohl die bioaktive Konformation des sLe^x gut beschrieben ist und die Röntgenstruktur vom E-Selektin bekannt ist, konnte

die genaue Position vom sLe^x in der Proteinbindungsstasche noch nicht experimentell nachgewiesen werden.

Methoden 3

3. Methoden

Die Entwicklung neuer Pharmaka ist sehr kostenintensiv (300-600 Mio US Dollar), da sie bis zur Markteinführung eines neuen Produktes eine Vielzahl von Testverfahren durchlaufen muß. Bis ein Medikament überhaupt in die klinischen Phasen eintritt, vergehen in der Regel Jahre. Die pharmakologische Wirkung eines Präparates genügt nicht. Fragen der Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bis hin zur Toxizität müssen vorher an *in vitro*-Systemen und Tiermodellen geklärt werden.

Ein erster wichtiger Teilespekt ist die Entwicklung einer Leitstruktur und deren Optimierung. Aufwendige *screening*-Verfahren prüfen zunächst große Substanzbibliotheken auf biologische Aktivität. Ergibt sich aus dem Testverfahren ein *hit*, so wird diese Substanz identifiziert und durchläuft, falls sie eine neue geeignete Leitstruktur ist, einen Optimierungsprozess.

Theoretische Methoden im Bereich des Wirkstoffdesigns setzen an unterschiedlichen Punkten an. Abhängig von den Voraussetzungen ergeben sich verschiedene Vorgehensweisen. Als Beispiele sind hier Ligand-basierende Verfahren wie die CoMFA- (*comparative molecular field analysis*) und QSAR-Analysen (*quantitative structure-activity relationship*) zu nennen. Im Bereich der Rezeptor-basierenden Methoden finden das *docking* und das *De novo*-Design Anwendung.

3.1 Experimentelle Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Die erste grundlegende Frage lautet: Bindet ein Ligand an das Zielprotein, oder bindet er nicht. Für die Beantwortung dieser Frage wurden eine Reihe von Bindungsassays etabliert: FACSscan Analysen, ELISAs, RIAs, BIAcore und Floureszenzassays um nur die wichtigsten zu nennen. Allen Methoden ist gemeinsam, daß nur eine Antwort bezüglich der Bindungsstärke des Liganden erhalten wird. Die strukturellen Eigenschaften der Protein-Ligand-Wechsel-

wirkungen sind mit diesen Methoden jedoch nicht zugänglich. Noch komplizierter wird es bei der Untersuchung von Ligandmischungen. Die oben aufgelisteten Verfahren können nicht die bindende Spezies direkt aus der Mischung identifizieren. Nur über aufwendige Dekonvolutionsverfahren können Binder und Nichtbinder unterschieden werden. Es ist also notwendig neue Strategien und Methoden zu entwickeln, die zum *screening* von Substanzbibliotheken geeignet sind. Die NMR-Spektroskopie hat sich hier als besonders fruchtbar erwiesen.

3.1.1 NMR-Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Die detailliertesten Daten liefert die Röntgenstrukturanalyse, in der ein Protein mit seinem Liganden cokristallisiert wird. Allerdings gelingt dies nur selten und ist mit erheblichem Aufwand verbunden.

Daher gewinnt die NMR-Spektroskopie immer mehr an Bedeutung. Mit ihr ist es nicht nur möglich unter annähernd physiologischen Bedingungen zu messen, die NMR-Spektroskopie ist auch als zerstörungsfreie Methode für viele nichtkristallisierbare Proteine das einzige Verfahren für die Strukturanalyse. Insbesondere *tr*NOESY, Diffusions basierte *screening*-Methoden^{64,65}, Sättigungstransfer-Differenzmethoden und Relaxationzeitmessungen⁶⁵ liefern wertvolle Informationen über Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

3.1.2 Der Nuclear Overhauser Effect (NOE)

Neben der skalaren Kopplung (*J*-Kopplung) und deren Abhängigkeit vom Diederwinkel über die Karplus-Beziehung⁶⁶, ist der NOE⁶⁷ (*Nuclear Overhauser Effect*) der wichtigste NMR-Struktur-Parameter.

Als reines Relaxationsphänomenen entwickelt sich der NOE mit der dipolaren Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} . Diese ist zum Abstand der betrachteten Atomkerne mit dem Faktor $1/r^6$ proportional. Die mit dem

NOE bestimmten Abstände liegen im Bereich zwischen 2-5 Å. Im homonuklearen Fall ist σ_{IS} näherungsweise durch folgende Gleichung definiert:

$$\sigma_{IS} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10} \left[\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2\tau_c^2} - \tau_c \right] r_{IS}^{-6} \quad \text{Gl. 1}$$

- μ_0 = Permeabilität im Vakuum [$4\pi 10^{-7} \text{ Js}^2 \text{C}^{-2} \text{m}^{-1}$]
- γ = gyromagnetisches Verhältnis [$^1\text{H} 2.675 \cdot 10^8 \text{ rad T}^{-1} \text{s}^{-1}$]
- τ_c = Korrelationszeit [s]
- ω = Larmorfrequenz des betrachteten Kernes [s^{-1}]

Dem entgegen wirkt die direkte dipolare Relaxation ρ_{IS} . Im Zweispinsystem kann der Gesamt-NOE (η_{IS}) wie folgt beschrieben werden.

$$\eta_{IS} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \frac{W_{2IS} - W_{0IS}}{2W_{1I} + W_{2IS} + W_{0IS}} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} \quad \text{Gl. 2}$$

- γ_{IS} = gyromagnetische Verhältnisse der Kerne I und S
- W_{2IS} = Zweiquantenübergangswahrscheinlichkeit
- W_{0IS} = Nullquantenübergangswahrscheinlichkeit
- W_{1I} = Einquantenübergangswahrscheinlichkeit
- σ_{IS} = Kreuzrelaxationsrate des Zweispinsystems
- ρ_{IS} = direkte dipolare Relaxation

In Abbildung 7 ist die Abhängigkeit des maximalen NOEs vom Produkt aus der Spektrometerfrequenz ω und Korrelationszeit τ_c dargestellt. Die Korrelationszeit ist ein Maß für die molekulare Beweglichkeit. Bei $\omega\tau_c = 1$, sind W_0 und W_2 identisch und es ist kein NOE beobachtbar.

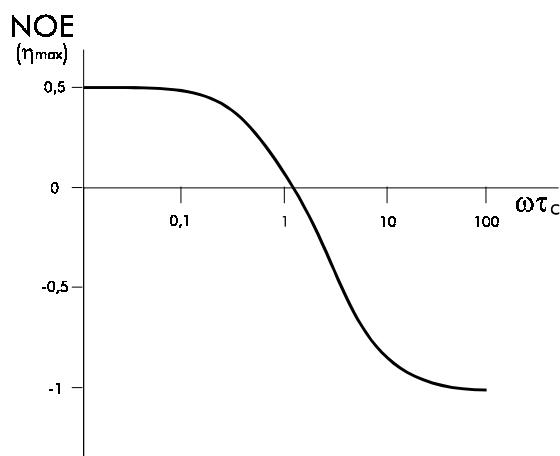


Abbildung 7: Abhängigkeit des max. homonuklearen NOE von $\omega\tau_c$.

Der Nulldurchgang liegt bei einer Spektrometerfrequenz von 500 MHz bei Molekülen mit einer Masse von $\approx 1000\text{-}1500$ Da. Für die Extrema des *extreme narrowing limit* ($\omega\tau_c \ll 1$, sehr kleine Moleküle) und des *spin diffusion limit* ($\omega\tau_c \gg 1$, sehr große Moleküle) kann der *steady-state* NOE maximal +0.5 bzw. -1 erreichen.

3.1.3 Der transferred Nuclear Overhauser Effect (trNOE)

Der *trNOE* (*transferred Nuclear Overhauser Effect*) wurde erstmals an synthetisch hergestellten Oxytocin-Analoga beobachtet^{68,69}. Normalerweise liefern kleine Moleküle positive NOEs und scharfe NMR-Signale. In Gegenwart des Proteins Neurophysin zeigten diese Verbindungen jedoch negative NOEs und breite Linien. Der gebundene Ligand verhält sich also bezüglich seiner molekularen Beweglichkeit wie das Protein. Die *trNOESY*-Signale stellen somit Mittelwerte des gebundenen und freien Zustands dar. Darüber hinaus können Protonenabstände über *trNOE*-Aufbaukurven bestimmt werden. Der Wechsel des NOE-Vorzeichens vom bindenden Liganden kann auch zur Untersuchung von Substanzbibliotheken genutzt werden^{70,71}. In Abbildung 7 ist das Prinzip des *trNOEs* dargestellt.

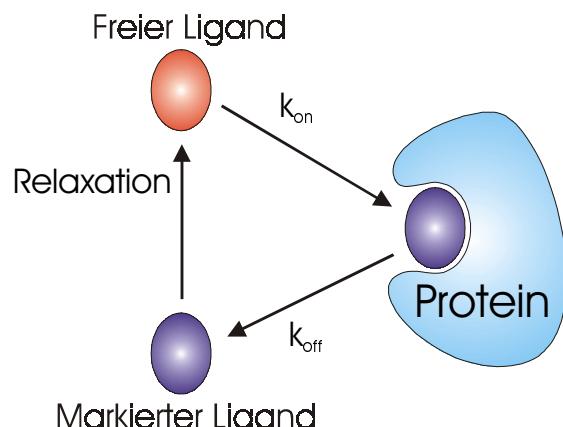


Abbildung 8: Schematische Darstellung der reversiblen Wechselwirkung zwischen einem Protein und seinem Liganden. k_{on} und k_{off} sind die Assoziationsrate bzw. die Dissoziationsrate. Der dunkelblau gezeichnete Ligand erfährt in der Bindungstasche eine Markierung mit der Korrelationszeit des Proteins.

Voraussetzung für die Beobachtung des *trNOEs* ist eine reversible Bindung des Liganden am Protein. Ausgehend von der Annahme, daß die Geschwindigkeitskonstante k_{on} diffusionskontrolliert ist, ($k_{on} \approx 10^8 \cdot [P] \text{ s}^{-1}$, $[P]$ = Proteinkonzentration) und die Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-7} M liegt, ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante k_{off} von 10^1 bis 10^5 s^{-1} . Der formalistische Zusammenhang ist in Gleichung 3 und 4 gezeigt.



$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad \text{Gl. 4}$$

- $[P]$ = Proteinkonzentration [mol/l]
- $[L]$ = Ligandkonzentration [mol/l]
- $[PL]$ = Protein-Ligand-Komplex-Konzentration [mol/l]
- K_D = Dissoziationskonstante [M]
- k_{off} = Dissoziationsrate [s^{-1}]
- k_{on} = Assoziationsrate [s^{-1}]

Für die Beobachtung von *trNOEs* ist die gemittelte Kreuzrelaxationsrate $\langle \sigma \rangle$ von entscheidender Bedeutung. Sie setzt sich aus den Kreuzrelaxationsraten des Liganden im freien Zustand σ_F und im gebundenen

Zustand σ_B zusammen. Im gebundenen Zustand ist die Kreuzrelaxationsrate σ_B direkt proportional zur Molekülgröße des Proteins. Somit liefern Komplexe mit großen Proteinen größere *trNOEs*.

$$\langle \sigma \rangle = N_F \sigma_F + N_B \sigma_B \quad \text{Gl. 5}$$

- N_F = Anzahl der freien Protonen.
- N_B = Anzahl der Protonen im gebundenen Zustand.
- σ_F = Kreuzrelaxationsrate im freien Zustand.
- σ_B = Kreuzrelaxationsrate im gebundenen Zustand.

Für einen NOE, der den gebundenen Zustand repräsentiert, muß gelten:

$$|N_F \sigma_F| \ll |N_B \sigma_B| \quad \text{Gl. 6}$$

3.1.4 STD NMR-Spektroskopie

Die STD NMR-Spektroskopie (*saturation-transfer-difference*) ist eine Methode zur Untersuchung von Substanzbibliotheken auf Bindungsaktivität an makromolekularen Rezeptoren.

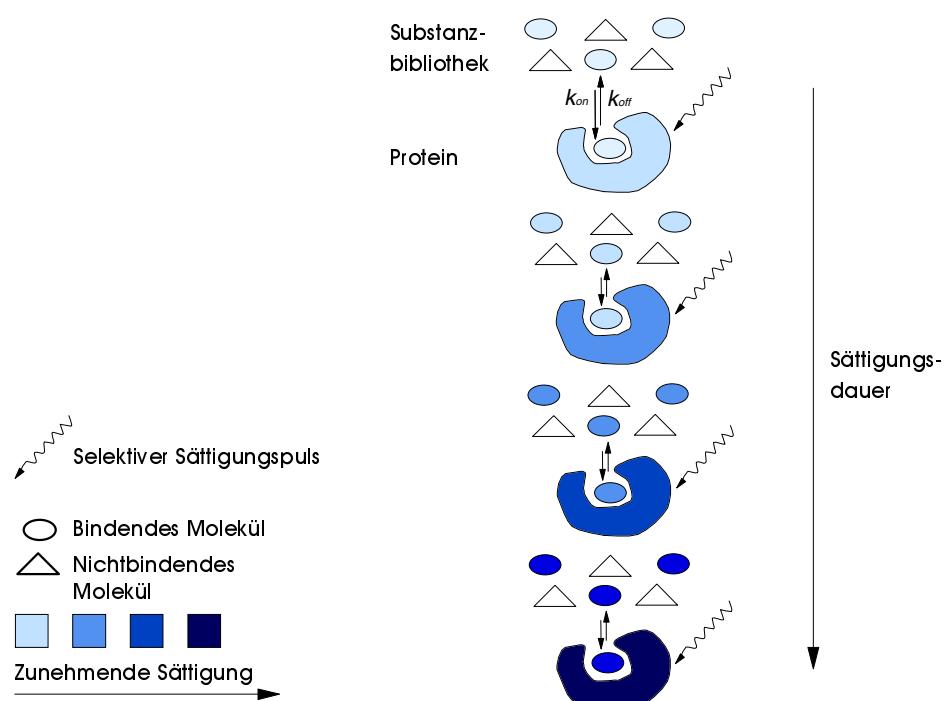


Abbildung 9: Schema des Sättigungstransfer. Ein selektiver Sättigungspuls verteilt mit zunehmender Sättigungsduer über Spindiffusion die Magnetisierung auf das gesamte Protein. Nur der bindende Ligand wird gesättigt und gelangt über chemischen Austausch wieder in Lösung, wo er detektiert wird.

Das Verfahren ist sowohl für die Aufnahme von 1D- sowie zur Aufnahme von 2D-Spektren geeignet und liefert nur Signale der bindenden Spezies^{72,73}. In Proteinen ist die Spindiffusion besonders stark ausgeprägt. Über das große Netzwerk von dipolar gekoppelten Kernen sollte ein Magnetisierungstransfer gut gelingen. Eine selektive Sättigung einzelner Protein-Resonanzen führt also schnell zu einer Verteilung der Magnetisierung auf das gesamte Protein⁷⁴. Bindet ein niedermolekularer Ligand an das Protein, so wird die Magnetisierung auf den Ligand übertragen. Die Effizienz des Magnetisierungstransfers hängt von der Vorsättigungsdauer, von der Bindungsstärke und vom Überschuß des Liganden ab. Dementgegen wirkt die T_1 Relaxation des Liganden im freien Zustand, also die Zeitkonstante mit der sich die Gleichgewichtsmagnetisierung wieder einstellt. Nicht-bindende Liganden erfahren über das Protein keine Sättigung und zeigen bei dem *on resonance* Experiment keine Veränderung der Signalintensität. Bildet man nun die Differenz aus dem Spektrum in dem das Protein keine Sättigung erfahren hat (*off resonance*) und dem, welches durch Vorsättigung (*on resonance*) an Signalintensität verloren hat, erhält man ein Spektrum, das nur Resonanzen vom gebundenen Liganden enthält. Es ist allerdings darauf zu achten, daß die Liganden in der Mischung nicht direkt vom Sättigungspuls beeinflußt werden dürfen.

3.1.5 Relaxationszeit-Messungen

Die transversale- und die longitudinale Relaxationszeit sind ein Maß für die Beweglichkeit von molekularen Systemen. Je unbeweglicher bzw. größer das Molekül ist, desto kürzer werden die transversalen Relaxationszeiten (T_2 -Relaxation). Nutzt man dieses Phänomen zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, so sollte der bindende Ligand mit der Korrelationszeit des Proteins markiert sein und somit eine kürzere T_2 -Relaxationszeit besitzen als der freie Ligand^{75,76}. Die Signale der nicht-bindenden Komponenten sind unbeeinflußt und zeigen ihr normales Relaxationsverhalten. Als besonders erfolgreich hat sich die

Messung der transversalen Relaxationszeit (T_2) herausgestellt⁶⁵, da hier eine kontinuierliche Abnahme der T_2 -Zeit bei immer größer anwachsender Molekularmasse zu beobachten ist. Zwei Methoden für die Bestimmung der T_2 -Zeit werden hauptsächlich angewandt. Das eine Verfahren benutzt einen *spinlock*-Filter⁷⁷. Die andere Methode verwendet zur Messung der transversalen Relaxationszeit die CPMG-Pulssequenz⁷⁸. Bei beiden Verfahren wird die gesamte Magnetisierung in der transversalen Ebene gehalten, so daß nur die Spin-Spin-Relaxation wirksam ist. Die Abnahme der Signalintensität wird dann nach unterschiedlichen *spinlock*-Zeiten gemessen und man erhält die T_2 -Zeit. Die CPMG-Pulssequenz besteht aus einem *spin-echo-train*, daß heißt die durch einen 90° Puls erzeugte transversale Magnetisierung wird durch eine Abfolge von refokussierenden 180° Pulsen in der xy-Ebene gehalten. Der Abbau der Magnetisierung erfolgt nur über T_2 . Beim *spinlock*-Verfahren wird die Magnetisierung nach einem 90° Puls durch Anlegen eines schwachen *rf*-Feldes in der transversalen Ebene gehalten. Der Abbau erfolgt dann longitudinal zum effektiven Feld und wird dann Spin-Gitter-Relaxation im rotierenden Koordinatensystem T_{1p} genannt. In Lösung ist T_{1p} allerdings identisch mit T_2 .

3.2 Das *molecular modeling*

Hohe Rechnerleistungen haben in jüngster Zeit das *molecular modeling* als neues Arbeitsgebiet auch für Makromoleküle etabliert. Man versteht unter diesem Begriff die Darstellung, Berechnung und Bearbeitung von realistischen dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften.

Grundsätzlich sind zwei Vorgehensweisen möglich. Der eine Ansatz extrapoliert bereits bekannte experimentelle Daten auf die räumliche Gestalt und auf die physikochemische Eigenschaften der zu untersuchenden Struktur. Während die andere Methode versucht, ausgehend von den Naturgesetzen mit möglichst genauen Rechenverfahren Aussagen zu erhalten. Hierzu gehören die quantenmechanischen Verfahren und die Kraftfeld-Methoden.

Interaktive Computergraphik	Darstellung von 3D-Strukturen
Modellierung kleiner Moleküle	Strukturerzeugung (CONCORD, CORINA) Molekülmechanik - Kraftfelder Moleküldynamik Quantenmechanische Verfahren Konformationsanalyse Berechnung physikochemischer Eigenschaften
Molekülvergleich	Überlagerung von Molekülen nach ihrer Ähnlichkeit Volumenvergleich 3D-QSAR (z.B CoMFA-Methode)
Modellierung von Proteinen	Sequenzvergleiche von Proteine Protein-Homologiemodeling Simulation der Proteinfaltung
Modellierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	Berechnung von Bindungskonstanten docking von Liganden
Liganden-Design	Suche in 3D-Datenbanken Strukturbasiertes Liganden-Design De novo-Design

Tabelle 5: Übersicht über die wichtigsten Methoden des *molecular modeling* in der Pharmaforschung⁷⁹.

3.2.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign definiert sich als quantitative Beschreibung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Ausgehend von einer 3D-Struktur des molekularen *targets* wird ein Ligand gesucht, der optimal in die Bindungstasche des Proteins paßt. Das Ziel wird dann erreicht, wenn durch hohe Komplementarität die Wechselwirkungsenergie maximal wird.

Der erste Schritt beim Design von Liganden für ein Zielprotein mit bekannter Struktur ist die genaue Analyse der Bindungsregion. Für diese Untersuchung stehen eine Reihe von Verfahren zur Verfügung. Das Programm *Grid*⁸⁰ beispielsweise berechnet die Wechselwirkungsenergien von verschiedenen Sondenmolekülen in einem dreidimensionalen Gitter auf der Proteinoberfläche. Die Visualisierung von Isopotentialräumen erlaubt dann die Beurteilung, in welchen Gebieten die Wechselwirkungsenergien der Sonde, z.B. eine primäre

Aminogruppe mit der Proteinoberfläche, am größten ist.

Sind bereits verschiedene Liganden bekannt, so kann deren Struktur-Wirkungsbeziehungen mit dem Protein untersucht werden. Essentielle Wechselwirkungen sind dann Grundlage für die weitere Optimierung der Substanzen. Aus dieser iterativen Vorgehensweise kann ein Design-Cyclus etabliert werden.

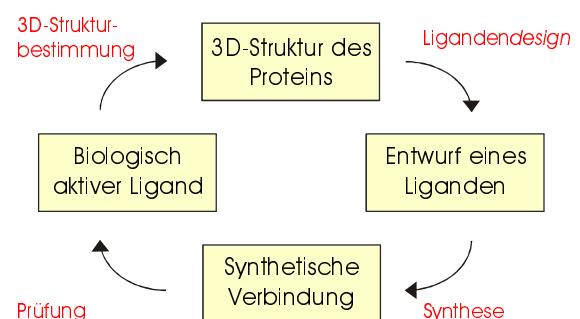


Abbildung 10: Design-Cyclus. Startpunkt ist häufig die Bestimmung der 3D-Struktur des Proteins.

Bei der Struktur eines Wirkstoffes unterscheidet man zwischen verschiedenen Bereichen des Moleküls:

- Der Pharmakophor, der für die spezifische Bindung verantwortlich ist und bei dem die Variation nur im geringen Maße stattfinden kann.
- Zusätzliche Gruppen, die eine stärkere Bindung und somit eine Erhöhung der biologischen Wirkung bewirken.
- Weitere Gruppen, die eine Bindung nicht beeinflussen, jedoch durch Änderung der Lipophilie die Verteilung im biologischen System bewirken.
- Abspaltbare oder modifizierbare Gruppen, die erst im Organismus ihre eigentliche Wirkung entfalten.

Entscheidend für die Optimierung einer Leitstruktur ist nun eine gezielte Modifizierung der dreidimensionalen Gestalt des Wirkstoffes. Die Änderung der physiko-chemischen Eigenschaft wird dann zur höheren Wechselwirkungsenergien führen, wenn die Komplementarität maximal wird. Die Ansatzpunkte verschiedener Modifizierungsmöglichkeiten kann man folgendermaßen beschreiben.

- Die Änderung der Lipophilie durch Ergänzung oder Entfernung von hydrophoben oder hydrophilen Gruppen.
- Variation der Substituenten eines aromatischen oder heterocyclischen Rings.
- Einführung oder Entfernung von Heteroatomen in Ketten oder Ringen.
- Variation der Substituenten an Heteroatomen.
- Modifizierung der Kettenlänge eines aliphatischen Restes oder eines Brückengliedes.
- Einführung von raumerfüllenden Substituenten zur Stabilisierung einer energetisch sinnvollen Konformation.
- Änderung der Ringgröße alicyclischer oder heterocyclischer Ringe.
- Einführung flexibler Teilstrukturen in Ringe.
- Einbau von Verzweigungen oder Anfügen von Ringen (Rigidisierung).

- Öffnen von Ringen.
- Entfernung von Chiralitätszentren zur Vereinfachung der Struktur.
- Einführung von Chiralitätszentren zur Erhöhung der Selektivität.

All diese Schritte können unidirektional oder parallel an verschiedenen Bereichen des Wirkstoffs durchgeführt werden. Es ist der Erfahrung und der Intuition des Designers überlassen, wo und wie er das Molekül verändert. In jedem Fall muß nach einer Modifizierung der Leitstruktur deren biologische Aktivität überprüft werden.

Prinzipiell sind beim Wirkstoffdesign zwei Wege möglich. Entweder wird eine bekannte Struktur optimiert oder es wird eine völlig neue Struktur entwickelt. Ein Vorteil bei der Optimierung von bereits vorhandenen Liganden besteht darin, daß man relativ schnell zu neuen potenteren und selektiven Strukturen gelangt. Allerdings werden die Substanzen sehr nahe an der Leitstruktur liegen. Völlig neue Strukturen können sich aus dem anderen Weg ergeben, dem „heiligen Gral“ des Wirkstoffdesigns, dem *De novo*-Design.

3.2.2 *De novo*-Design

Würde man alle Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden verstehen, wäre man in der Lage nur aufgrund einer 3D-Struktur des Proteins einen maßgeschneiderten Liganden zu entwerfen. Leider sind die Kenntnisse noch unzureichend und ein Universalmodell existiert noch nicht. Dennoch gibt es einige Verfahren, die durchaus Erfolge aufweisen können, wie z.B. LeapFrog⁸¹. Auch hier steht als Erstes die genaue Analyse der Proteinoberfläche. Dies kann mit dem bereits erwähnten Programm *Grid* erfolgen oder mit der Berechnung des elektrostatischen Potentials der Bindungsstelle. Auch die Berechnung der Lipophilie und Verteilung der funktionellen Gruppen, die Wasserstoffbrücken eingehen können, erweist sich als brauchbar. Mit diesen „Hot Spots“, also den Bereichen, die entscheidend für eine hohe Wechselwirkungsenergie sind,

kann ein stückweises Aufbauen eines Liganden erfolgen. Aus einer Fragmentbibliothek werden dann Molekülteile an den Stellen positioniert, die hohe Bindungsenergien liefern. Eine Carboxylatgruppe wird beispielsweise in direkter Nachbarschaft zu einer Guanidiniumgruppe von der Seitenkette des Arginins platziert. So wird Schritt für Schritt ein Molekül aufgebaut, daß im Idealfall als Resultat einen neuen hoch affinen Liganden darstellt.

3.2.3 Docking

Ziel dieses Verfahren ist das Einpassen eines oder mehrerer Liganden in die Proteinbindungstasche. Oft wird eine 3D-Datenbank mit mehreren hunderttausend Substanzen verwendet. Die Liganden werden in verschiedenen Orientierungen eingepaßt und wenn möglich als flexible Moleküle behandelt. Über ein *scoring* werden die besten Verbindungen selektiert und dienen als Grundlage für weitere Untersuchungen. Das Programm DOCK⁸² ist ein Vorreiter in diesem Bereich. Dieses Verfahren basierte allerdings nur auf sterischer Komplementarität. In der neuen Version wird ein Kraftfeld für die Berechnung der Wechselwirkung verwendet und ist damit wesentlich leistungsfähiger.

Wie bereits oben erwähnt ist nicht nur die Positionierung des Liganden von entscheidender Bedeutung, sondern auch deren konformationelle Flexibilität. Zusätzlich wird häufig auch eine Veränderung der Bindungstasche selbst beobachtet (*induced fit*). Die Suche nach der optimalen Struktur des Protein-Ligand-Komplex ist also essentieller Bestandteil des *dockings*. Im idealen Fall entspricht das Ergebnis einer Struktur, die ein Energieminimum des Proteins und des Liganden darstellt. Ein genetischer Algorithmus⁸³, der sich besonders gut für die Suche nach dem Energieminimum eignet, findet sich im Programm FlexiDock⁸⁴, welches Bestandteil im Softwarepaket Sybyl⁸⁵ ist. Dieser genetische Algorithmus basiert auf den Regeln der biologischen Evolution und begünstigt in einem iterativen Prozeß nur Generationen von Strukturen, welche die

höchsten Wechselwirkungsenergien besitzen. Das Programm arbeitet im Torsionswinkelraum, in dem die Bindungslängen und Bindungswinkel konstant gehalten werden. Berücksichtigt werden die van der Waals-, elektrostatischen- und Torsions-Energien des Tripos-Kraftfeldes.

3.2.4 Konformationsräume

Wie sieht die energetisch günstigste Konformation des Liganden aus und wird der Ligand in dieser Konformation gebunden? Die Beantwortung dieser Fragen erfordert eine systematische Analyse aller Positionen und Konformationen der Liganden. Allerdings kann dies, abhängig von der Anzahl an Freiheitsgraden zu einer unlösbaren Aufgabe für die zur Zeit zur Verfügung stehenden Computersysteme werden. Somit müssen effiziente Suchmethoden entwickelt werden, die auch bei größeren Molekülen den Konformationsraum vollständig beschreiben.

Neben den systematischen Suchmethoden wurden Suchverfahren entwickelt, die den Rechenaufwand reduzieren. Zusätzlich zu dem oben beschriebenen genetischen Algorithmus, ist das MMC-Verfahren (*metropolis-monte-carlo*) und die MD-Simulation (*molecular dynamic*) eine häufig verwendete Methode. Das Programm GEGOP⁸⁶ (*geometry of glycoproteins*), das als Grundlage den MMC-Algorithmus verwendet, wurde speziell zum Abtasten des Konformationsraumes von Glycoproteinen entwickelt. Das hier verwendete klassisch-mechanische Kraftfeld besteht aus einem erweiterten HSEA-Kraftfeld^{86,87} (*hard sphere exo-*anomeric**) zur Beschreibung des Kohlenhydratteils und dem ECEPP/2-Kraftfeld⁸⁸ für den Proteinteil. Man erhält hierbei eine Verteilungsfunktion, die über eine Boltzman-Statistik, die freie Enthalpie der Moleküle liefert. Eine Populationsverteilung bestimmter Gruppen von Konformeren stellen dann die energetisch günstigsten Molekül-*Ensembles* dar und sind potentielle Kandidaten für weitere *docking*-Experimente.

3.2.5 Energiefunktionen

Zwei grundsätzliche Ansätze zeigen sich im *molecular modeling*. Während der erste Ansatz experimentelle Daten zur Vorhersage von Struktur und physikochemischen Eigenschaften der Moleküle verwendet, werden im zweiten Ansatz die physikalischen Naturgesetze als Grundlage zur Berechnung des molekularen Systems benutzt. Hierzu gehören die *ab initio*-, semiempirischen- und die Kraftfeldmethoden.

Die *ab initio* Verfahren sind nur für kleine Moleküle mit einer geringen Anzahl von Schweratomen geeignet. Biopolymere entziehen sich somit vollständig dieser Methode. Zu hoch wäre der Rechenaufwand. Dennoch gibt es Hybridverfahren, in denen die Bindungstasche quantenmechanisch und die Umgebung mit einem Kraftfeld berechnet wird.

$$E = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} \\ + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{nichtkovalent}}$$

$$E = \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungen}} K_b (b - b_0)^2$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungswinkel}} K_\theta (\Theta - \Theta_0)^2$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_{\text{Torsionswinkel}} K_\phi (1 + \cos(n\Phi - \delta))$$

$$+ \sum_{\text{nichtgebundene Atompaare}} (A_{ij} r_{ij}^{-12} - C_{ij} r_{ij}^{-6} + q_i q_j / D r_{ij})$$

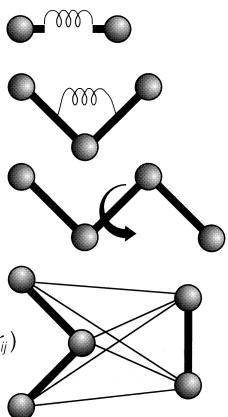


Abbildung 11: E ist die Gesamtenergie, die sich aus Einzelbeiträgen zusammensetzt. Der erste Term beschreibt die Energieänderung bei Dehnung und Stauchung einer kovalenten Bindung. Die Funktion entspricht einem harmonischen Potentials und hat die Form einer Parabel. b_0 ist die Gleichgewichtsbindungslänge und K_b die Kraftkonstante. Für den Bindungswinkel wird eine ähnliche Potentialfunktion verwendet - für das Torsionspotential eine cosinus-Funktion. Der letzte Term steht für die nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Die ersten beiden Ausdrücke bezeichnet man als Lennard-Jones-Potential und beinhalten die abstoßenden und anziehenden Kräfte. Im letzten Ausdruck werden die elektrostatischen Wechselwirkungen beschrieben.

Die Kraftfeldmethoden sind empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und Molekülenergien. Grundlage dieses Modells ist die Annahme, daß Bindungslängen und Bindungswinkel zwischen Atomen Standardwerte annehmen. Diese Standardwerte können Ergebnisse von quantenmechanischen Rechnungen sein oder werden direkt aus kristallographischen Daten gewonnen. Zusätzlich enthält ein Kraftfeld noch Terme für nicht-kovalente Wechselwirkungen und ein Term für die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien. Typische Kraftfelder – im Bereich der Biopolymere sind das z.B. CHARMM⁹⁹-, AMBER⁹⁰-, GROMOS⁹¹- und TRIPPOS⁹²-Kraftfeld.

3.2.6 Clusteranalyse

Konformationsanalysen, die den Konformationsraum abtasten, liefern zwar die energetisch günstigste Konformation - die Interpretation der Trajektorien ist aber oft schwierig. Für multivariate Probleme, wie die Korrelation von ähnlichen Konformationen mit vielen Freiheitsgraden, ist die hierarchische Clusteranalyse gut geeignet.

Ziel einer Clusteranalyse ist es nun, die Konformationen eines großen Datensatz in Familien ähnlicher Konformationen zusammenzuführen^{93,94}.

Ausgangspunkt ist ein Datensatz mit einer großen Anzahl von Konformationen. Sie werden Klassen zugeordnet, indem zwischen den einzelnen Konformationen ein Korrelationskoeffizient zwischen 0 und 1 berechnet wird. Diese Werte werden dann in einer $n \times n$ Matrix gespeichert. Die beiden Konformationen, die den höchsten Wert liefern, sind sich am ähnlichsten und werden zu einer neuen virtuellen Konformation zusammengefaßt. Den neuen Korrelationskoeffizient erhält man, indem von den beiden Ursprungskonformationen der jeweils schlechtere ausgewählt wird (*complete linkage*). Durch mehrfache Wiederholung erreicht man eine Einteilung der Ausgangsdaten in Gruppen.

Dabei entsteht ein sogenannter Clusterbaum, der sich auf einer Gruppe aufbaut und in umgekehrter Reihenfolge in die

Gruppen zerfällt. Man kann nun diesen Clusterbaum an verschiedenen Stellen aufschneiden und erhält so eine bestimmte Anzahl an Gruppen. Innerhalb der Gruppen bildet man die Mittelwerte der Winkel und erhält eine Verteilung und eine repräsentative Konformation der einzelnen Klassen.

Da man aufgrund der Größe der Ähnlichkeitsmatrix nicht alle Konformationen eines großen Datensatzes untersuchen kann, ist der hierarchischen Clusteranalyse noch eine Diskriminanzanalyse angeschlossen. Die Diskriminanzanalyse ist ein Klassifikationsverfahren, daß im Gegensatz zur Clusteranalyse kein strukturentdeckendes, sondern ein strukturprüfendes Verfahren darstellt. Die Diskriminanzanalyse hat also die Aufgabe bekannte Gruppen zu untersuchen, während die Clusteranalyse diese erzeugt.

Hierbei wird ausgehend von den erhaltenen Clusterzentren jedes Element des Datensatzes jenem Cluster zugeordnet, dem es am ähnlichsten ist. Die Zuweisung erfolgt über einen definierbaren Grenzwert für die Standardabweichung der geclusterten Winkel (Sigmaumgebung).

In dieser Arbeit wurde ein Programm benutzt, das im Rahmen einer Examensarbeit angefertigt wurde (CLAG, Clusteranalyse von Glycoproteinen, Vers.: 1.0)⁹⁵.

Problemstellung

4

4. Problemstellung

Am Ende der Entwicklung eines neuen Medikaments steht ein Pharmakon, das neben vielen Eigenschaften, wie der Spezifität, Wirksamkeit, Bioverfügbarkeit und Toxizität der Substanz, einen langen und kostenintensiven Forschungsprozeß durchlaufen hat. Einen großen Anteil an diesem Prozeß nimmt die Suche nach einer neuen Leitstruktur in Anspruch, die für eine bestimmte pharmakologische Wirkung verantwortlich ist. Mit großem Aufwand werden neue Verfahren zum sogenannten *screening* von Substanzen entwickelt.

Ein wichtiges biologisches *target* sind die Proteine, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Eine Klasse von Proteinen, die in der ersten Phase dieser Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung sind, sind die Selektine. Sie gehören zu den Zelladhäsionsmolekülen und stellen den ersten Kontakt zwischen Immunzellen und deren Wirkort her. Gerade bei heftigen Entzündungsprozessen kann die Immunreaktion selbst zum eigentlichen Grund für die massive Zerstörung des beteiligten Gewebes führen. Eine spezifische Blockade dieser Interaktion kann somit zur Unterdrückung einer Immunantwort führen und das betroffene Gewebe vor weiterer Degradierung schützen.

Das Ziel dieser Arbeit beinhaltet die Etablierung und Optimierung von NMR-gestützten *screening* Verfahren und die Anwendung von theoretischen Methoden zum *drug-Design*.

Ausgangspunkt für diese Untersuchung war eine Substanz-Bibliothek aus ca. 200 sulfatierten Trisacchariden. Die Komponenten der Trisaccharid-Bibliothek bestehen aus einem Lactose-*core*, der an allen relevanten Positionen zufallsfucosyliert und

zufallssulfatiert ist. Eine, oder mehrere Verbindungen dieser Bibliothek zeigten im biologischen Assay mikromolare Bindungskonstanten zum E-Selektin. Es war jedoch nicht möglich gewesen, die aktiven Komponenten durch klassische Verfahren oder Dekonvolution der Bibliothek zu bestimmen. Es sollte nun mit Hilfe von *tr*NOESY-Experimenten und der *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie (STD NMR) die bindenden Verbindungen identifiziert und charakterisiert werden. Auf theoretischer Seite sollte ein Bindungsmodell des natürlichen Liganden Sialyl-Lewis^x zum E-Selektin erstellt werden. Anschließend sollte in einem *De novo*-Design Prozeß eine virtuelle Substanz-Bibliothek erzeugt werden, die im wesentlichen den in den NMR-Experimenten verwendeten Verbindungen entsprach. Die Resultate sollten mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden und ein theoretisches Bindungsmodell der aktiven Komponenten erstellt werden. Hierbei kamen verschiedene theoretische Verfahren, wie Metropolis-Monte-Carlo-Simulationen (MMC) und eine multivariate Datenanalyse in Form einer Clusteranalyse zum Einsatz.

Ergebnisse und Diskussion

5

5. Ergebnisse und Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Nur die molekulare Beschreibung dieser Wechselwirkungsbeziehungen, kann Modelle zum Verständnis liefern. Darüber hinaus ist die Entwicklung und Anwendung von Testverfahren, die eine Identifizierung von Protein-bindenden Kohlenhydrat-Komponenten direkt aus Mischungen ermöglicht, von besonderem Interesse.

5.1 Die IgG/E-Selektin Chimäre

Die rekombinante deglycosyierte Variante ist eine IgG Chimäre, in der die Ectodomänen von humanem E-Selektin mit der Fc-Region eines humanen Antikörpers der Klasse G1 kombiniert wurde^{50,71}. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 220 kDa und zwei Ligand-Bindungsstellen. Für die NMRspektroskopischen Untersuchungen wurde das calciumabhängige Fusionsprotein in einem Calciumchlorid/D₄-Imidazol-Puffer gelöst.

5.2 Die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek

Ausgangspunkt für die Bindungsstudien war eine sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek, die ca. 200 Komponenten enthält und von Ole Hindsgaul zur Verfügung gestellt wurde. Die Besonderheit dieser Bibliothek ist, daß eine oder mehrere ihrer Komponenten eine hohe Bindungsaktivität ($K_D = 1 \cdot 10^{-6}$ [M]) gegenüber dem E-Selektin gezeigt haben. Diese hohe Bindungsaktivität ging jedoch nach der Dekonvolution der Bibliothek wieder verloren⁹⁶. Somit war das Ziel, eine Methode zu entwickeln, die diese Bibliothek in ihrer Gesamtheit auf Bindungsaktivität zerstörungsfrei untersucht. Ausgehend von einem Lactosecore mit einem aromatischen C₈-spacer wurde die Bibliothek über einen kombinatorischen Ansatz hergestellt (Abb. 12). Es wurde eine Sulfatgruppe, als Ersatz für die im natürlichen Liganden (Sialyl-Lewis^x) enthaltene Sialinsäure und ein Fucose-Rest an allen möglichen Positionen der Lactose eingeführt. Anhand eines MALDI-TOF Spektrums ist jedoch zu erkennen, daß nicht nur die monosulfatierten Verbindungen entstanden sind, sondern auch di- und tri-Sulfate vorkommen.

Bei insgesamt ca. 200 Verbindungen und mit einer Gesamtmenge von 7.7 mg ergeben sich bei einer äquimolaren Verteilung pro Komponente 46.68 pmol sulfatiertes Trisaccharid.

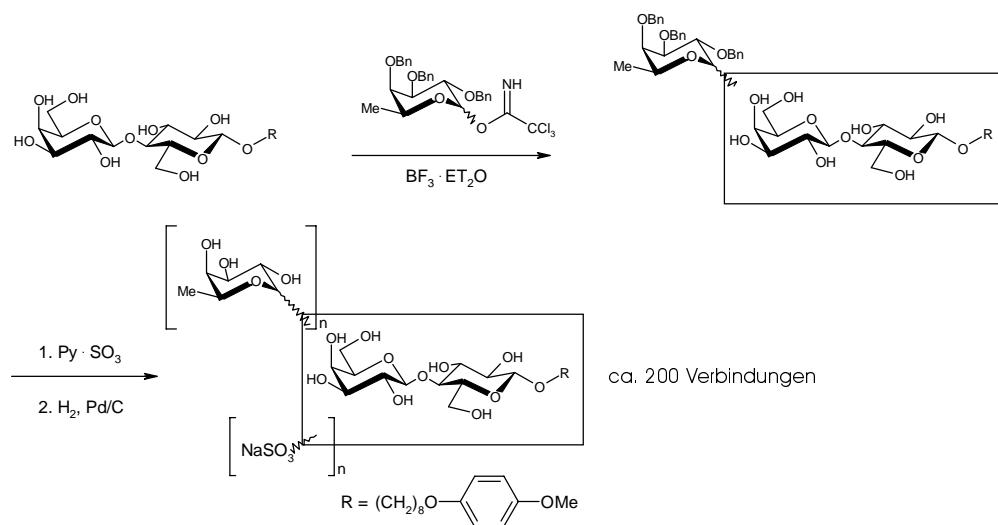


Abbildung 12: Syntheseweg der zufallssulfatierten und zufallsfucosierten Trisaccharid-Bibliothek. PMP: Paramethoxyphenyl. $n = 1-x$. Bn = Benzyl

5.3 NMR-Experimente der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek

Bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen wird in der Regel das Protein vorgelegt. Der Ligand wird dann zum Protein titriert, um ein für die NMR-Spektroskopie optimales Protein-Ligand-Verhältnis zu erhalten. In dieser Arbeit war jedoch nicht die Proteinmenge der limitierende Faktor, sondern die Substanzmenge

der Trisaccharid-Bibliothek. Somit wurden alle NMR-Experimente mit der gesamten Substanz-Bibliothek durchgeführt und das E-Selektin portionsweise zugegeben.

5.3.1 ^1H -NMR-Experimente

Das E-Selektin und die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek wurden zunächst einzeln vermessen. Zusätzlich wurde ein Spektrum des Proteins mit einem *spinlock*-Puls von 10 ms nach dem 90° -Puls aufgenommen.

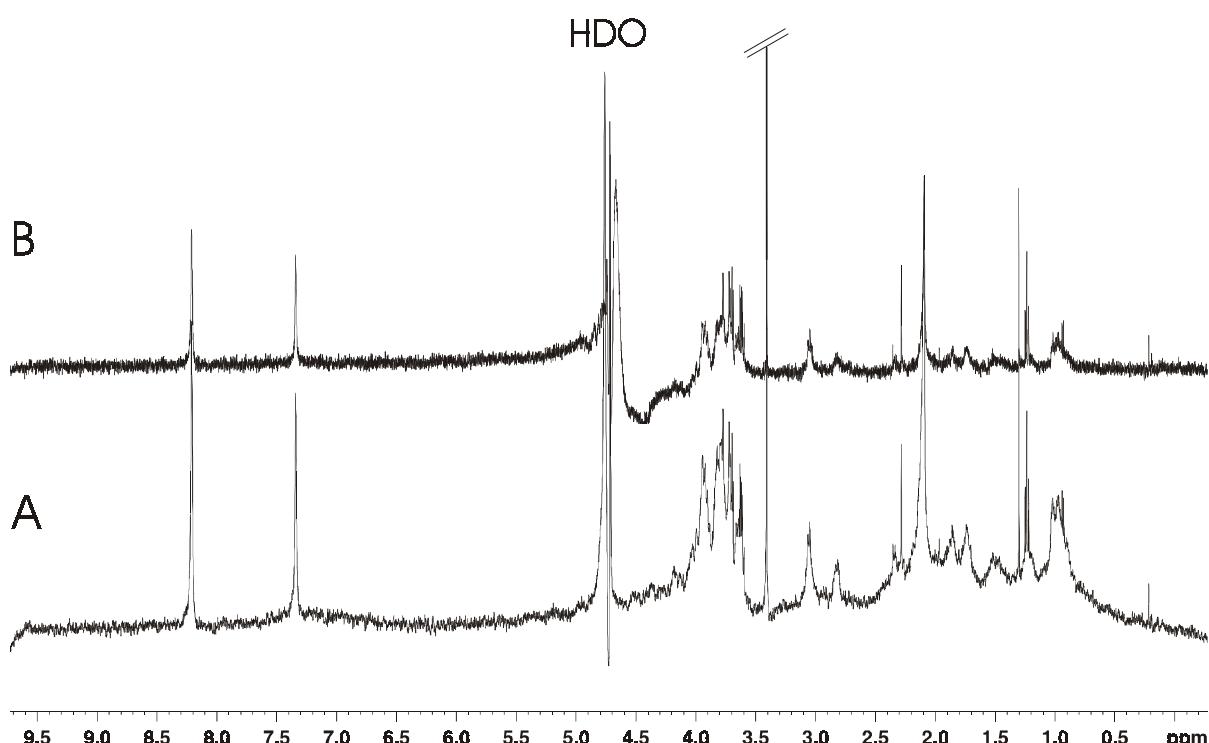


Abbildung 13: ^1H -NMR-Spektren des deglycosylierten E-Selektin bei 310 K in $\text{D}_2\text{O}/\text{Imidazol-D}_4$ Puffer. A: ^1H -NMR-Spektrum mit Wasserunterdrückung (CW-Vorsättigung, 8 scans). B: ^1H -NMR-Spektrum mit Wasserunterdrückung und *spinlock*-Puls nach dem 90° -Puls (8 scans). Neben den breiten Proteinresonanzen sind Lösungsmittelsignale zu erkennen. Resonanzen von unbeweglichen Molekülteilen werden aufgrund schneller T_2 -Relaxation durch den *spinlock*-Puls reduziert.

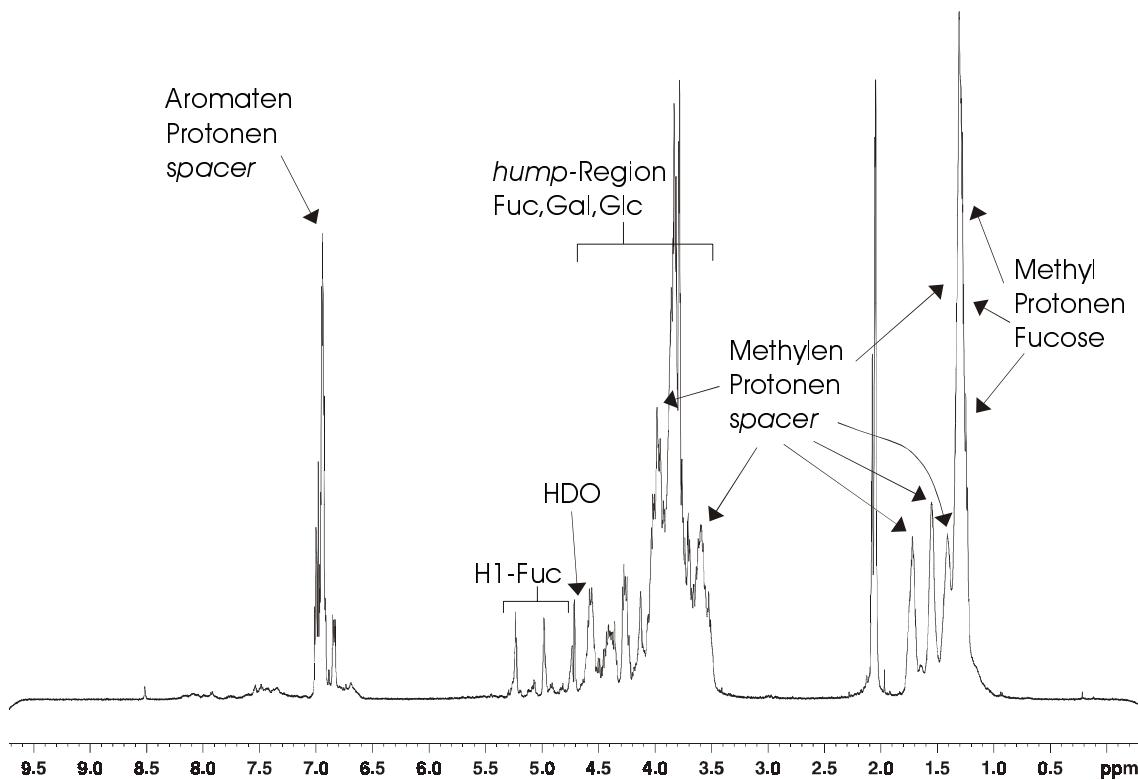


Abbildung 14: ^1H -NMR-Spektrum der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek bei 310 K in D_2O /Imidazol- D_4 Puffer. Neben der *hump*-Region der Fucose, Galactose und Glucose sind Resonanzen des *spacers* im Aromatenbereich und der Methylen-Protonen zu erkennen. Im Bereich von 4.8 ppm bis 5.3 ppm liegen die Signale der H1-Protonen und bei 1.24 ppm bis 1.39 ppm die der Methyl-Protonen der Fucose.

Das deglycosyierte E-Selektin zeigt für Proteine ein typisches Protonen-Spektrum. Aufgrund der Molekülmasse von 220 kDa sind die NMR-Resonanzen stark verbreitert. Es sind die Resonanzen der H^α -Protonen ($\text{H}^\alpha = 3.9 - 4.75$ ppm) sowie die Signale der Aminosäureseitenketten-Protonen $\text{H}^{\beta,\gamma,\delta,\varepsilon}$ -Protonen zu erkennen ($\text{H}^\beta = 1.4 - 4.2$ ppm, $\text{H}^{\gamma,\delta,\varepsilon} = 0.9 - 3.7$ ppm). Die aromatischen Protonen liefern einen breiten Bereich von 7.0 – 9.0 ppm. Offensichtlich ist das Protein nicht vollständig deglycosyliert, da auch das Spektrum mit *spinlock*-Filter noch nennenswert Signale im Bereich der Kohlenhydrat-Ringprotonen (3.5 – 4.0 ppm) zeigt. Zusätzlich sind schmale Signale von Lösungsmittel-Verunreinigungen wie Chloroform, Dimethylformamid, Methanol, Aceton und Acetonitril zu sehen.

Im ^1H -Spektrum der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek kann man verschiedene Bereiche unterscheiden. Dazu gehören eine wenig dispergierte und durch Signalüberlagerungen geprägte *hump*-Region der Fucose-, Galactose- und Glucose-Protonen (3.4 – 3.6 ppm). Ein Bereich, in dem die H1-

Protonen der Fucose liegen (4.84 – 5.46 ppm) und ein Bereich der Methyl-Protonen der Fucose (1.24 - 1.32 ppm). Weitere Resonanzsignale, der aromatischen- und Methylen-Protonen des C_8 -*spacers* findet man bei 6.8 - 7.02 ppm und respektive bei 1.31 - 4.02 ppm.

Zur weiteren Analyse der chemischen Verschiebungen der Protonen wurden 2D-TOCSY- und 2D-NOESY-Experimente durchgeführt.

5.3.2 ^1H -Resonanzsignale der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek

Eine komplette Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung aller Komponenten der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek war nicht möglich. Die große Anzahl an Verbindungen (ca. 200 Moleküle) führte zu stark überlagerten NMR-Spektren. Zusätzlich zeigen die verschiedenen Verknüpfungsvarianten keine einheitliche Verteilung innerhalb der Mischung. Die 1-3-Fucosyl-

lactose ist z.B. nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden (ca. 1/20 von der Menge der 1-6-Fucosyl-lactose). Das heißt, daß diese Komponente selbst bei hoher Bindungsaktivität keine STD Signale liefern kann. Da jedoch die Kenntnis der Position der Fucose und der Sulfatgruppe am Lactosecore der bindenden Komponenten essentiell ist, müssen die für die jeweiligen Verknüpfungsvarianten charakteristischen chemischen Verschiebungen ermittelt werden. Hierfür bieten sich mehrere Molekülfragmente an. Die H1-Protonen der Fucose liegen außerhalb der *bump*-Region des Trisaccharids und überstreichen, abhängig von der Position der Verknüpfung, einen Bereich von 4.842 - 5.462 ppm. Ebenfalls sind die ¹H-chemischen Verschiebungen der H5-Protonen der Fucose gegenüber dem Verknüpfungsmuster empfindlich (3.776 - 4.971 ppm).

H1 [ppm] α -L-Fucose	H2,3,4,5, CH ₃ [ppm] α -L-Fucose	Verknüpfungs-Muster der α -L-Fucose
5.462	3.878 H2	α -1-3
5.308	3.815 H2	α -1-2'
5.308	4.034 H3	α -1-2'
5.300	3.900 H3, H4	α -1-2'
5.280	3.907 H3, H4	α -1-2'
5.266	3.813 H2	α -1-2'
5.250	1.279 CH ₃	α -1-2'
5.250	3.819 H2	α -1-2'
5.240	1.279 CH ₃	α -1-2'
5.240	3.844 H2	α -1-2'
5.240	3.995 H3	α -1-2'
5.240	4.235 H5	α -1-2'
5.200	3.815 -*	-*
5.129	3.886 H2, H3, H4	α -1-2
5.117	3.850 H2, H3, H4	α -1-2
5.091	3.871 H2	α -1-3'
5.091	3.935 H3, H4	α -1-3'
5.091	4.083 H3, H4	α -1-3'
5.091	4.357 H5	α -1-3'
5.073	1.259 CH ₃	α -1-2
5.073	3.844 H2	α -1-2
5.073	3.966 H3	α -1-2
4.994	1.280 CH ₃	α -1-6
4.994	3.833 H2, H3	α -1-6
4.994	3.926 H4	α -1-6
4.994	4.151 H5	α -1-6
4.842	1.259 CH ₃	-*
4.842	4.053 -*	-*
4.842	3.623 -*	-*
4.842	3.507 -*	-*

Tabelle 6: ¹H-chemische Verschiebungen der α -L-Fucose aus einem TOCSY-Spektrum der Trisaccharid-Bibliothek. Die Zuordnung der Position der Fucose am Lactose-core ist einer *online* Datenbank mit chemischen Verschiebungen entnommen (sugabase)⁹⁷. Die mit einem Sternchen markierten Einträge konnten nicht bestimmt werden.

Nicht alle Verknüpfungsvarianten konnten den ¹H-chemischen Verschiebungen zugeordnet werden. Für die α -1-6-, α -1-4' und α -1-4-Position der Fucose lagen keine Daten vor. Zusätzlich wurden die NMR-Resonanzen der H5-Protonen der Fucose ermittelt.

H5 [ppm]	CH ₃ [ppm]	³ J _{H,H} [Hz]	Verknüpfungs-muster
4.109	1.245	5.9	α -1-6
4.912	1.248	6.2	α -1-3
4.971	1.296	6.5	α -1-3
4.838	1.264	6.6	α -1-3
4.454	1.279	6.7	α -1-2'
4.365	1.286	6.6	α -1-2'
4.237	1.281	6.7	α -1-2
4.184	1.311	7.4	α -1-6
4.163	1.392	7.6	α -1-6
4.132	1.292	7.2	α -1-6
4.151	1.269	6.4	α -1-6
3.776	1.311	7.0	β -1-2
3.835	1.323	6.8	β -1-2

Tabelle 7: ¹H-chemische Verschiebungen und ³J_{H,H} der H5-CH₃ Fucose-Kreuzsignale aus einem TOCSY-Spektrum der Trisaccharid-Bibliothek. Die Zuordnung der Position der Fucose am Lactose-core ist einer *online*-Datenbank entnommen (sugabase)⁹⁷.

Die Resonanzen der H5-Protonen der Fucose überstreichen einen Bereich von 3.835 - 4.109 ppm. Es sind nur die Kreuzsignale berücksichtigt, die eindeutig zuzuordnen waren. Weiteres Kriterium für die Zuordnung waren die ³J-Kopplungskonstanten, die für die H5-CH₃ Kopplung im Bereich von 6 Hz bis 7 Hz liegen.

5.3.3 Relaxationszeiten

Die longitudinale- und die transversale Relaxationzeit sind NMR-Größen, die direkt von der Molekülgröße bzw. von der molekularen Beweglichkeit abhängig sind. Bindende Liganden sollten aufgrund ihrer reduzierten Beweglichkeit im Komplex eine kürzere T₂-Relaxationszeit besitzen. Nichtbinder verändern ihr Relaxationsverhalten nicht. Die T₂-Relaxationszeitmessungen wurden mit der CPMG-Pulssequenz aufgenommen. Das Ligand/Protein-Verhältnis lag bei 11.6/1. Das Differenzspektrum C in Abbildung 16 wurde durch Subtraktion von Spektrum B von A erhalten.

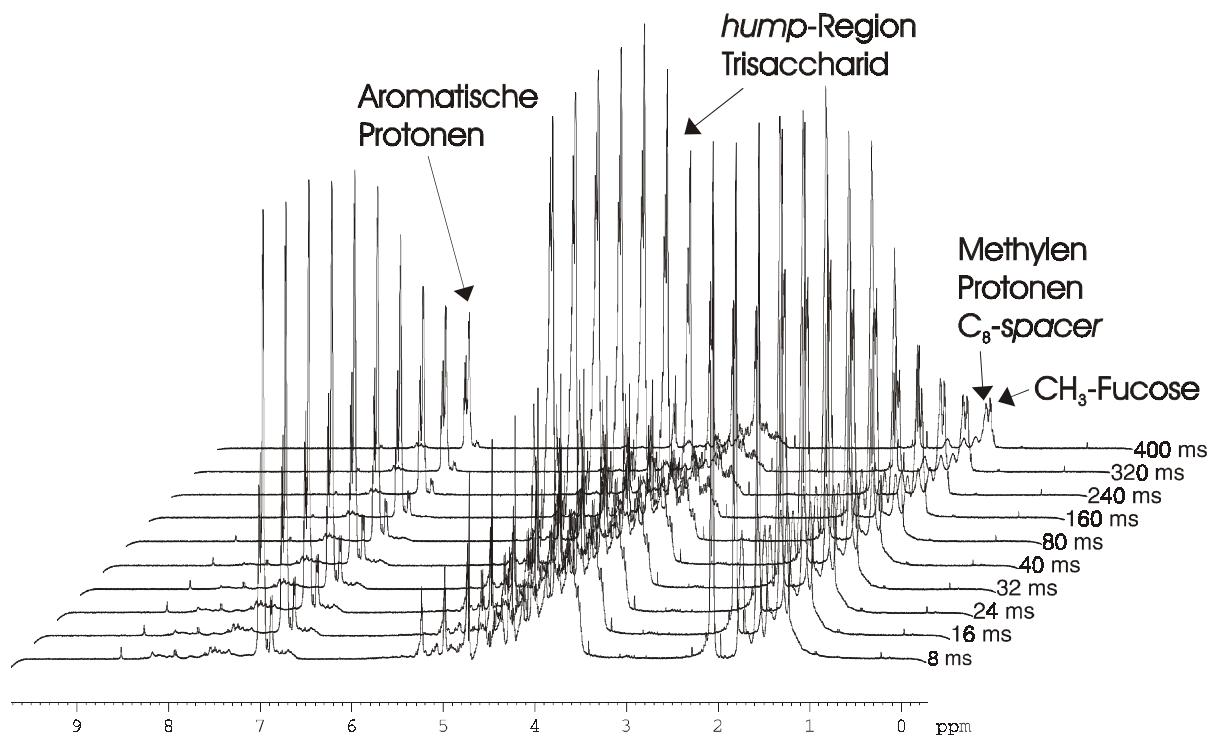


Abbildung 15: *Stacked plot* von ^1H -NMR-Spektren der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek mit dem E-Selektin. Die 1D-Spektren wurden mit der CPMG-Pulssequenz aufgenommen. Die Notierung rechts neben den Spektren steht für den Zeitraum in der die T_2 -Relaxation wirksam ist.

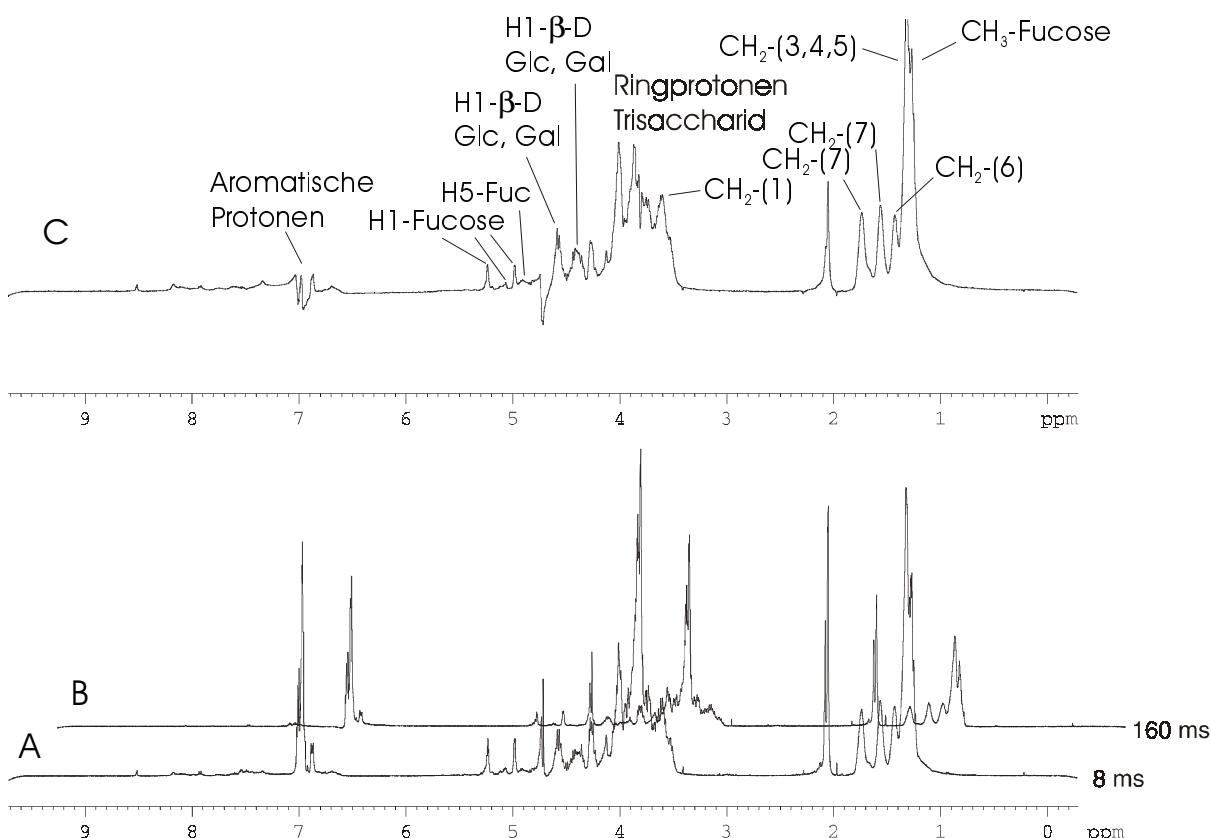


Abbildung 16: A und B zeigen Protonen-Spektren der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek mit dem E-Selektin (8 ms und 160 ms *delay*). C ist das Differenzspektrum von A und B. Das Spektrum B wurde vor der Differenzbildung mit einem Faktor von 1.6 multipliziert.

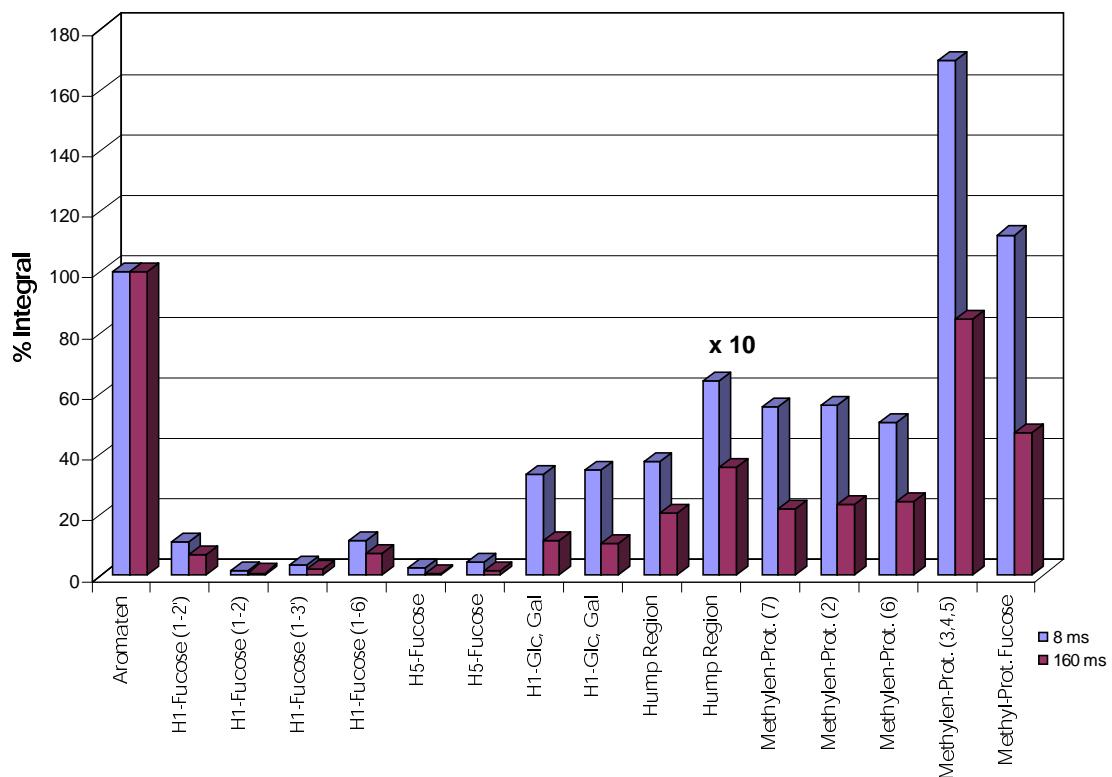


Abbildung 17: Säulendiagramm der Integrale aus verschiedenen Bereichen der ^1H -Spektren mit unterschiedlichen *delays* (8 ms und 160 ms). Die Integrale im Aromatenbereich wurden für beide Spektren auf 100 % normiert.

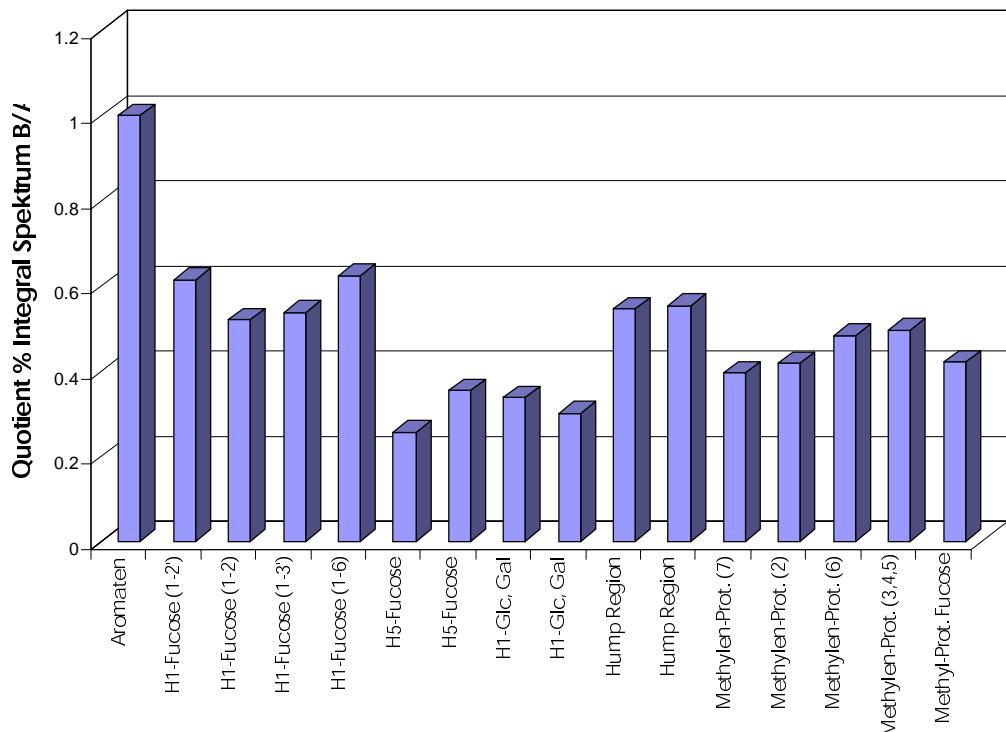


Abbildung 18: Säulendiagramm der Quotienten aus den Integralen von Spektrum B und A. Das Integral der Aromaten wurde für beide Spektren auf 100 % normiert. Je kleiner der Quotient der Integrale ist, desto schneller relaxieren die Protonen.

Ziel war es, verschiedene Bereiche der Moleküle auf ihr Relaxationsverhalten zu untersuchen. Vor der Differenzbildung von Spektrum B mit A wurde das Spektrum B mit einem Faktor von 1.6 multipliziert. Als Kriterium für die Skalierung dienten die aromatischen Protonen. Sie sollten nach der Subtraktion nahezu kein Signal mehr zeigen. Dies bedeutet, daß alle anderen Molekülfragmente, die nach der Differenzbildung noch Signale liefern, schneller relaxieren als die aromatischen Protonen und somit kontakt zum Protein haben sollten. In Abbildung 17 sind die Werte der Integrale in Prozent dargestellt. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 18 nur die Quotienten der Integrale von Spektrum B und A gezeigt. Dieser Quotient ist ein Maß für die Relaxation der Protonen relativ zu den aromatischen Protonen. Je kleiner der Quotient ist, desto schneller relaxieren die Protonen.

Die aromatischen Protonen zeigen das langsamste Relaxationsverhalten. Besonders schnell relaxieren die H5-Protonen der Fucose (ca. Faktor drei bis fünf gegenüber den aromatischen Protonen) und die H1-Protonen der Glucose und der Galactose. Gefolgt von den Protonen des C₈-*spacers* und der Methylgruppe der Fucose. In einem mittleren Bereich liegt die *hump*-Region und die H1-Protonen der Fucose (ca. Faktor zwei). Da Nichtbinder und Binder in der Mischung gleichzeitig vorliegen und die NMR-Resonanzen stark überlagert sind, ist der Anteil an schnell relaxierenden Protonen aufgrund von Bindung am Protein relativ gering. Eine Differenzierung zwischen bindenden und nichtbindenden Komponenten ist somit nicht eindeutig vorzunehmen. Nimmt man jedoch an, daß dennoch ein Teil der Magnetisierung durch schnelle T₂-Relaxation verloren geht, ist die Fucose am stärksten gebunden gefolgt von der Glucose, der Galactose und dem C₈-*spacer*. Der Aromat trägt am wenigsten zur Bindung bei.

5.3.4 1D STD NMR-Experimente

Die bisherigen Ergebnisse ergaben nur eine grobe Vorstellung über die Komponenten, die an dem E-Selektin binden. Für die weitere Untersuchung wurden STD

NMR-Experimente durchgeführt, in denen das Ligand/Protein-Verhältnis bei 8.7/1 lag.

Zunächst galt es, die NMR-Parameter wie Einstrahlposition der Vorsättigung, Dauer der Vorsättigung und die Pulsscharakteristik der Vorsättigung zu ermitteln. Weiterhin mußte geklärt werden, ob eine interne Differenzbildung über geeignete Phasenzyklen erfolgt oder über Subtraktion der prozessierten Spektren ein befriedigendes Ergebnis liefert. Dafür wurden eine Reihe von ¹H STD NMR-Experimente aufgenommen.

Für die Wasserunterdrückung wird im einfachsten Fall eine CW-Vorsättigung (*continuous wave*) verwendet. Analog wurde zunächst diese Methode der Vorsättigung gewählt. Es zeigte sich jedoch, daß mit einer schnellen Abfolge von selektiven Pulsen (Gauss-Pulse) eine effektivere und flexiblere Anregung möglich war. Ein weiterer Punkt war die Stärke bzw. die Dauer der Vorsättigung und die Einstrahlposition. Hier ist zwischen der Sättigung des Proteins (*on resonance*) und der Position, in der keine Anregung des Proteins erfolgt (*off resonance*), zu unterscheiden. Diese *off resonance* Anregung ist notwendig, da es sich hier um eine Differenzmessung handelt, deren Pulsfolgen identisch sein müssen, um Artefakte zu vermeiden. Die Differenzspektren wurden durch einen Phasenzyklus erhalten, der nacheinander das FID der *off resonance* Vorsättigung von dem der *on resonance* Vorsättigung subtrahiert.

Die Dauer und Stärke der selektiven Pulse konnte anhand der Intensität der STD Signale optimiert werden. Die Pulssstärke wurde typisch für selektive Pulse mit schmaler Anregungsbreite auf 40 dB gesetzt, die Pulslänge auf 50 ms. Zwischen den Gauss-Pulsen wurde ein *delay* von 1 ms verwendet. Eine Gesamtsättigungsdauer von 2.04 Sekunden mit 40 Gauss-Pulsen erwies sich als ausreichend. Eine weitere Verlängerung der Anregung ergab keine wesentliche Intensitätssteigerung.

Die Stärke und die Einstrahlposition mußten so gewählt werden, daß Ausläufer der breiten Resonanzen des Proteins angeregt werden, die Resonanzen der Moleküle der Bibliothek jedoch keine direkte Sättigung erfahren. Die *off resonance* Position wurde bei

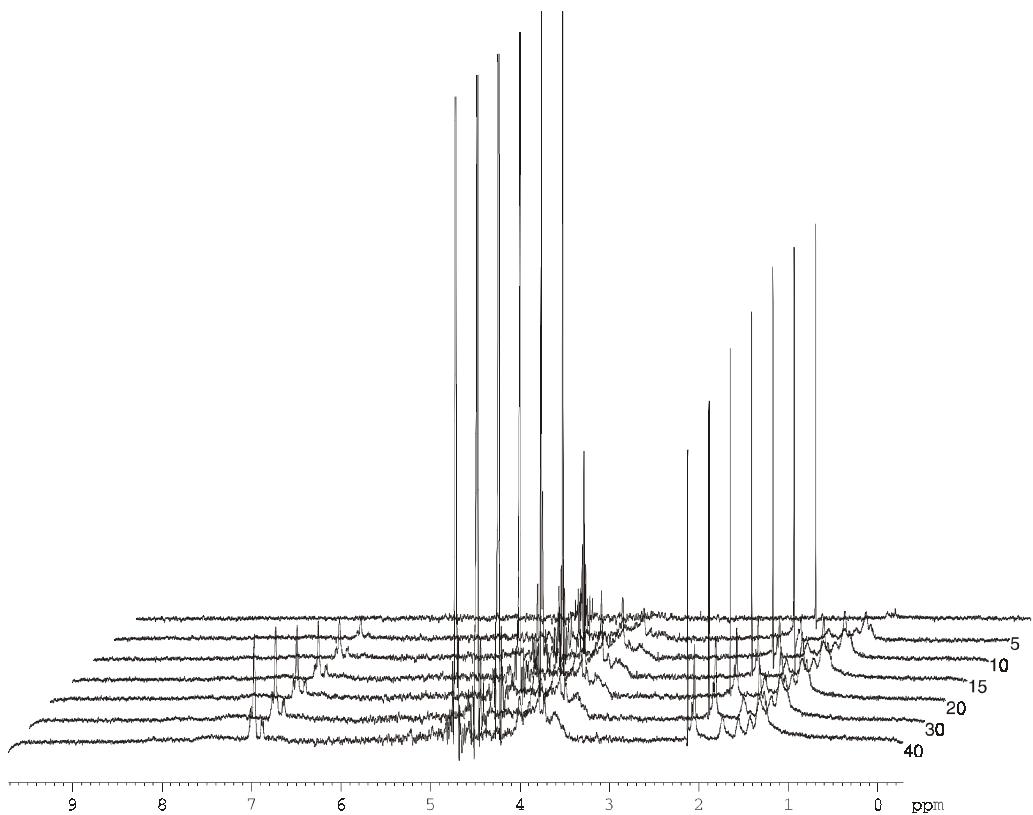


Abbildung 19: *Stacked plot* der ^1H -STD Spektren. Die Zahlen rechts neben den Spektren symbolisieren die Anzahl der Gauss-Pulse.

20000 Hz festgelegt. Damit ist sichergestellt, daß keinerlei Protonen angeregt werden. Die Sättigung des Proteins erfolgte hochfeldig bei -3000 Hz. Nachfolgend sind ^1H STD NMR-Spektren mit unterschiedlicher Sättigungszeit dauer gezeigt.

Der Intensitätsverlauf der Resonanzen näherte sich bei 2 Sek. Vorsättigungszeit dem Gleichgewichtsbereich (Abb. 20).

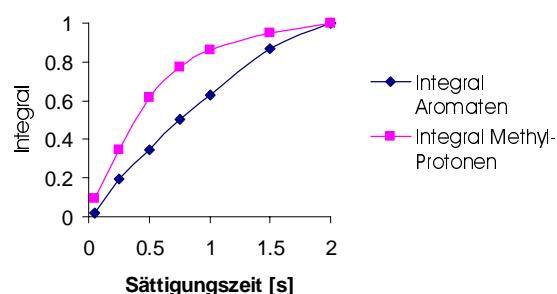


Abbildung 20: Vergleich zwischen den Integralen der aromatischen- und der Methyl-Resonanzen in den ^1H STD NMR-Spektren mit unterschiedlicher Sättigungszeit. Die Integrale wurden für die Experimente mit zwei Sekunden Sättigungszeit auf 1 normiert.

Eine weitere Verlängerung würde zwar noch eine geringe Steigerung bedeuten,

allerdings würde sich auch die Messzeit verlängern, so daß als Kompromiß für alle weiteren Experimente 40 Gauss-Pulse verwandt wurden. Die Überprüfung der Einstrahlposition erfolgte mit Differenzspektren, in denen der Anregungsbereich nicht verändert wurde. Es sollten sich Differenzspektren ergeben, die eine nahezu glatte Basislinie besitzen. Nur sehr kleine Moleküle, wie Wasser und Lösungsmittelverunreinigungen, die ein langes Relaxationsverhalten besitzen, werden nicht vollständig abgezogen.

Daneben sind Spektren gezeigt, die nur jeweils bei 20000 Hz und bei -3000 Hz vorgesättigt wurden und in denen kein 90° Auslesepuls verwendet wurde (Abb. 21, D und E). Bei diesen Experimenten erfolgte keine Differenzbildung. Die Spektren zeigen im Idealfall keine Signale, da die Vorsättigung zu einer nicht kohärenten Magnetisierung führt. Nur das Wasser ergibt ein Signal. Somit ist sichergestellt, daß die Spektren der STD Experimente keine Artefakte der Vorsättigung mit selektiven Gauss-Pulsen sind.

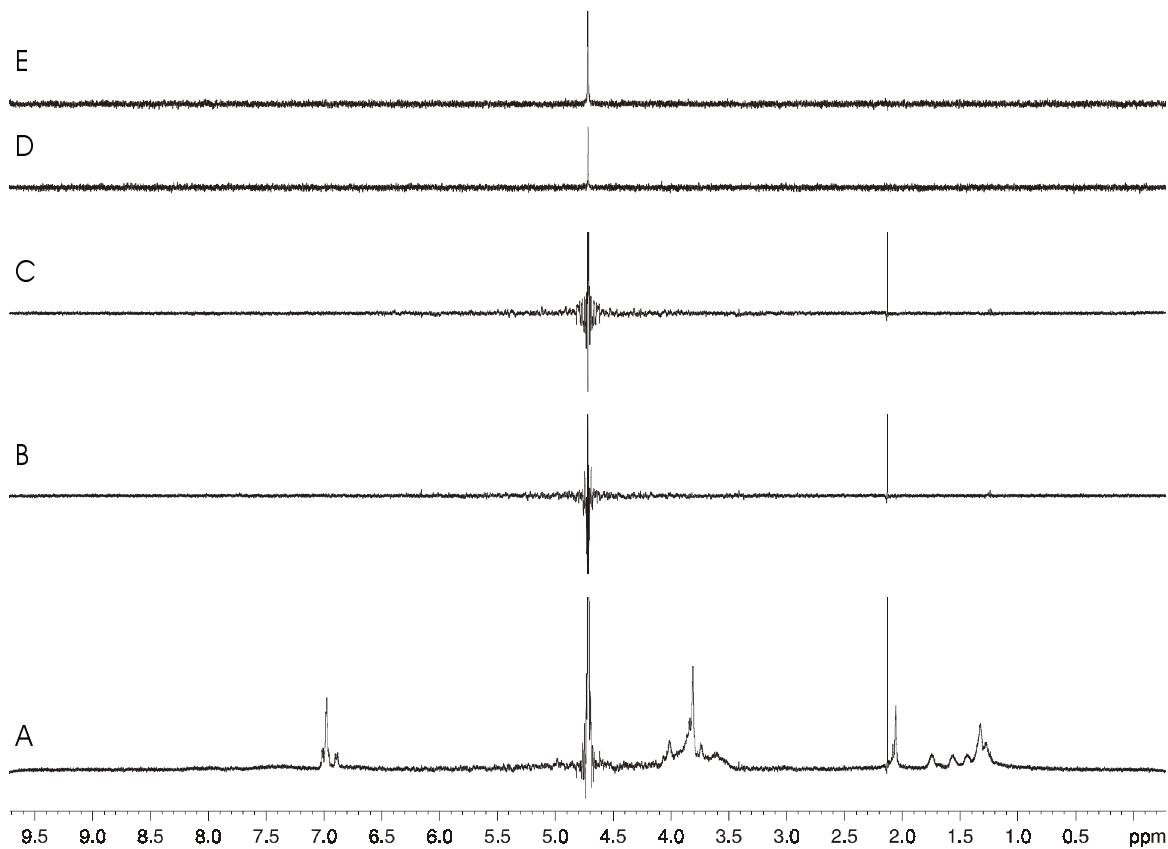


Abbildung 21: Protonenspektren der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek mit dem E-Selektin (Mischungsverhältnis: Ligand/Protein 8.7/1). Alle Spektren wurden mit 1600 scans aufgenommen A: ^1H STD Spektrum (off resonance: 20000 Hz, on resonance: -3000 Hz). B: ^1H STD Spektrum (off resonance: 20000). C: ^1H STD Spektrum (-3000 Hz). D: ^1H -Spektrum nur mit Vorsättigung (off resonance: 20000 Hz). E: ^1H -NMR-Spektrum nur mit Vorsättigung (on resonance: -3000 Hz).

Unter Berücksichtigung der Optimierungen der NMR-Parameter wurde zusätzlich ein *spinlock*-Feld von 10 ms mit einer Abschwächung von 10 dB orthogonal zur transversalen Magnetisierung verwendet um die Proteinresonanzen zu unterdrücken. Im Experiment ohne *spinlock*-Filter sind die Resonanzen des Proteins deutlich zu erkennen. Das Protein erfährt somit eine effektive Sättigung. In Abbildung 22 sind ein ^1H NMR-Spektrum (A) und ein ^1H STD NMR-Spektrum mit *spinlock* (C) und ohne *spinlock* (B) gezeigt. Durch den *spinlock*-Filter in Spektrum C werden die Protein-Resonanzen deutlich reduziert. Die STD Signale verlieren jedoch aufgrund von T_2 -Relaxation an Intensität.

Vergleicht man die STD Spektren mit dem normalen eindimensionalen Protonen-Spektrum, so fällt auf, daß die Topologie der Resonanzen ähnlich ist. Nur die Intensitäten der Signale unterscheiden sich. Das Integral der Resonanzen der *hump*-Region beträgt im

STD Spektrum mit *spinlock*-Feld ca. 1 % von denen im ^1H NMR-Spektrum. Vergleicht man die relativen Unterschiede, so ergeben sich für unterschiedliche Bereiche der Moleküle und für verschiedene Spezies Differenzen in den Integralen.

Um die einzelnen Bereiche der Spektren zu untersuchen, wurden die Verschiebungsbereiche der Relaxationszeit-Messungen verwendet. Auch hier wurden die Integrale der Aromaten auf eins normiert. Im Vergleich ergibt sich, relativ zu dem Integral der aromatischen Protonen des ^1H -NMR-Experiment, daß die Integrale der H-5 Protonen der Fucose und die H-1 Protonen der Glucose, Galactose und Fucose im STD Spektrum am größten sind. Im Bereich der H1-Protonen der Fucose, zeigen die Signale der 1-6 und der 1-2' Verknüpfung die stärksten Signale. Die intensivsten Signale, innerhalb des C_8 -*spacers*, sind die Methylen-Protonen in der 7-Position.

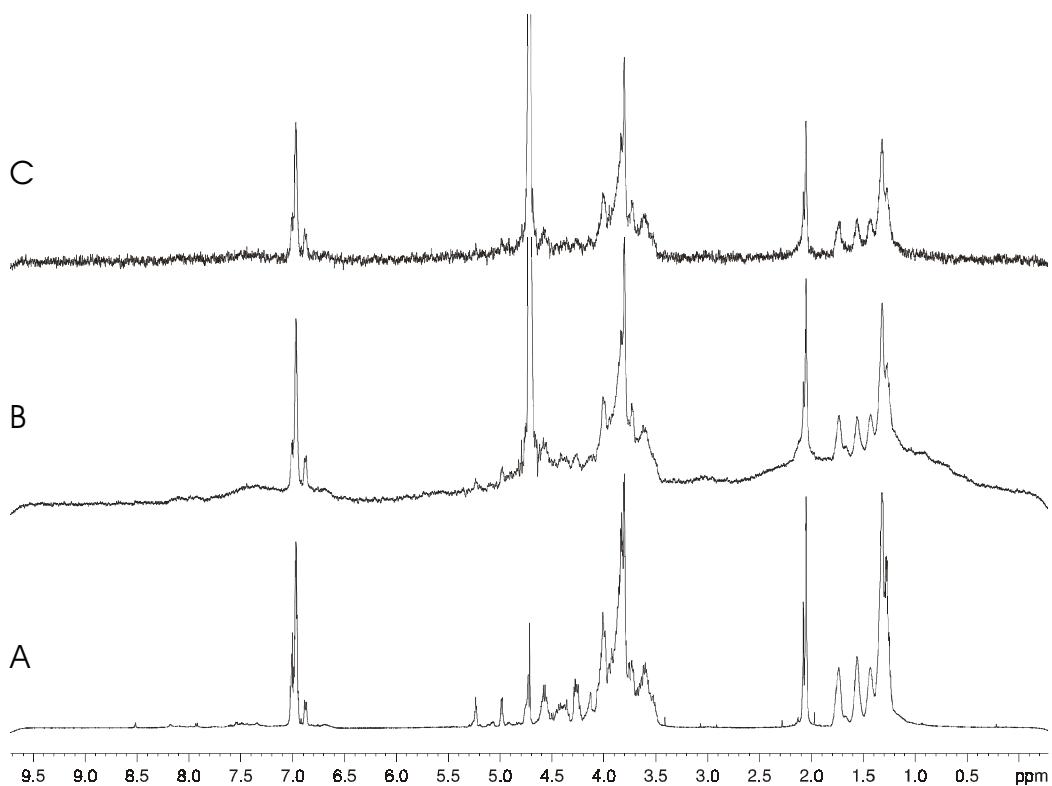


Abbildung 22: A: ^1H -NMR-Spektrum der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek mit dem E-Selektin (7.4/1, 640 scans). B: ^1H -STD NMR-Spektrum ohne *spinlock*-Filter (3200 scans). C: ^1H -STD NMR-Spektrum mit *spinlock*-Filter (3200 scans).

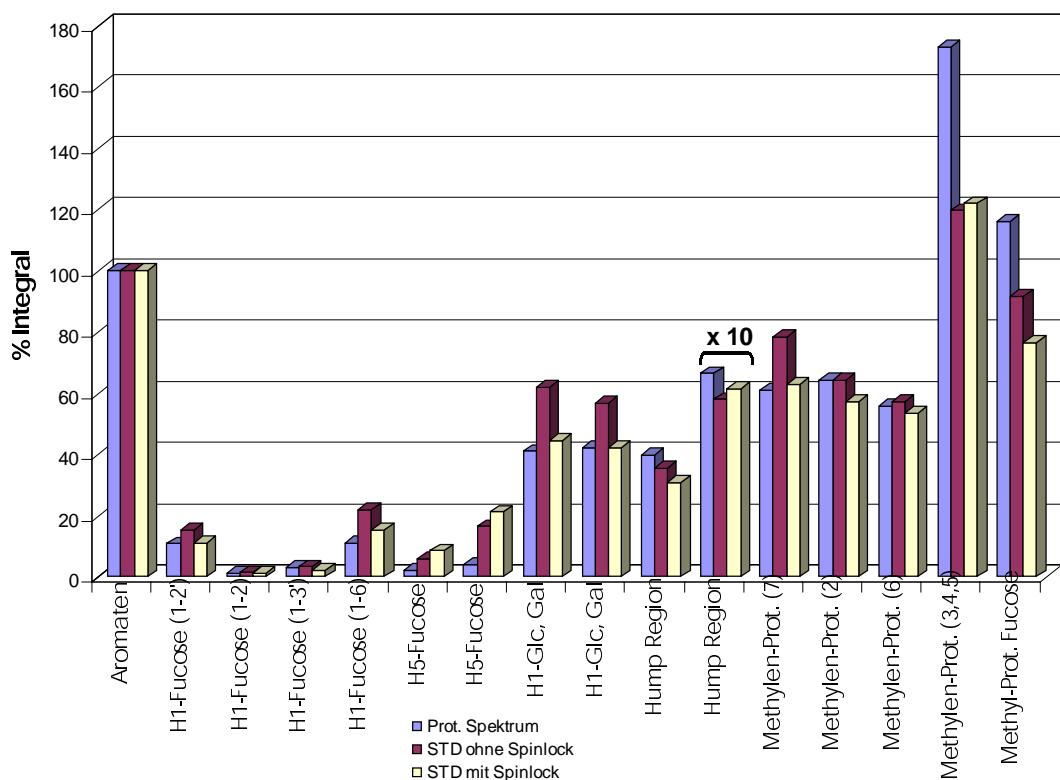


Abbildung 23: Säulendiagramm der Integrale aus verschiedenen Bereichen des ^1H -Spektrums (A) und der STD Spektren, ohne (B) und mit *spinlock*-Filter (C). Die Integrale im Aromatenbereich wurden für alle Spektren auf 100 % normiert.

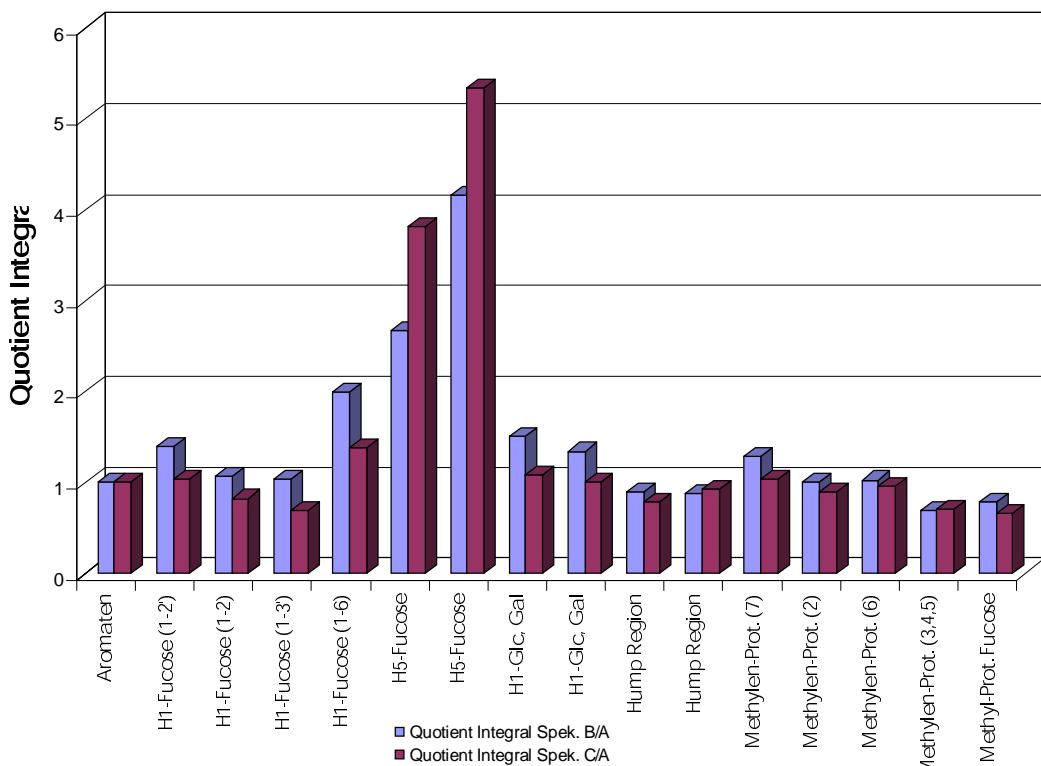


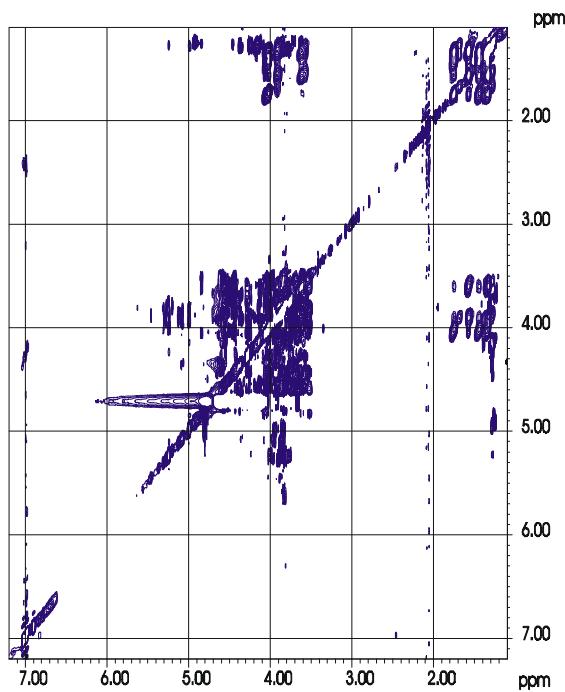
Abbildung 24: Säulendiagramm der Quotienten aus den Integralen von Spektrum B und A und von Spektrum C und A. Das Integral der Aromaten wurde für alle Spektren auf 100 % normiert.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Fucose, explizit die 1-6 und die 1-2' verknüpfte Variante, die stärksten STD Signale liefern. In Übereinstimmung mit den Relaxationsdaten ist die Beteiligung der H-5 Protonen der Fucose an der Bindung besonders ausgeprägt. Die H-1 Protonen der Glucose und Galactose weisen aufgrund ihrer kürzeren T_2 -Relaxationszeiten und stärkeren STD Signale ebenfalls auf eine Beteiligung an der Bindung zum E-Selektin hin. Aufgrund der Tatsache, daß Resonanzen von Binder und Nichtbinder sich überlagern, ist keine eindeutige Identifizierung des bindenden Liganden möglich. Auch die Position der Sulfatgruppe von der oder den aktiven Komponenten konnte bisher nicht geklärt werden. Die 1-3-Fucosyl-lactose, die den Grundkörper des natürlichen Liganden Sialyl-Lewis^x darstellt, konnte als Bindungspartner in den NMR-Experimenten nicht wiedergefunden werden. Es ist anzunehmen, daß die geringe Konzentration dieser Komponente, keinen spektroskopisch nachweisbaren Bindungseffekt liefert. Zur weiteren Analyse wurde das STD Verfahren auf zweidimensionale NMR-Experimente ausgeweitet.

5.3.5 2D STD NMR-Experimente

Prinzipiell sollte das STD Verfahren auf eine Vielzahl von NMR-Experimenten anzuwenden sein. Besonders bei überlagerten Signalen bieten zweidimensionale Experimente gegenüber 1D Verfahren erhebliche Vorteile. Limitierend sind jedoch Faktoren wie die Kinetik der Assoziation und Dissoziation, die Länge der Pulssequenzen, die Empfindlichkeit des NMR-Experiments und die Konzentration und das Mischungsverhältnis des Proteins und der Liganden. Da die Kinetik und die Stärke der Bindung nicht genau bekannt war und die Konzentration der Liganden gering war, sind nur schwache STD Signale in den 2D-NMR-Experimenten zu erwarten. Am erfolgreichsten erwies sich das STD TOCSY-Experiment, dessen Parameter für die Vorsättigung vom ^1H STD Experiment übernommen wurde. In folgender Abbildung ist das normale TOCSY- und das STD TOCSY-Spektrum der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek mit dem E-Selektin in einem Mischungsverhältnis von 8.7/1 gezeigt.

TOCSY



STD TOCSY

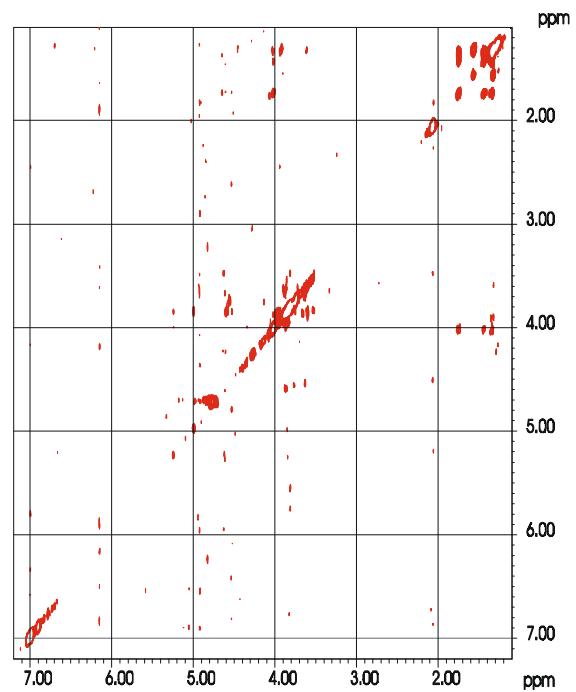


Abbildung 25: Das TOCSY-Spektrum wurde mit 64 scans und das STD TOCSY-Spektrum mit 112 scans pro Inkrement aufgenommen. Deutlich ist eine geringe Anzahl von Signalen im STD TOCSY-Experiment zu erkennen.

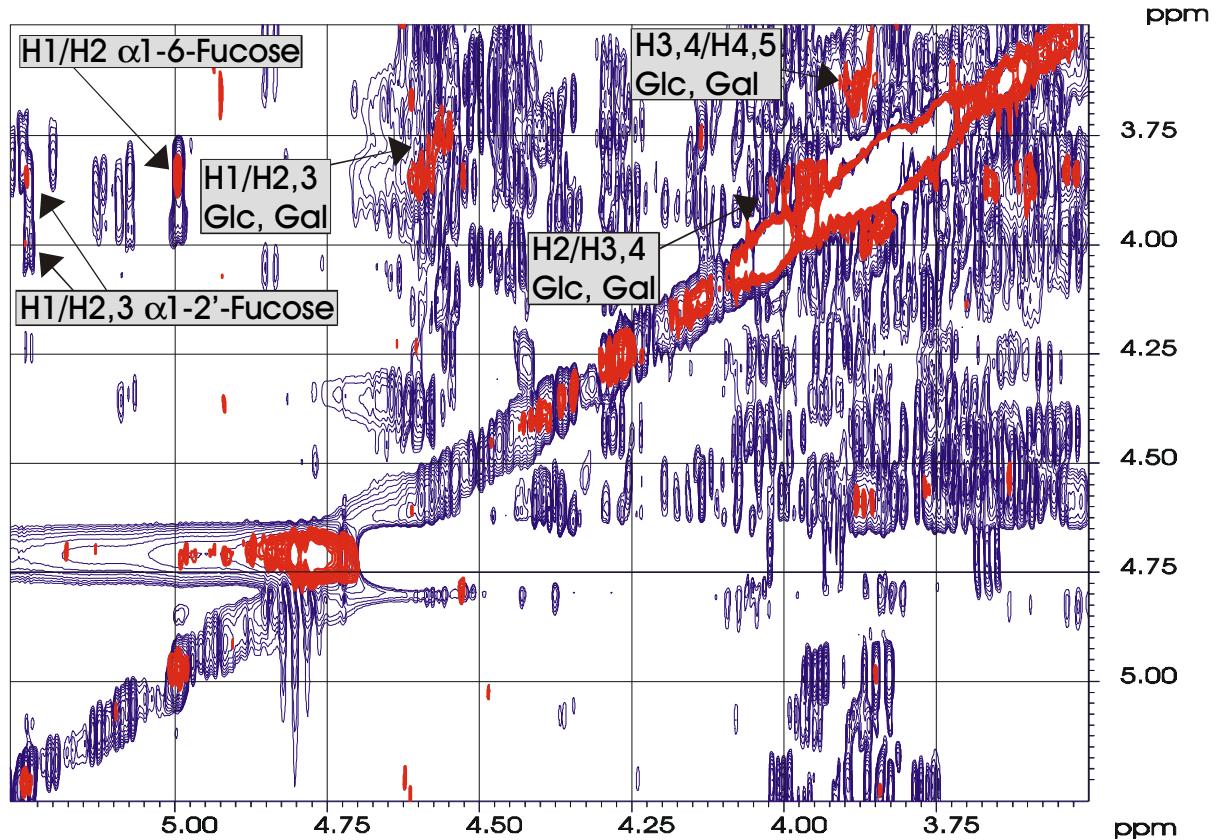


Abbildung 26: H1-Protonen Bereich der Fucose und *hump*-Region des sulfatierten Trisaccharids. Das blaue Spektrum zeigt das „normale“ TOCSY-Experiment. Die roten Signale stellen das STD TOCSY-Spektrum dar.

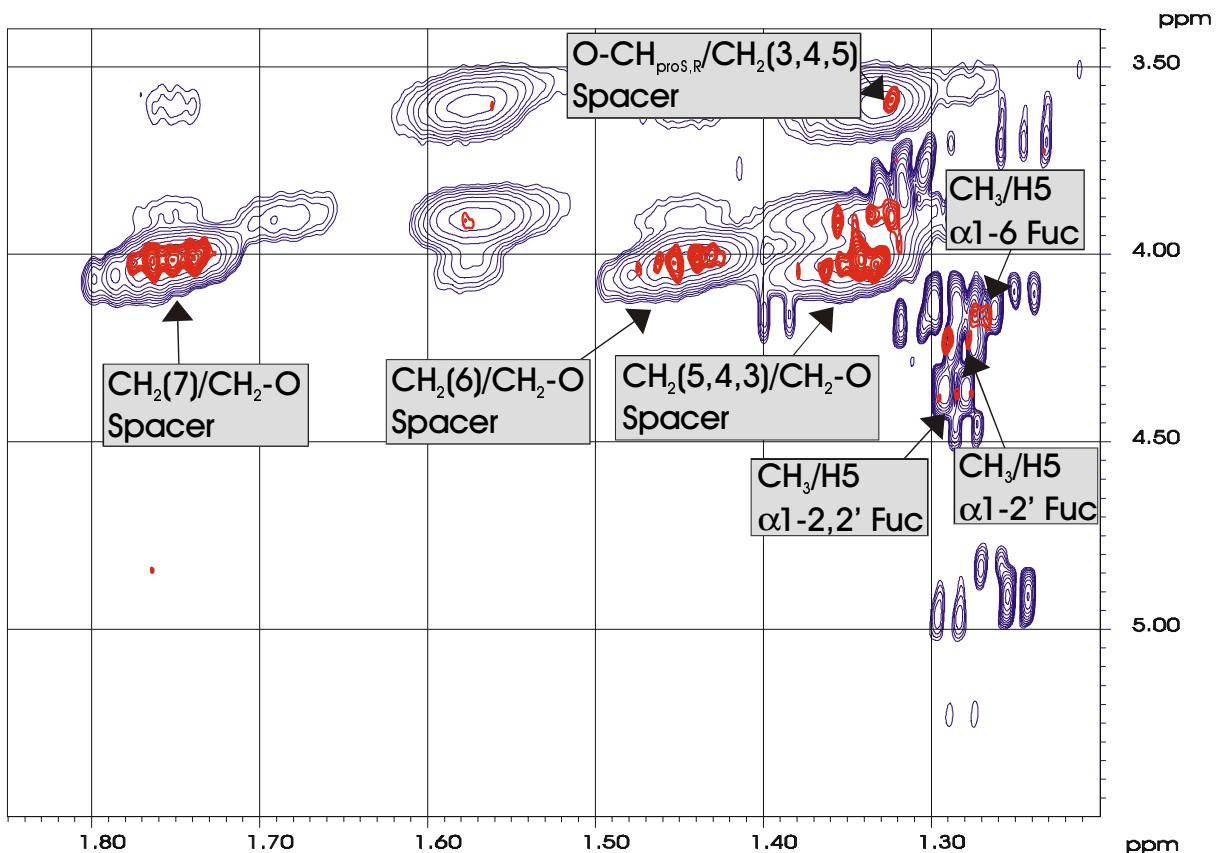


Abbildung 27: $\text{CH}_3\text{-H}5$ Bereich aus dem TOCSY-Spektrum. Das normale TOCSY-Spektrum ist mit blauen Kontourlinien dargestellt. Die roten Signale zeigen das STD-TOCSY.

Das normale TOCSY-Spektrum ist durch starke Signalüberlagerung in der *hump*-Region der Zucker geprägt. Nur die H-1 Protonen der Fucose sind dispergiert. Anders im STD TOCSY-Experiment. Hier sind nur noch eine geringe Anzahl an Resonanzen zu erkennen. Diese Signale stellen nur die Protonen dar, die über das Protein einen Magnetisierungstransfer erfahren haben und zeigen also nur die bindenden Komponenten aus der Bibliothek. Ausschnitte aus verschiedenen Bereichen der Spektren geben ein detailliertes Bild der für die Verknüpfung der Fucose wichtigen Resonanzen.

Im Bereich der H1-Protonen der Fucose sind im STD TOCSY nur Resonanzen zu erkennen, deren chemische Verschiebung charakteristisch für die α 1-2' (5.24 ppm) und α 1-6 (4.994 ppm) Verknüpfung sind. Die Signale der H1-Protonen der Glucose oder Galactose liegen bei 4.68 ppm bis 4.3 ppm. Die Ringprotonen zeigen verschiedene Signale von ca. 4.3 ppm bis 3.4 ppm. Abhängig von der jeweiligen Verknüpfungs-

position der Fucose und der Sulfatgruppe können die Resonanzen der Galactose und Glucose um mehrere Zehntel ppm variieren. Da hier keine entsprechenden Referenzdaten zur Verfügung standen, war eine exakte Zuordnung dieser ^1H -chemischen Verschiebungen nicht möglich.

Die ^1H -chemischen Verschiebungen der H5-Protonen der Fucose sind ebenfalls empfindlich gegenüber dem Verknüpfungsmuster. Hier zeigt sich, daß nur STD Signale der 1-2' (4.365 ppm, 4.237 ppm) und der 1-6 (4.151 ppm) verknüpften Fucose zu erkennen sind. Auffällig ist, daß der Magnetisierungstransfer im STD TOCSY für die Zuckerprotonen nur ein bis zwei Kerne entlang der Spinsysteme verläuft. Bei den Resonanzen der Protonen des C_8 -spacer ist der Transfer ausgedehnter. Zusammenfassend sind in folgender Tabelle die ^1H -chemischen Verschiebungen der STD Signale aufgelistet.

H1 [ppm] Fucose	H2,3,4 [ppm] Fucose	Verknüpfungs- Muster der Fucose
5.240	3.844	α -1-2'
5.240	3.995	α -1-2'
4.994	3.833	α -1-6

H5 [ppm] Fucose	CH ₃ [ppm] Fucose	Verknüpfungs- Muster der Fucose
4.365	1.286	α -1-2'
4.237	1.281	α -1-2'
4.151	1.269	α -1-6

H1 [ppm] Gal, Glc	H2,3 [ppm] Gal, Glc	Verknüpfungs- Muster der Fucose
4.604	3.857	
4.587	3.847	
4.558	3.747	
4.579	3.781	
4.553	3.77	
4.535	3.761	

H2,3 [ppm] Gal, Glc	H3,4 [ppm] Gal, Glc	Verknüpfungs- Muster der Fucose
4.019	3.878	
3.984	3.849	
3.985	3.864	
3.971	3.848	
3.957	3.848	
3.963	3.848	

H2 [ppm] Gal, Glc	H3,4 [ppm] Gal, Glc	Verknüpfungs- Muster der Fucose
3.903	3.624	
3.861	3.66	
3.848	3.598	
3.839	3.527	
3.838	3.624	

C8-spacer [ppm]	H2,3,4,5,6,7,8 [ppm] C8-spacer	Verknüpfungs- Muster der Fucose
H1 3.58, 3.87	H2,3,4,5 1.58, 1.32	
H2 1.58	H1,3,4,5 3.58, 3.87, 1.32	
H3,4,5 1.32	H1,2,6,7,8 3.58, 3.87, 1.58, 1.45, 1.75, 4.02	
H6 1.45	H3,4,5,7,8 1.32, 1.75, 4.02	
H7 1.75	H3,4,5,6,8 1.32, 1.45, 4.02	
H8 4.02	H3,4,5,6,7 1.32, 1.45, 1.75	

Tabelle 8: ¹H-chemische Verschiebungen der Signale aus dem STD TOCSY-Spektrum. Die Numerierung der Protonen des C₈-spacer beginnt an der Glucose.

5.3.6 Selektive ¹H-Experimente

Die Zuordnung der Resonanzen der Fucose H2, H3 und H4 Ringprotonen von den bindenden Komponenten ist aus den bisherigen NMR-Experimenten nicht exakt zu ermitteln. Mit Hilfe von selektiven 1D-

TOCSY und 1D-COSY-Experimenten konnten die Spinsysteme der Fucose jedoch zugeordnet werden.

H1 [ppm] Fucose	H2 [ppm] Fucose	³ J _{1,2'} , ³ J _{2,3'} [Hz]	Verknüpfungs- Muster der Fucose
5.240	3.844	4.04, 10.53	α -1-2'
	3.830	4.35, 10.38	α -1-2'
4.994	3.833	-, 10.22	α -1-6
	3.828	3.97, 10.30	α -1-6
	3.826	3.74, 10.38	α -1-6

H1 [ppm] Fucose	H3 [ppm] Fucose	³ J _{2,3'} , ³ J _{3,4'} [Hz]	Verknüpfungs- Muster der Fucose
5.240	3.995	10.38, 3.36	α -1-2'
	3.840	10.53, 3.97	α -1-2'
4.994	3.821	10.38, 3.74	α -1-6

H1 [ppm] Fucose	H4 [ppm] Fucose	³ J _{3,4'} , ³ J _{4,5'} [Hz]	Verknüpfungs- Muster der Fucose
5.240	3.886	3.36, 0.99	α -1-2'
4.994	3.926	3.74, 0.61	α -1-6

Tabelle 9: ¹H-chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Fucose-Signale aus den selektiven NMR-Experimenten.

Die selektive Anregung erfolgte auf die Resonanzen der H1-Fucose Protonen (5.240 ppm und 4.994 ppm) der bindenden Liganden.

Das 1D-COSY-Experiment mit der Anregung bei 5.240 ppm ergab ein Spektrum mit mindestens zwei verschiedenen H2-Protonen, deren doppelte Dubletts in Antiphase bei 3.884 ppm und 3.830 ppm erscheinen. Die schwache Dispersion von 0.054 ppm deutet auf eine andere chemische Umgebung des H2-Protons der einen Spezies hin. Sehr ausgeprägt ist dieser *shift* für das H3-Proton. Hier zeigt das 1D-TOCSY-Spektrum ein H3-Proton mit einer chemischen Verschiebung von 3.995 ppm. Das H3-Proton der anderen Komponente erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 3.840 ppm. Dies entspricht einer Differenz von 0.155 ppm. Ein Tieffeld-*shift* dieser Größenordnung kann ursächlich durch eine negativ geladene Gruppe in naher räumlicher Umgebung des H3-Protons hervorgerufen werden. Beispiele für ¹H-chemische Verschiebungen von sulfatierten Lactosen in 2'-Position zeigen für das H2'-Proton ein *shift* von 0.71 ppm und für das H3'-Proton und H1'-Proton ein *shift* von 0.17 ppm und 0.15 ppm⁹⁸.

Selektive Anregung (5.240 ppm)
der H1-Protonen der α -L-Fucosyl-(1-2')-lactose

1D-COSY

1D-TOCSY

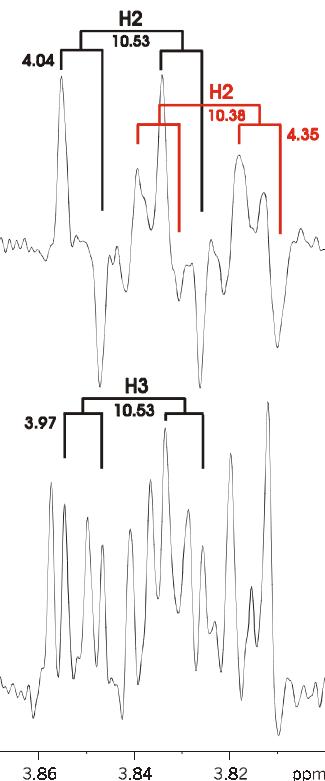


Abbildung 28: Selektive ^1H -COSY und ^1H -TOCSY-Experimente der bindenden Komponenten. Der selektive Gauss-Puls hatte eine Länge von 80 ms und eine Einstrahlposition von 5.240 ppm. Die Einstrahlposition entspricht der Resonanzfrequenz der Fucose H1-Protonen der α -L-Fucosyl-(1-2')-lactose.

Selektive Anregung (4.994 ppm)
der H1-Protonen der α -L-Fucosyl-(1-6)-lactose

1D-COSY

1D-TOCSY

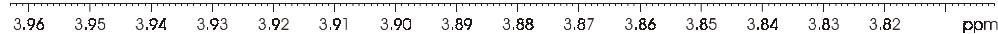


Abbildung 29: Selektive ^1H -COSY und ^1H -TOCSY-Experimente der bindenden Komponenten. Der selektive Gauss-Puls hatte eine Länge von 80 ms und eine Einstrahlposition von 4.994 ppm. Die Einstrahlposition entspricht der Resonanzfrequenz der Fucose H1-Protonen der α -L-Fucosyl-(1-6)-lactose.

Da die Fucose in den Komponenten der Bibliothek nicht sulfatiert ist, sondern nur die Lactose, sollte die Sulfatgruppe an einer Position verknüpft sein, die räumlich dem H3-Proton der Fucose nahe kommt. Die Resonanzen der H4-Protonen liegen für beide Komponenten im Bereich von 3.886 ppm. Der Einfluß wirkt sich also nur auf die ^1H -chemischen Verschiebungen der H2- und H3-Protonen der Fucose aus.

Die andere Komponente, die als bindender Ligand aus dem STD TOCSY-Experiment identifiziert wurde, ist die Lactose, in der die Fucose 1-6 verknüpft ist. Die selektiven 1D-Experimente erfolgten nun mit einer Anregung der H1-Protonen der Fucose bei 4.994 ppm. Im Unterschied zu der 1-2'-verknüpften Fucose, ergab die Identifizierung und Zuordnung der Spinsysteme keinen Tieffeldshift der Protonenresonanzen. Die ^1H -chemischen Verschiebungen der H2-Protonen liegen in einem Bereich von 3.826 - 3.833 ppm. Im 1D-TOCSY-Spektrum konnte aufgrund von Signalüberlagerung die Resonanz von nur einem H3-Proton exakt bestimmt werden. Die chemische Verschiebung liegt bei 3.821 ppm. Die Resonanzen der H4-Protonen können Werte zwischen 3.94 - 3.95 ppm zugeordnet werden.

Die chemischen Verschiebungen der Fucose Ringprotonen sind somit nicht durch eine räumlich nahe Sulfatgruppe beeinflußt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die α -L-Fucosyl-(1-6)-lactose und die α -L-Fucosyl-(1-2')-lactose als bindende Bestandteile der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek identifiziert werden konnten. Die H2- und H3-Ringprotonen der α -L-Fucosyl-(1-2')-lactose zeigen einen Tieffeldshift, der wahrscheinlich aufgrund einer Sulfatgruppe in räumlicher Nähe dieser Protonen entsteht. Die anderen bindenden Komponenten zeigen keinen shift der chemischen Verschiebung.

5.3.7 $tr\text{NOESY}$ -Experimente

Eine elegante Methode zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen basiert auf der $tr\text{NOE}$ -Meßtechnik. In der Regel besitzen kleine Moleküle einen

positiven NOE. Bindet jedoch so ein Molekül am Protein wechselt das Vorzeichen und die Verbindung zeigt starke negative NOEs. Somit kann ein einziges $tr\text{NOESY}$ -Spektrum den bindenden Liganden identifizieren. Darüber hinaus kann durch die Aufnahme von $tr\text{NOESY}$ -Aufbauraten, die Konformation im gebundenen Zustand des Liganden bestimmt werden. Bei der Untersuchung einer Substanz-Bibliothek sollten somit nur die bindenden Komponenten ein Vorzeichenwechsel des NOEs zeigen.

Bei der hier vorliegenden sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek ergab sich jedoch, daß die Verbindungen der Mischung bereits ohne Protein einen negativen NOE zeigten. Aufgrund der Molekülmasse von 824.83 g/mol ist dies nicht zu erwarten. Berücksichtigt man aber die Sulfatierung, deren Hydrathülle in etwa die Masse einer Monosaccharideinheit ausmacht, so liegt die virtuelle Masse in einem Bereich, in dem die Moleküle negative NOEs zeigen. Auch die Aufnahme von NOESY-Spektren bei 250 MHz - der Nulldurchgang des NOEs ist direkt proportional zur Spektrometerfrequenz und zur Korrelationszeit des Moleküls, also abhängig von der Molekülmasse - führte nicht zu positiven NOE-Signalen der nichtbindenden Verbindungen der Bibliothek. Deshalb konnte über einen Vorzeichenwechsel nicht zwischen Binder und Nichtbinder differenziert werden.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal des $tr\text{NOE}$ s ist die Lage des Maximums. Auch der $tr\text{NOE}$ baut sich zeitabhängig von der Molekülmasse und den Protonenabständen auf. Bei den freien Liganden der Bibliothek liegt das Maximum bei größer einer Sekunde. Im gebundenen Zustand sollten die Maxima deutlich zu kürzeren Mischzeiten verschoben sein. Abhängig vom Ligand/Protein-Verhältnis, der Korrelationszeit des Komplexes und von der Geschwindigkeit des chemischen Austausches (k_{on} , k_{off}) ergeben sich bei unterschiedlichen Mischzeiten unterschiedliche Maximalwerte des $tr\text{NOE}$ s.

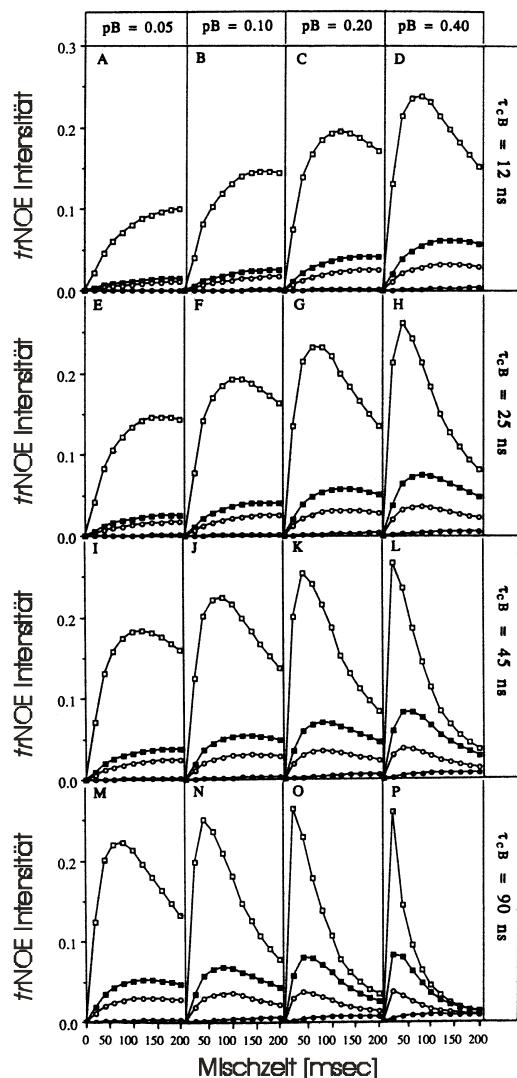


Abbildung 30: Die tr NOE-Intensität ist gegen die Mischzeit aufgetragen. Die Abbildung zeigt die berechneten tr NOE-Aufbaukurven für jeweils vier verschiedene Anteile an gebundenen Liganden p_B sowie für vier verschiedene Korrelationszeiten des Liganden $\tau_c B$ im gebundenen Zustand. Die Kurven entsprechen verschiedenen Protonenabständen: (□) 1.76 Å; (■) 2.46 Å; (○) 2.68 Å und (●) 4.86 Å. Diese Simulation wurde für eine Spektrometer-Frequenz von 500 MHz durchgeführt⁵⁹.

Durch Erhöhung des Ligandüberschusses wird das Maximum der tr NOE-Intensität zu längeren Mischzeiten verschoben. Der relative tr NOE nimmt jedoch leicht ab. Ziel ist es ein optimales Ligand/Protein-Verhältnis zu erreichen, in dem der tr NOE maximal ist und bei einer Mischzeit von ca. 100 ms liegt. Abbildung 30 zeigt den oben beschriebenen Zusammenhang⁵⁹.

Für die Aufnahme von tr NOESY-Spektren wurde ein Ligand/Protein-

Verhältnis von 11.6/1 gewählt mit jeweils verschiedenen Mischzeiten ($\tau_m = 25$ ms, 50 ms, 75 ms, 100 ms, 250 ms für die Mischung und für die „freie“ Bibliothek $\tau_m = 25$ ms, 50 ms, 75 ms, 100 ms, 150 ms, 250 ms, 500 ms). Bei einer Molekülmasse des Proteins von 220 kD und einer Dissoziationskonstanten der bindenden Liganden von $K_D = 1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-6}$ [M] befinden wir uns im linken unteren Bereich der Abbildung 30. Somit sollten sich gut tr NOEs beobachten lassen.

Die Auswertung der Spektren erwies sich jedoch als außerordentlich schwierig, da aufgrund von starken Signalüberlagerungen keine eindeutige Identifizierung der Spinsysteme möglich war. Zusätzlich sind die Molekülmassen der einzelnen Komponenten der Bibliothek je nach Sulfatierungsmuster verschieden, so daß die Aufbaukurven der freien Bibliothek bereits unterschiedliche Verläufe zeigen.

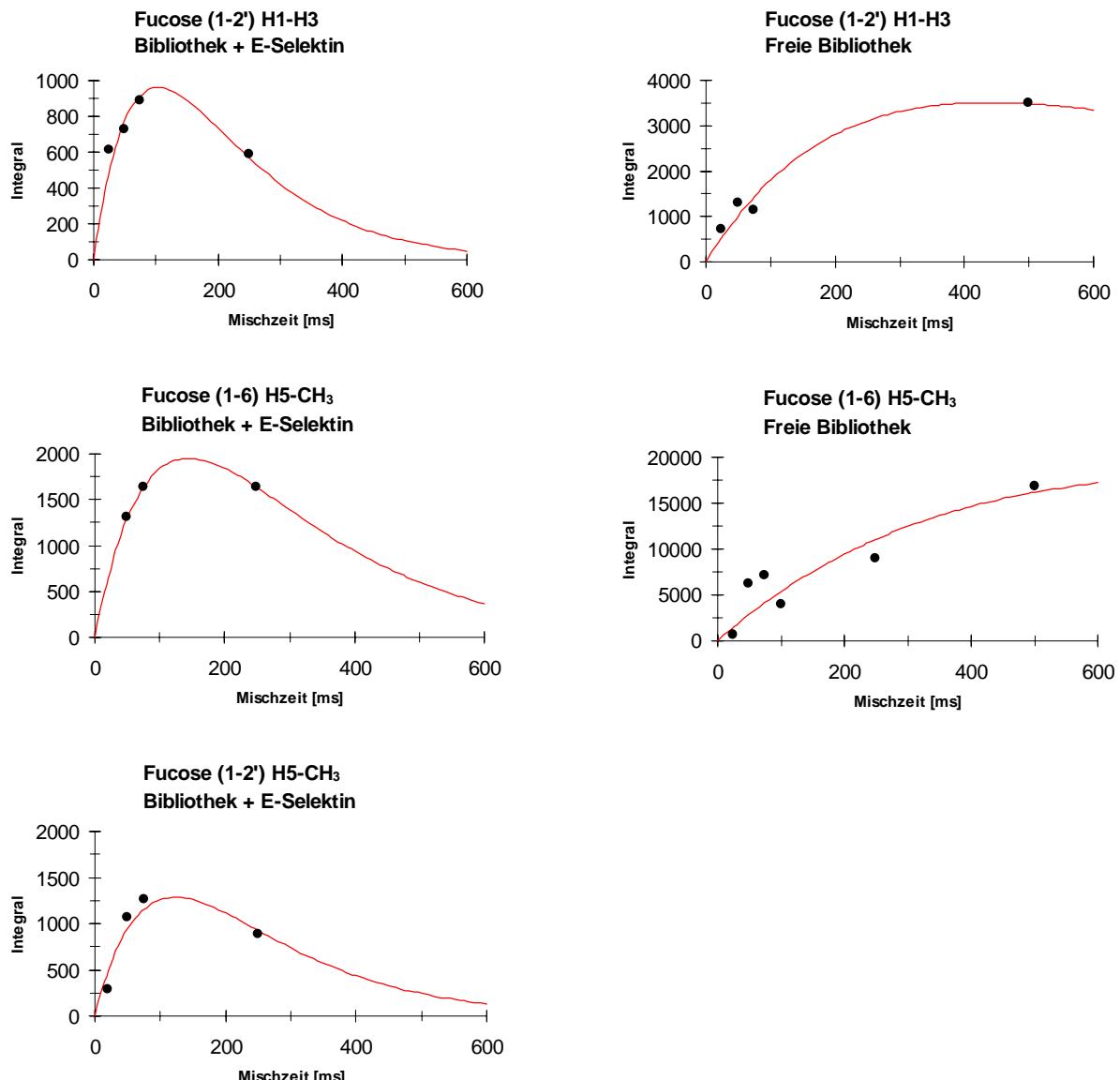


Abbildung 31: *tr*NOESY-Aufbaukurven von ausgewählten Kreuzsignalen deren ^1H -chemische Verschiebung den Protonen der 1-2' und 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose entspricht. Die Aufbaukurven der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek mit dem E-Selektin zeigen ein zu kürzeren Mischzeiten verschobenes Maximum (ca. 100 ms). Die Kurve wurde durch einen doppel exponentiellen Fit erhalten.

Die *tr*NOE-Aufbaukurven in Abbildung 31 zeigen exemplarisch nur die durch die STD Experimente erhaltenen Spinsysteme, deren ^1H -chemische Verschiebungen eindeutig in den *tr*NOESY-Spektren identifiziert werden konnten. Nichtbindende Komponenten zeigen Aufbauraten, deren Kurvenform denen der freien Bibliothek, also ohne Protein entsprechen.

Die NOE-Aufbaukurven der 1-2' und 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose zeigen als Komponenten der „freien“ Bibliothek und in Mischung mit dem E-Selektin eine unterschiedliche Kurvenform. Die Kurven der bindenden Komponenten besitzen ein

Maximum bei ca. 100 ms. Die Maxima der entsprechenden Signale der freien Bibliothek liegen bei deutlich höheren Mischzeiten. Für die Protonen der Glucose und Galactose sind aufgrund starker Signalüberlagerungen keine eindeutig zuzuordnenden Aufbaukurven zu erhalten. Die Resonanzsignale des C_8 -*spacers* zeigen für alle Komponenten die gleichen ^1H -chemischen Verschiebungen, so daß keine Differenzierung zwischen bindenden und nichtbindenden Segmenten getroffen werden kann.

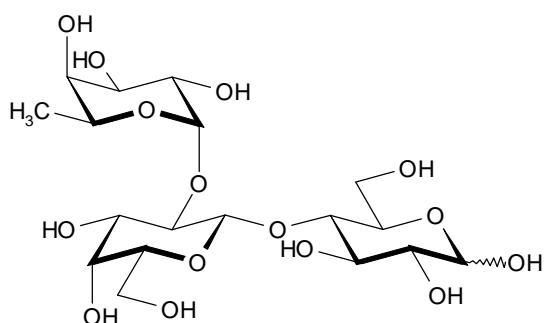
Zusammenfassend ergibt sich aus der Analyse der *tr*NOE-Aufbaukurven kein vollständiges Bild über die Bindungsaktivität

einzelner Komponenten. Die Verschiebung der Maxima der τ NOE-Aufbauraten aufgrund von Bindung einzelner Substanzen am E-Selektin ist in vielen Fällen nicht signifikant. Die Gründe hierfür könnten in unterschiedlichen Bindungskonstanten, Bindungskinetiken und verschiedenen relativen Konzentrationen der einzelnen Komponenten sein. Dennoch sind die größten Verschiebungseffekte der Maxima zu kürzeren Mischzeiten, an Resonanzen der in den STD-Experimenten ermittelten Substanzen zu beobachten.

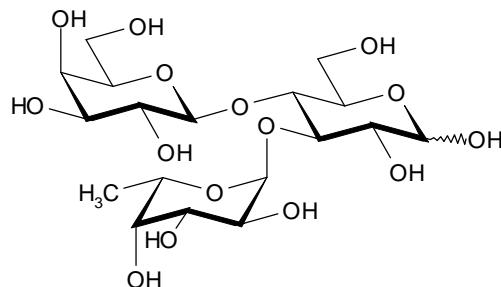
5.4 NMR-Experimente der 3- und 2'-Fucosyl-Lactose

Die 3-Fucosyl-lactose, die als Grundkörper dem Sialyl-Lewis^x entspricht, sollte auch ohne Ladung der Carboxylatgruppe eine geringe Bindungsaktivität zeigen. Die 2'-Verknüpfungsvariante, die als bindende Komponente der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek identifiziert wurde, wurde ebenfalls untersucht. Als Nichtbinder kam Lactose zum Einsatz, die der Mischung zugefügt wurde. Alle Verbindungen lagen als Anomerengemische der Glucose vor. Mit Hilfe des STD NMR-Verfahrens wurde die Mischung mit einem Überschuß von 100/1 (Ligand/Protein) je Komponente untersucht. Bei einer Proteinmenge (E-Selektin, MW 220 kDa) von 11.97 nmol wurden also pro Verbindung 1.197 μ mol vermessen.

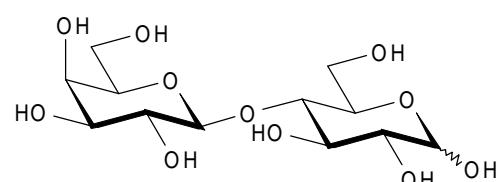
2'-Fucosyl-lactose



3-Fucosyl-lactose



Lactose



5.4.1 1D STD NMR-Experimente

Für die Zuordnung der Protonenresonanzen wurden die Verbindungen zunächst einzeln NMR-spektroskopisch vermessen. Das 1 H STD NMR-Experiment konnte durch Veränderung der *on resonance* Frequenz von -3000 Hz (-6 ppm) auf 3590.82 Hz (7.184 ppm) in seiner Qualität verbessert werden, da hier keine 1 H-chemischen Verschiebungen der Ligandprotonen im aromatischen Bereich lagen. Somit konnte das Protein über seine aromatischen Protonen direkt gesättigt werden. Zur Überprüfung der Einstrahlposition wurden zusätzlich Differenzspektren aufgenommen in denen die Einstrahlposition nicht verändert wurde (Spektrum C und D). Sie sollten im Idealfall, bis auf Lösungsmittel-Resonanzen keine Signale zeigen.

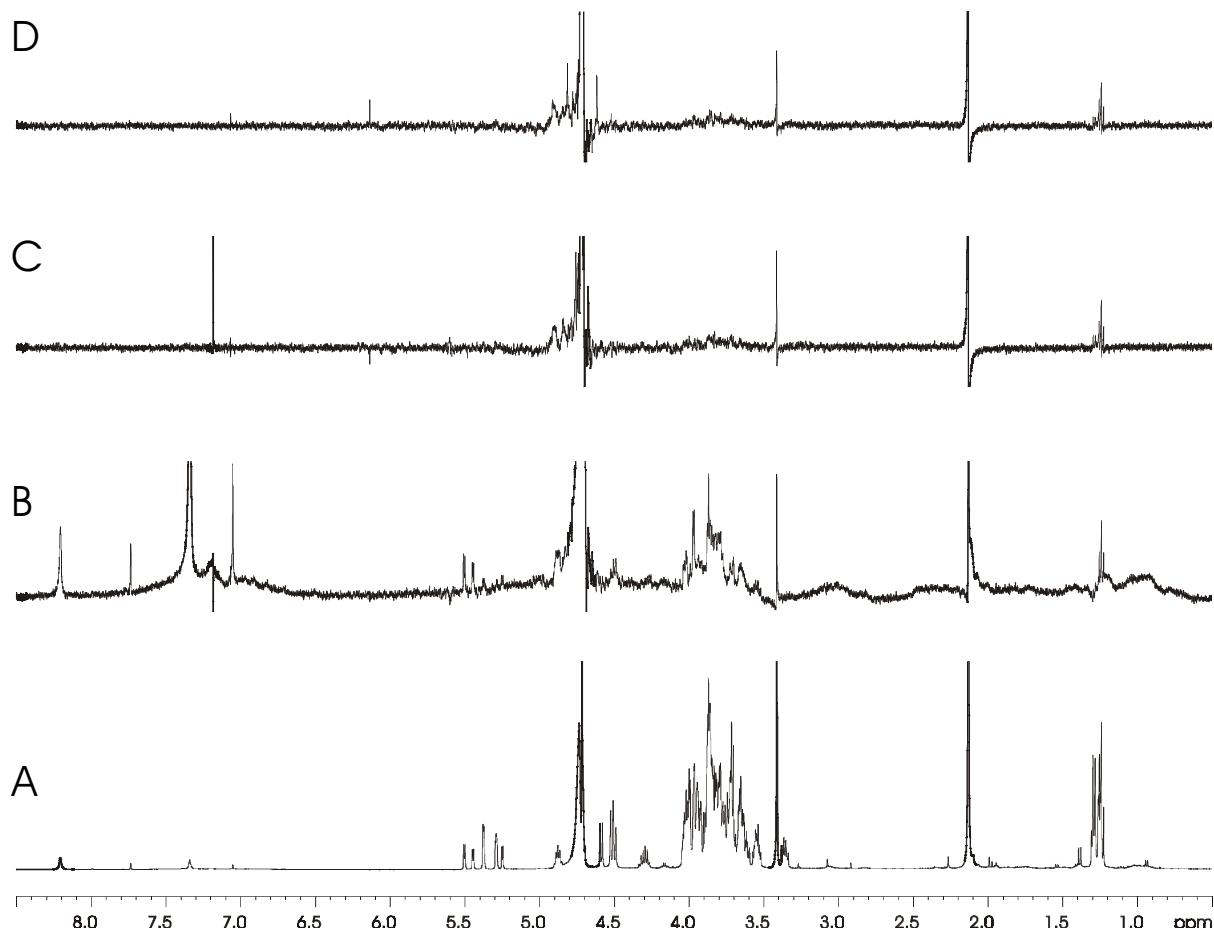


Abbildung 32: Protonenspektren der Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose mit dem E-Selektin (Mischungsverhältnis je Komponente: Ligand/Protein 100/1). Die Anzahl der *scans* betrug für die ^1H STD NMR-Spektren 2560. Das ^1H NMR-Spektrum wurde mit 1280 *scans* und einem *spinlock*-Filter von 10 ms Pulslänge aufgenommen. A: ^1H NMR-Spektrum B: ^1H STD NMR-Spektrum (*off resonance*: 20000 Hz, *on resonance*: 3590.82 Hz). C: ^1H STD NMR-Spektrum (*on resonance*: 3590.82 Hz). D: ^1H STD NMR-Spektrum (*off resonance*: 20000 Hz).

Zur Überprüfung der eingesetzten Mengen der einzelnen Komponenten in der Mischung wurden die Integrale der $\text{H}1$ -Protonen der Galactose untereinander verglichen. Aus den Integralen im Spektrum A (Abb. 32) ergaben sich folgende relative Mengen:

	H1-Gal [ppm]	Relative Menge
Lactose	4.511	1
2'-Fucosyl-lactose	4.584	0.81
3-Fucosyl-lactose	4.495	0.71

Tabelle 10: Relative Mengen der einzelnen Komponenten der Mischung.

Zur Untersuchung wurden die Anomerengemische der einzelnen Verbindungen eingesetzt. Die jeweiligen Anomerieverhältnisse konnten mit den Integralen verschiedener Protonen-Resonanzen der

Anomeren bestimmt werden. Die Lactose zeigt mit einem α/β -Verhältnis von 1/2.79 den größten Unterschied. Gefolgt von der 2'-Fucosyl-lactose mit 1/1.55 und der 3-Fucosyl-lactose mit 1/1.29 (Tab. 11).

	[ppm]	α/β Verhältnis
Lactose	$\text{H}1\alpha$ Glc, 5.286 $\text{H}2\beta$ Glc, 3.351	1/2.79
2'-Fucosyl-lactose	$\text{H}1\alpha$ Glc, 5.289 $\text{H}2\beta$ Glc, 3.360	1/1.55
3-Fucosyl-lactose	$\text{H}1\alpha$ Fuc, 5.444 $\text{H}1\beta$ Fuc, 5.501	1/1.29

Tabelle 11: Anomerenverhältnisse der einzelnen Komponenten der Mischung.

Zusätzlich zu den hier dargestellten Spektren zeigten die ^1H STD NMR-Spektren der einzelnen Verbindungen ohne Protein unter identischen Aufnahmeverhältnissen keinerlei Signalartefakte.

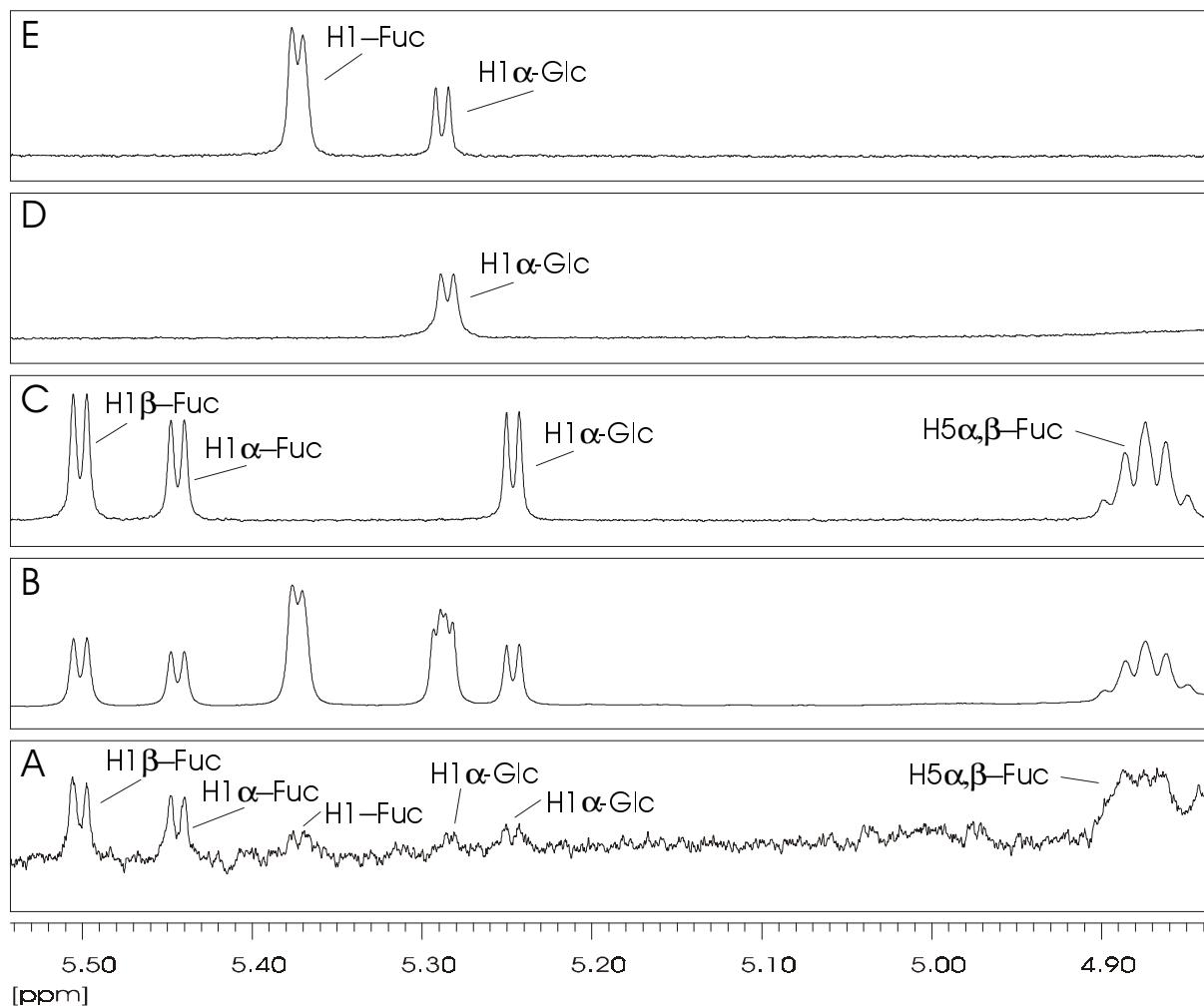


Abbildung 33: A: ^1H STD NMR-Spektrum (*off resonance*: 20000 Hz, *on resonance*: 3590.82 Hz) der Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose mit dem E-Selektin (Mischungsverhältnis je Komponente: Ligand/Protein 100/1).. B: ^1H NMR-Spektrum der Mischung mit einem *spinlock*puls von 10 ms zur Unterdrückung der Proteinresonanzen. C ^1H NMR-Spektrum der 3-Fucosyl-lactose. D: ^1H NMR-Spektrum der Lactose. E: ^1H NMR-Spektrum der 2'-Fucosyl-lactose.

Im Folgenden sollen hauptsächlich die Resonanzen diskutiert werden, die durch STD-Signale auf eine Bindungsaktivität der Komponenten der Mischung hinweisen. Eine komplettte Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebungen der einzelnen Verbindungen wurde nicht durchgeführt. Die Stärke der STD-Signale wurde anhand der Signalintensität, unter Berücksichtigung der Linienform, eines „normalen“ Protonen-Spektrums der Mischung plus Protein im Vergleich zum STD-Spektrum ermittelt.

Im STD Spektrum A (Abb. 33) der Mischung erscheinen beide H1-Fucose-Protonen der anomeren 3-Fucosyl-lactose als starke STD Signale mit 3.1 %. Das H5 α/β -Proton der Fucose zeigt mit 4.1 % den höchsten Wert.

	Protonen	[ppm]	STD [%]
Lactose	H1 α -Glc	5.286	0.5
	H1-Gal	4.511	0.5
2'-Fucosyl-lactose	H1-Fuc	5.373	0.6
	H1-Gal	4.584	0.4
3-Fucosyl-lactose	H1 α -Fuc	5.444	3.1
	H1 β -Fuc	5.501	3.1
	H2,4-Fuc	3.862	1.3
		3.857	0.8
	H3-Fuc	4.028	1.0
	H5 α,β -Fuc	4.876	4.1
	H1-Gal	4.495	1.2
	H2-Gal	3.544	0.75
	H3 α/β -Gal	3.711	0.7
	H4-Gal	3.967	1.6
	H5-Gal	3.650	0.9
	H6-Gal	3.781	1.4
	H1 α -Glc	5.247	1.1
	H2b-Glc	3.534	0.75
	H5b-Glc	3.655	0.9

Tabelle 12: STD ^1H -Signale und Intensitäten der Komponenten aus der Mischung.

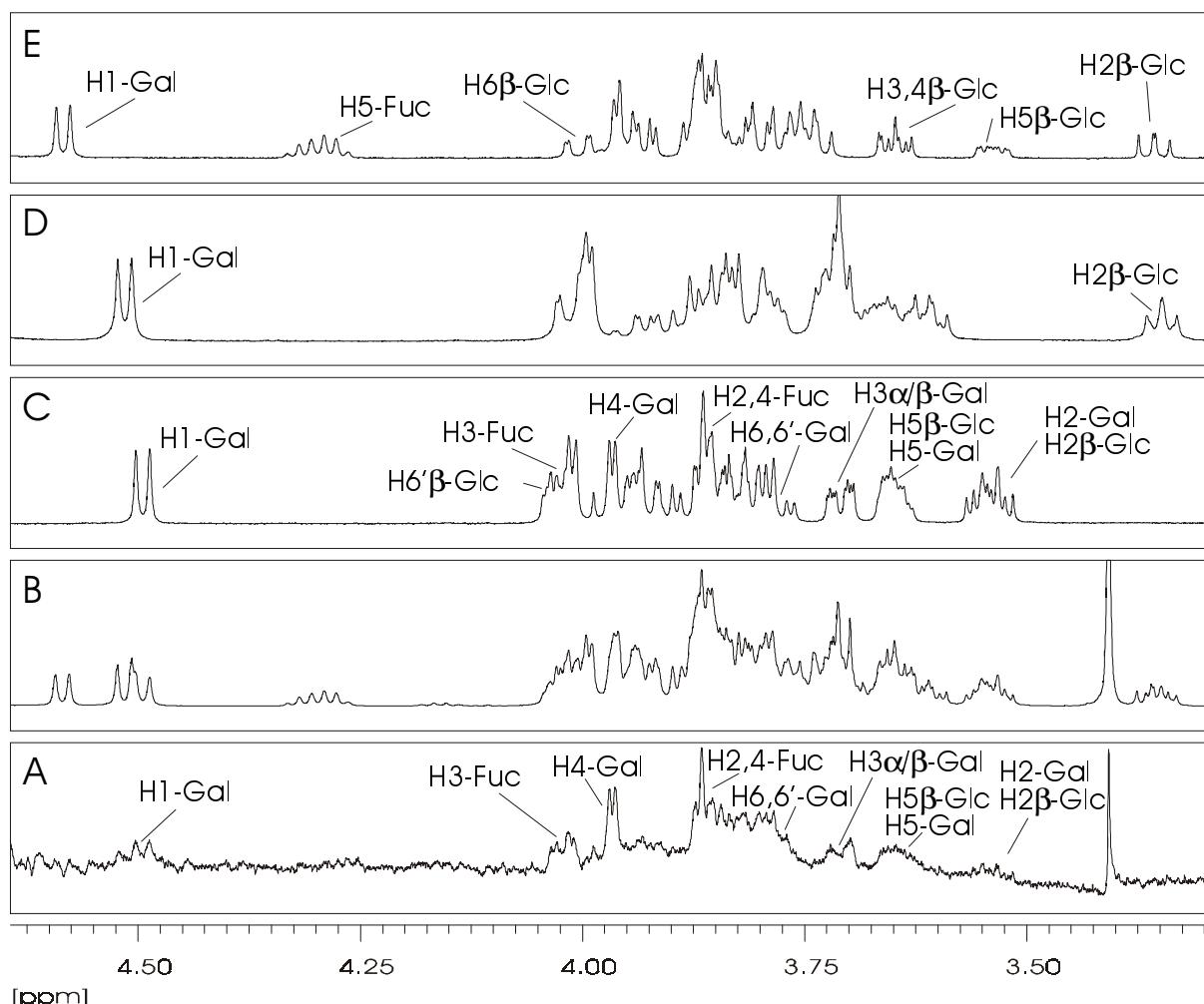


Abbildung 34: Wie Abbildung 33. Gezeigt ist der Bereich von 3.3 ppm bis 4.65 ppm. Im STD Spektrum A sind nur die Resonanzen besonders gekennzeichnet, die von den Protonen der 3-Fucosyl-lactose stammen (Spektrum C).

Das H1 α -Proton der Glucose zeigt eine deutlich geringere Intensität (1.1 %).

Die Intensitäten der STD Signale der H1-Fucose- und H1-Galactose-Protonen der 2'-Fucosyl-lactose liegen um 0.5 %. Da Lactose als Nichtbinder ebenfalls schwache STD-Signale (0.5 %) liefert, kann hier nicht exakt zwischen sehr schwacher Bindung, unspezifischer Bindung und Subtraktion-Artefakten unterschieden werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß die STD Signale im Spektrum A (Abb. 33) hauptsächlich von der 3-Fucosyl-lactose stammen.

Sollte der Bindungsmodus der 3-Fucosyl-lactose dem postulierten des Sialyl-Lewis^x entsprechen, so sind die Fucose-Protonen und die H4- und H6-Galactose-Protonen bzw. die entsprechenden Hydroxygruppen besonders stark an der Bindung zum

E-Selektin beteiligt. Im STD Spektrum A (Abb. 34) zeigen die Fucose-Protonen mit 0.8 %, 1.3 % (H2,4) und 1.0 % (H3) und die Galactose-Protonen deutliche STD Signale. Der prozentuale STD Effekt liegt für die Galactose in einem Bereich von 0.7 % (H3 α , β), 0.9 % (H5) bis 1.4 % (H6) und 1.6 % (H4). Die Methyl-Protonen der 2'-Fucosyl-lactose und der 3-Fucosyl-lactose sind im STD Spektrum nicht zu erkennen. Offensichtlich ist die Methylgruppe der Fucose nicht direkt am Protein lokalisiert (Abb. 35). Das Gleiche gilt für die Protonen der Glucose, die kaum STD Signale zeigt.

Da sich die Protonen-Resonanzen im *bump*-Bereich stark überlagern, wurde zur weiteren Untersuchung ein 2D STD TOCSY-Experiment aufgenommen.

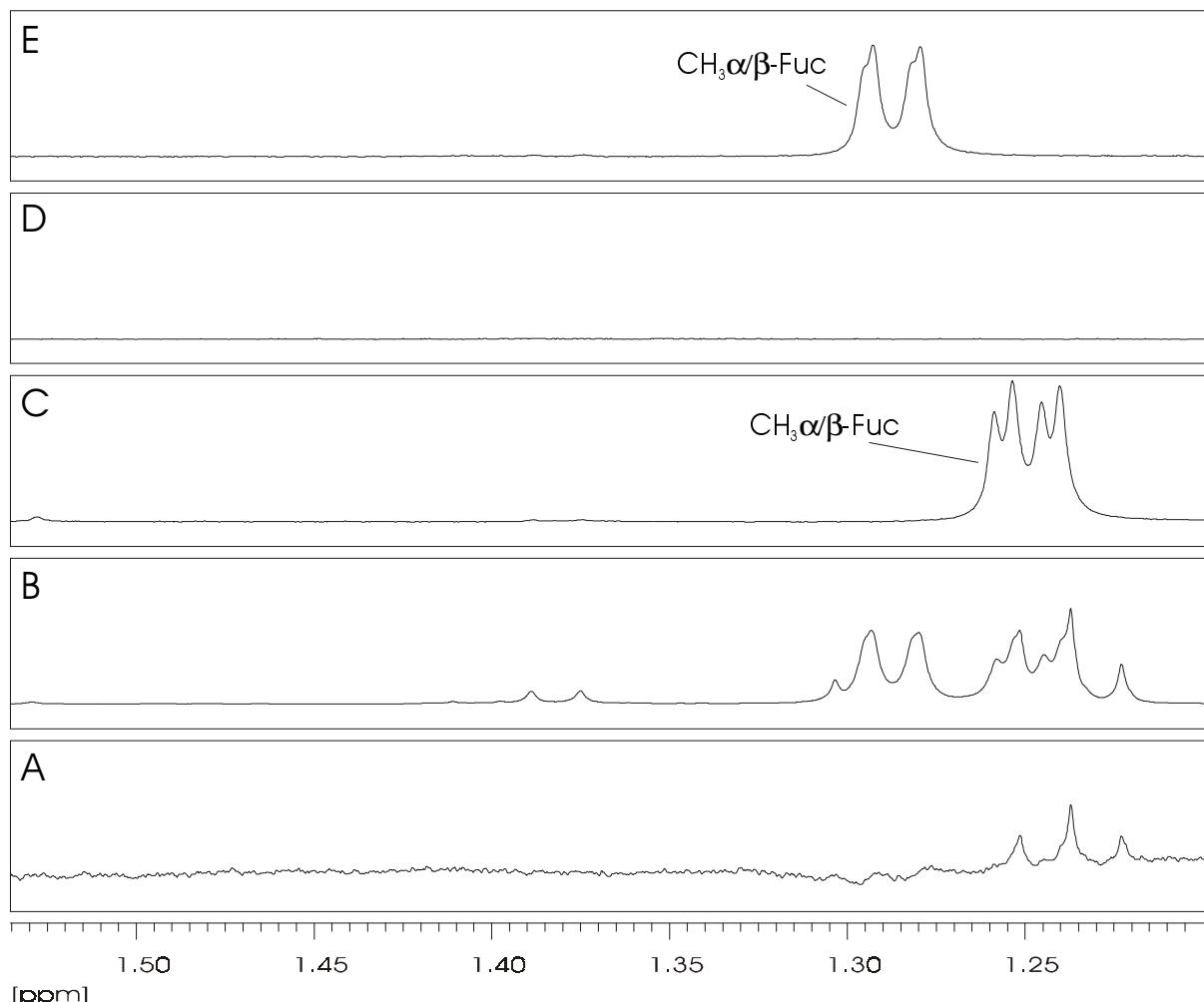


Abbildung 35: Wie Abbildung 33. Gezeigt ist der Bereich von 1.2 ppm bis 1.535 ppm.

5.4.2 2D STD TOCSY-Experiment

Die Identifizierung des bindenden Epitops der 3-Fucosyl-lactose wurde mit einer Variante des STD TOCSY-Experiments durchgeführt. Nach jedem Frequenzwechsel wurden vier *dummy scans* verwendet und die Sättigungszeit des Proteins wurde auf eine Sekunde verkürzt. Der Relaxationsdelay wurde zusätzlich auf zwei Sekunden verlängert, damit sich ein Gleichgewicht zwischen Sättigungstransfer vom Protein zum bindenden Liganden und Relaxation des Liganden einstellt. Der Relaxationsdelay ist also länger als die Dauer der Vorsättigung.

Die Kreuzsignale sollten – abhängig vom Magnetisierungstransfer in der F1- und der F2-Dimension – unterschiedliche Intensitäten zeigen. Für zwei gekoppelte Spins I und S

kann ein Transfer I_x nach S_x und ein Transfer von S_x nach I_x stattfinden. Die Intensität des Kreuzsignal hängt somit von den Kopplungskonstanten und der Effektivität des Sättigungstransfers vom Ausgangsspin ab. Im STD TOCSY-Spektrum erscheinen, bis auf das H1/H2,3,4-Fuc-Kreuzsignal der 2'-Fucosyl-lactose, ausschließlich Signale der 3-Fucosyl-lactose. Somit wird nennenswert nur die 3-Fucosyl-lactose gebunden (Abb. 36).

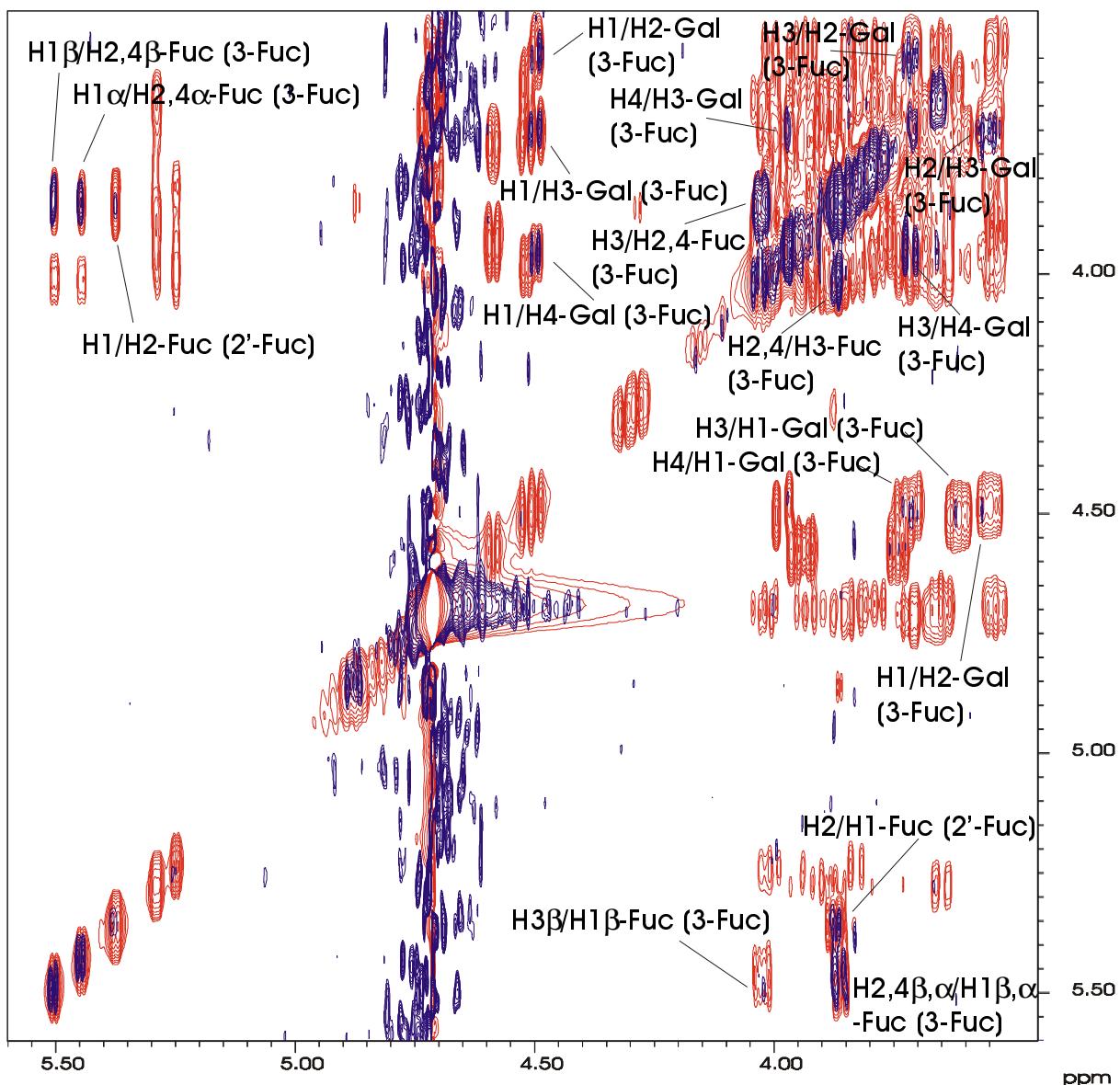


Abbildung 36: *Overlay plot* des STD TOCSY-Spektrums (blau) und des *off resonance* TOCSY-Spektrums (rot) der Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose, 3-Fucosyl-lactose und dem E-Selektin in einem Ligand/Protein Verhältnis je Komponente zu 100/1.

Das H1/H2, 3, 4-Fuc Kreuzsignal der 2'-Fucosyl-lactose zeigt in der F1-Dimension einen STD Effekt von 0.09 % und in der F2-Dimension 0.33 %. Der größere Effekt in der F2-Dimension ist durch die stärkere Beteiligung an der Bindung der Hydroxygruppen an 2-, 3- und 4-Position der Fucose zu erklären.

Die stärksten STD Effekte sind bei den Protonen der Fucose der 3-Fucosyl-lactose zu finden. In der F1-Dimension ergibt sich für das Kreuzsignal H1β/H2,4 und H1α/H2,4 ein Wert von 0.65 % bzw. 0.78 %. In der F2-Dimension liegen die Effekte mit 0.9 % und 2.6 % deutlich höher.

Offensichtlich ist der Sättigungstransfer zu den H2- und H4-Protonen der Fucose effektiver als der Transfer zum H1-Proton. Die STD Effekte des H2,4/H1α-Kreuzsignals sind aufgrund von Signalüberlagerung mit dem H2,4/H1β-Kreuzsignal in der F2-Dimension nicht exakt bestimmbar gewesen, so daß der hohe Wert von 2.6 % mit einem großen Fehler behaftet ist. Das H3/H2,4-Kreuzsignal zeigt mit 0.34 % in der F1-Dimension und 0.14 % in F2 einen geringeren STD Effekt. Das H3/H1-Kreuzsignal erscheint nur in F2. Das β -Anomer hat einen Wert von 0.62 % und das β -Anomer einen Wert von 0.32 %.

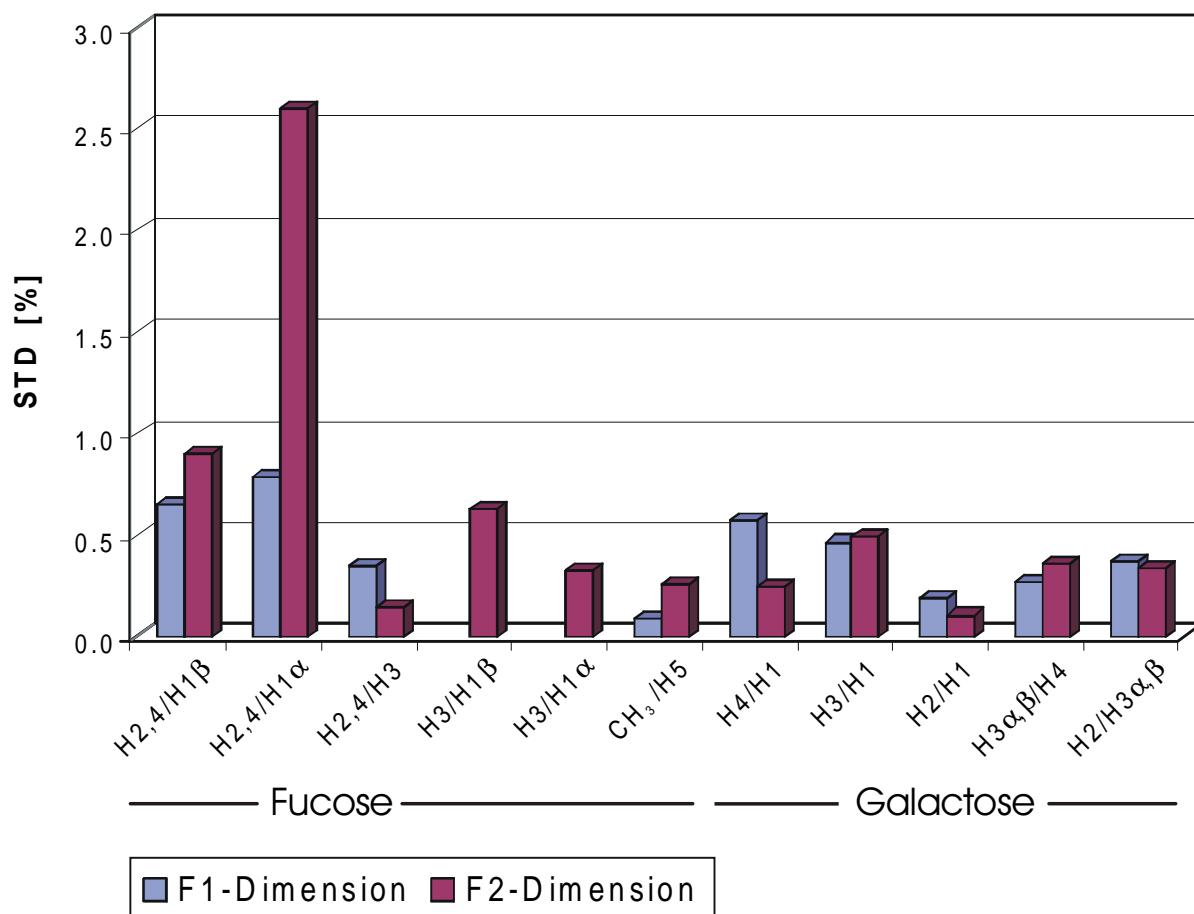


Abbildung 37: Dargestellt ist der prozentualer STD Effekt verschiedener Protonen der 3-Fucosyl-lactose. Die Integrale wurden in der F1- und in der F2-Dimension aus den entsprechenden Kreuzsignale des STD TOCSY-Experiments ermittelt. Der STD Effekt ist der prozentuale Anteil der Kreuzsignale relativ zum *off resonance* TOCSY-Spektrum.

Die Methylgruppe der Fucose zeigt nur im STD TOCSY ein Kreuzsignal, im eindimensionalen ¹H STD Spektrum ist nahezu kein Signal zu finden. Der STD Effekt liegt in F2 bei 0.25 % und in F1 bei 0.09 %.

Kreuzsignal 3-Fucosyl-lactose	STD [%] F2-Dimension	STD [%] F1-Dimension
H _{1β} /H _{2,4}	0.90	0.65
H _{1α} /H _{2,4}	2.60	0.78
H ₃ /H _{2,4}	0.14	0.34
H _{1β} /H ₃	0.62	-
H _{1α} /H ₃	0.32	-
H ₅ /CH ₃	0.25	0.09
H ₁ /H ₄	0.24	0.57
H ₁ /H ₃	0.49	0.46
H ₁ /H ₂	0.10	0.19
H ₄ /H _{3α,β}	0.36	0.27
H _{3α,β} /H ₂	0.33	0.37

Tabelle 13: STD Effekte [%] der 3-Fucosyl-lactose. Die prozentualen Werte wurden aus einem STD TOCSY-Spektrum und einem *off resonance* TOCSY ermittelt.

Die Kreuzsignale der Galactose-Protonen zeigen in der F1- und in der F2-Dimension ähnlich große STD Effekte. Am größten sind die H₁/H₄- mit 0.57 % und die H₁/H₃-Kreussignale mit 0.46 %. Im Gegensatz zum ¹H STD Spektrum sind im STD TOCSY-Spektrum keine STD Signale der H₅- und H₆-Protonen der Galactose zu erkennen. Der Magnetisierungstransfer vom H₅- zum H₆-Proton bzw. umgekehrt ist somit während der *spinlock*-Zeit im TOSCY-Experiment sehr ineffizient. Zumal die Diagonale starke Signale in diesem Verschiebungsbereich liefert.

Die Glucose zeigt keine STD Signale und ist somit nicht in direktem Kontakt zum E-Selektin.

In der Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose mit dem E-Selektin konnte eindeutig die 3-Fucosyl-lactose als die hauptsächlich bindende

Verbindung identifiziert werden. Darüber hinaus zeigte das *epitope mapping* der 3-Fucosyl-lactose mit Hilfe der STD-Spektroskopie ausschließlich Proteinkontakte der Fucose und der Galactose. Besonders stark sind die 1-, 2-, 3- und 4-Positionen der Fucose sowie die 1-, 3- und 4-Positionen der Galactose am Bindungsmodus beteiligt. Aus dem ^1H STD Spektrum ergibt sich auch eine Beteiligung der 6-Position der Galactose.

5.5 Theoretische Untersuchungen von E-Selektin-Ligand-Wechselwirkungen

Die NMR-Untersuchungen der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek ergaben als Hauptbindungspartner für das E-Selektin, die 1-2' und 1-6 verknüpfte Fucosyl-lactose. Zusätzlich befindet sich eine Sulfatgruppe in räumlicher Nähe des H3-Protons der 1-2' verknüpften Fucosyl-lactose. Bei der 1-6 verknüpfte Fucosyl-lactose wurden keine Hinweise zur Position der Sulfatgruppe ermittelt.

Zur weiteren Untersuchung des Bindungsmodus der bindenden Liganden ergeben sich drei Fragestellungen: Wie sieht die Konformation der bindenden Liganden in Lösung aus, in welcher Konformation werden die Liganden gebunden und entspricht diese Konformation dem Bindungsmodus vom Sialyl-Lewis x .

Zunächst soll ein Bindungsmodell der Bindung vom sLe x am E-Selektin erstellt werden. Danach erfolgt ein rationelles Design von sulfatierten Trisacchariden mit **LeapFrog** und anschließend wurde mit Hilfe von MMC-Simulationen überprüft, ob die Konformationen der Liganden mit den höchsten Bindungsenergien denen der in Lösung entspricht.

5.5.1 E-Selektin und sLe x – Ein Bindungsmodell

Bisher ist es noch nicht gelungen das E-Selektin zusammen mit dem Tetrasaccharid Sialyl-Lewis x im Komplex zu

kristallisieren. Die bioaktive Konformation des sLe x ist jedoch bekannt. Die Frage lautet nun: gibt es ein Bindungsmodus der mit der experimentell bestimmten Konformation des sLe x und den Strukturuntersuchungen am E-Selektin übereinstimmt?

Ausgangspunkt ist die Röntgenstruktur des E-Selektins und die NMR-Strukturen des Sialyl-Lewis x . Mit Hilfe des Programms FlexiDock wurde versucht, einen Bindungsmodus zu finden, dessen Wechselwirkungsenergie maximal ist.

Entscheidend für die Qualität des Bindungsmodells ist die Vorpositionierung des Liganden in der Bindungstasche. Da die CRD-Domäne des E-Selektins keine ausgeprägte Tasche besitzt, ergibt sich keine eindeutige Orientierung des sLe x .

Verschiedene Bindungsmodelle für sLe x und dessen Derivate wurden vorgestellt, in der die 3- und 4-Hydroxylgruppe der Fucose am Calcium koordiniert ist und die Sialinsäure in der Nähe von Tyr48, Arg97 und Lys113 lokalisiert ist^{49,99}. Zusätzlich wurde eine Wasserstoffbrücke von der 6-OH Gruppe des GalNAc zur OH-Gruppe des Tyr94 postuliert.

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Orientierungen des sLe x zum Calcium getestet. Auch hier ergab sich ein Bindungsmodus, der dem oben beschriebenen entspricht.

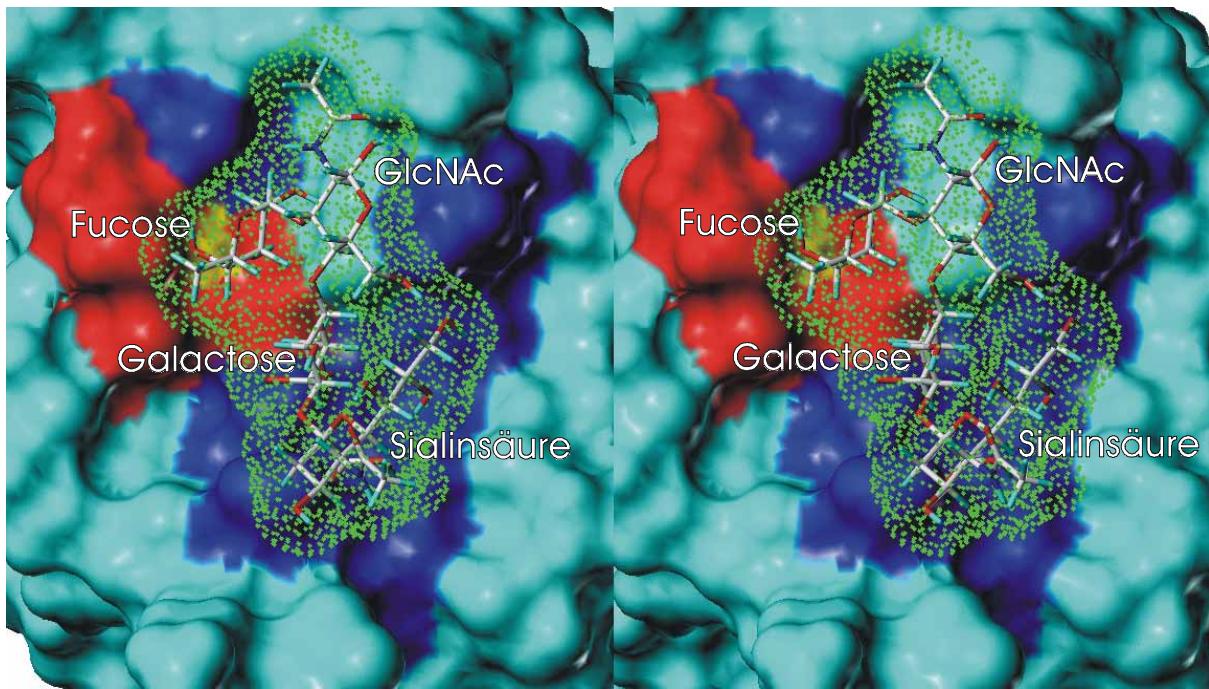


Abbildung 38: Stereodarstellung der E-Selektin Oberfläche als Connolly-Oberfläche (cyan). Die an der Calcium-Bindungsstelle beteiligten Aminosäuren sind rot eingefärbt. Die blauen Aminosäuren sind essentiell für die Bindung von sLe^x . Das Calcium ist gelb eingefärbt. Die Connolly-Oberfläche des Tetrasaccharids ist als grüne Punktoberfläche dargestellt.

Die Gesamtbindungsenergie, die als Bewertungskriterium von FlexiDock errechnet wurde, belief sich auf -98.82 kcal/mol. Die jeweiligen *docking*-Experimente wurden solange durchgeführt, bis die Bindungsenergie sich nicht weiter verbessert. In Abbildung 38 ist die relative Orientierung der Sialyl-Lewis x zum E-Selektin gezeigt. Die Bindungsregion des Proteins ist durch

eine Connolly-Oberfläche dargestellt. Die Connolly-Oberfläche des sLe^x ist als Punktoberfläche dargestellt. Zusätzlich sind die Bereiche der Aminosäuren, die essentiell für die Bindung des Tetrasaccharids sind, farblich markiert. Im Bindungsmodell korrespondieren die Kontaktstellen zwischen Protein und dem Tetrasaccharid mit den für die Bindung wichtigen Aminosäuren.

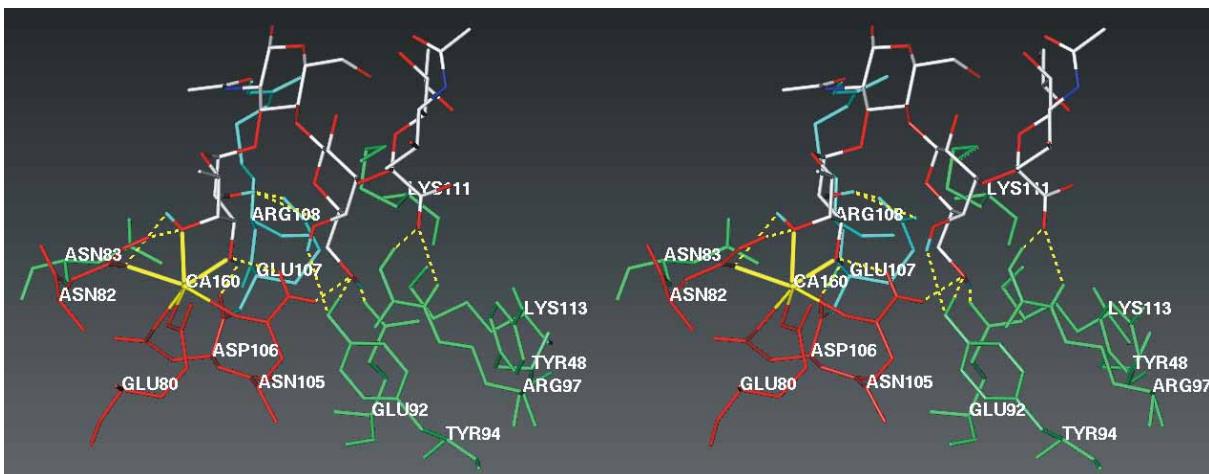


Abbildung 39: Stick-Modell des sLe^x in der E-Selektin Bindungsstelle. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Koordinierung beteiligt. Die grünen Aminosäuren sind für die Bindung des sLe^x essentiell. Die Bindung der Fucose erfolgt über Koordinierung der 3-OH und 4-OH-Gruppe am Calcium. Zusätzlich ist eine Wasserstoffbrücke von der 6-OH-Gruppe der Galactose zur OH-Gruppe des Tyr94 und zum Glu92 zu erkennen. Die Koordinierung der Carboxylgruppe der Sialinsäure erfolgt über die Guanidiniumgruppe der Seitenkette vom Arg97.

Im Bindungsmodell ist die Koordinierung der Fucose über die 3-OH und 4-OH Gruppe am Calcium und die Koordinierung der Carboxylgruppe der Sialinsäure an der Guanidiniumgruppe vom Arg97 von Bedeutung. Dieser Bindungsmodus wird der Fucose-Spezifität des E-Selektins und dem Vorhandensein einer negativen Ladung am Liganden zur Stabilisierung der Bindung gerecht. Eine Reihe von Wasserstoffbrücken erhöhen zusätzlich die Bindungsenergie. Die 6-OH Gruppe der Galactose bildet Brücken zum Glu92, Tyr94 und zum Asn105 aus, die 4-OH Gruppe zeigt Kontakte zum Tyr94. Der Sauerstoff der Acetylgruppe des GlcNAc ist in der Nähe der Aminogruppe des Arg108. Die Fucose bildet neben der Koordinierung am Calcium mehrere Wasserstoffbrücken. Die 2-OH Gruppe zeigt Interaktionen mit dem Glu107, die 3-OH Gruppe wechselwirkt mit dem Asn105 und dem Asp 106 und die 4-Hydroxyl-Funktion zeigt Kontakte zum Asn82.

Generell ist die Bindungsregion des E-Selektin keine Bindungstasche im eigentlichen Sinn. Es gibt keine richtige

Kavität, in der dieser Ligand passgenau an-docken kann. Vielmehr stellt die Bindungsstelle ein Plateau am Ende der lec-Domäne dar. In Abbildung 40 ist eine separierte Oberfläche dargestellt. Gezeigt ist hier – ausgehend von jedem Atom des Tetrasaccharids in einem Radius von 10 Å – eine Oberfläche die farblich den Abstand zum jeweils nächsten Atom des Proteins markiert. Gut zu erkennen ist, daß die direkte Kontaktfläche zum Protein, fast nur unter dem sLe^x zufinden ist. Besonders das N-Acetylglucosamin (grün) und der Seitenarm der Sialinsäure (blau) zeigen wenig Kontakte zum E-Selektin. Somit liegt das Tetrasaccharid relativ flach auf dem E-Selektin. Bemerkenswert ist die Orientierung der Zuckereinheiten. Die Flächen der Zuckerringe stehen fast orthogonal zur Oberfläche des Proteins. Die Diederwinkel der glycosidischen Bindung, die sich aus dem docking-Modell ergeben, stimmen bis auf die Winkel der Fucose sehr gut mit denen aus den transferred-NOE Messungen erhaltenen Werten überein⁵¹.

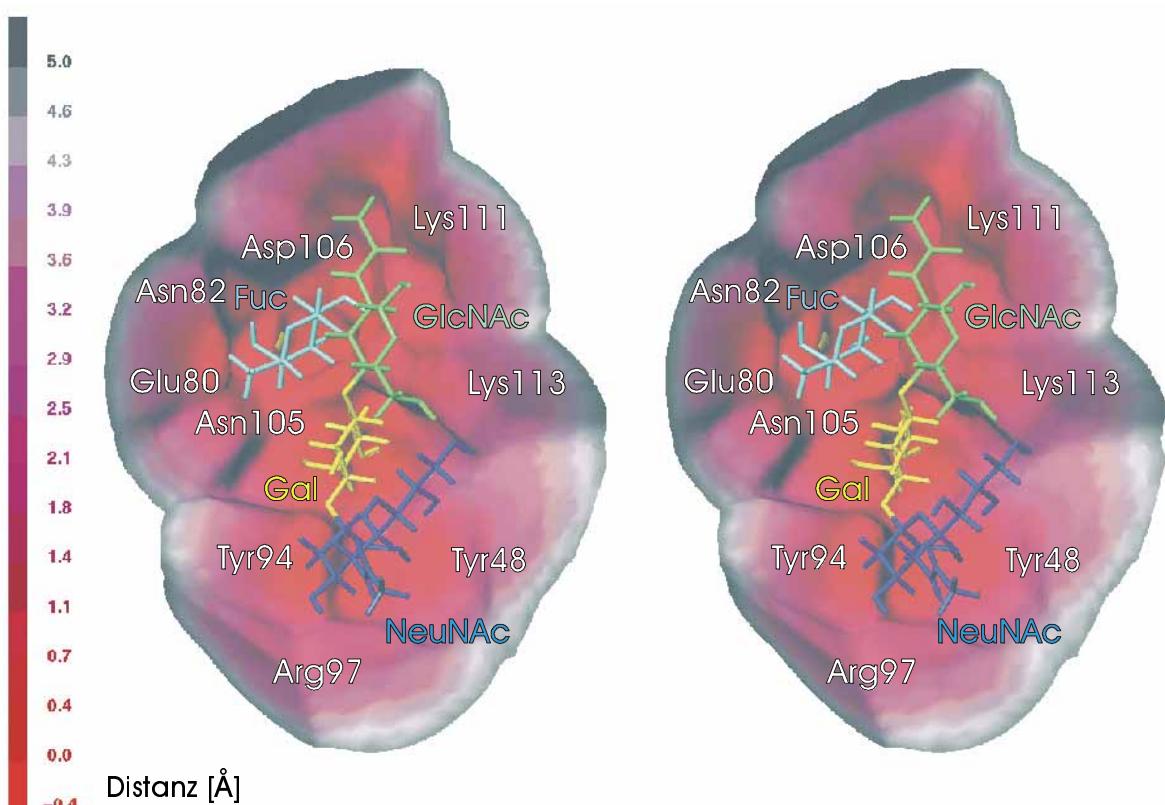


Abbildung 40: Stereodarstellung einer separierten Oberfläche zwischen dem E-Selektin und dem Sialyl-Lewis^X. Die Farbkodierung der Abstände zum Protein ist links dargestellt. Die Zuckereinheiten sind ebenfalls farblich markiert: die Fucose ist cyan, das N-Acetylglucosamin grün, die Galactose gelb und die Sialinsäure blau eingefärbt.

Die glycosidischen Winkel der α -L-Fuc-(1-3)- β -D-GlcNAc Verknüpfung weichen für den ϕ -Winkel um 16° und für den ψ -Winkel um 11° von der NMR-Struktur⁵¹ ab (Tab. 14). Gezeigt ist die NMR-Struktur, deren Diederwinkel dem Bindungsmodell am nächsten liegt.

	ϕ (H1-C1-O1-Cx, für NeuNAc C1-C2-O2-Cx)	ψ (C1-O1-Cx-Hx, für NeuNAc C2-O2-Cx-Hx)	
NeuNAc/Gal	-75°	$76^\circ \pm 10^\circ$	11°
Gal/GlcNAc	39°	$39^\circ \pm 10^\circ$	8°
Fuc/GlcNAc	54°	$38^\circ \pm 7^\circ$	37°
			$26^\circ \pm 6^\circ$

Tabelle 14: Glycosidische Winkel von Sialyl-Lewis^X. Die grau unterlegten Spalten geben die Werte aus dem Bindungsmodell wieder. Die Spalten jeweils rechts daneben zeigen die Werte aus einer NMR-Struktur⁵¹.

5.5.2 De novo-Design von Liganden mit LeapFrog

Ziel des rationalen Design mit LeapFrog war der Entwurf eines Bindungsmodells der α -L-Fucosyl-(1-6)-lactose und der α -L-Fucosyl-(1-2)-lactose, die als bindende Liganden aus den STD NMR Experimenten identifiziert wurden.

Im Gegensatz zu FlexiDock, das ein reines *docking* Programm ist, bietet LeapFrog die Möglichkeit ausgehend von einer Proteinstruktur, bekannte Liganden oder auch völlig neue Molekülstrukturen zu generieren und ihre jeweilige Bindungscharakteristik zu untersuchen.

Ausgehend von der Kristallstruktur des E-Selektins wurde die Bindungsregion in Form eines Kubus mit den Dimensionen $20 \text{ \AA} \cdot 14 \text{ \AA} \cdot 21 \text{ \AA}$ ausgewählt. Zunächst erfolgt ein *mapping* der Proteinoberfläche, in dem ein Ligand in einer beliebigen Position auf der Oberfläche des Proteins positioniert wird. Der dreidimensionale Raum der Bindungsregion wird dabei in Würfel mit einer Kantenlänge von 0.25 \AA eingeteilt. Nun wird die Bindungsenergie für jedes Ligandatom zu allen Proteinatomen in der vorher definierten Bindungsregion berechnet. Die Berechnung erfolgt mit der Annahme, daß das jeweilige Ligandatom innerhalb des Würfels liegt. Wenn ein

Ligandatom den Würfel aufgrund von strukturellen Veränderungen verläßt oder ein Atom hinzukommt, wird die Bindungsenergie nur für dieses Segment neu berechnet. Dadurch wird die Simulationsgeschwindigkeit drastisch erhöht. Beim *mapping* der Proteinoberfläche werden sogenannte *sitepoints* generiert. Diese *sitepoints* sind optimale Positionen für Ligandatome (als Sonde wird sp^3 -hybridisierter Kohlenstoff verwendet) mit entgegengesetzten Vorzeichen der Ladung zu den Atomen des Proteins und mit einer optimalen sterischen Umgebung. Folgende Energieterme, die zur Berechnung der Bindungsenergie verwendet wurden, sind nachstehend aufgelistet:

- 1) Sterische-, elektrostatische- und Wasserstoffbrücken-Energien des Ligand-Protein-Komplexes. Desolvationsenergie der Kavität
- 2) Inkrementelle Wasserstoffbrücken-Energie
- 3) Ligand Desolvatations-Energie

Die eigentliche funktionelle Vielfalt dieses Programms beginnt jedoch erst mit der Generierung und Optimierung von Liganden. Dadurch, daß eine Modifikation des Liganden zu einer Erhöhung der Bindungsenergie führen soll, sind die Modifikationen verschiedenster Natur. Diese Modifikationen sind als sogenannte *moves* definiert. Welche dieser *moves* und mit welcher Frequenz sie eingesetzt werden, sind der Intuition des Anwenders überlassen. Nur wenn eine dieser Modifikationen zur einer Struktur führt, die eine höhere Bindungsenergie besitzt, wird diese Struktur als neue Ausgangsstruktur für den nächsten Schritt akzeptiert. Ein kurze Überblick über die *moves* wird im Folgenden gegeben.

Bridge	Verknüpfung von zwei Liganden (direkt oder mit Molekülen aus der Fragmentbibliothek)
Complement	Komplementäre Gruppen werden als neue Liganden hinzugefügt (z.B. eine Carboxylgruppe wird an der Guanidiniumgruppe eines Arg vom Protein positioniert)
Crossover	Genetischer Schritt zur Kombination von bereits bestehenden Liganden
Fly	Translation und Rotation des Liganden
Fuse	Verknüpfung von Ringsystemen

Join	Verknüpfung von Ligand und Fragment
New	Ein Fragment wird an einem <i>sitepoint</i> des Proteins positioniert
Prune	Entfernt Molekülteile eines Liganden, die eine definierte Bindungsenergie unterschreiten
Refine	Substitution von multivalenten Atomen
Save	Abspeichern von Liganden, deren Bindungsenergie kleiner als ein definierten Wert ist
Twist	Variation von Torsionswinkel, interner <i>minimizer</i>
Weed	Entfernt Liganden mit niedrigen Bindungsenergien

Tabelle 15: Übersicht der *moves* in der LeapFrog Strategie.

Das Ergebnis ist ein Satz von Liganden, die in diesen iterativen Prozeß die besten Bindungsenergien zeigen. Je nach Strategie kann die Simulation zur Optimierung von bereits bestehenden Liganden oder zur Erzeugung einer möglichst großen strukturellen Diversität der Liganden eingesetzt werden. Die Fucosespezifität des E-Selektins mit der Koordinierung am Calcium war Ausgangspunkt des rationalen Designs der Liganden. Konnte diese Spezifität mit der LeapFrog Strategie wiedergefunden werden?

Um dies zu klären wurde die α -L-Fucose an einer beliebigen Position auf die Proteinoberfläche der Bindungsregion gelegt. Für diesen ersten Teil der Simulation wurden nur fly, twist und save Kommandos verwendet. Die maximale Translation pro Freiheitsgrad wurde auf 10 Å gesetzt um die gesamte Bindungsregion abzusuchen. Die Rotation um die drei Achsen wurde für eine größtmögliche Beweglichkeit des Liganden, auf maximal 360° festgelegt. Nach einer Million *moves* endete die Simulation mit einer Struktur, in der die Fucose mit der 3-OH und 4-OH Gruppe am Calcium koordiniert ist. Nach einer weiteren Million Schritte änderte sich die Position nicht mehr. Für den Optimierungs-Prozeß wurden weitere 200000 Schritte mit 1 Å maximaler Translation und 45° maximaler Rotation gerechnet. Der Bindungsmodus änderte sich noch geringfügig, wobei sich die Bindungsenergie von -51.056 kcal/mol auf -63.14 kcal/mol verbesserte. Die Abstände der Fucose-Sauerstoffatome der 3- und 4-Position zum Calcium betragen 2.15 Å und 2.12 Å. In Abbildung 41 ist die Bindungsgeometrie dargestellt.

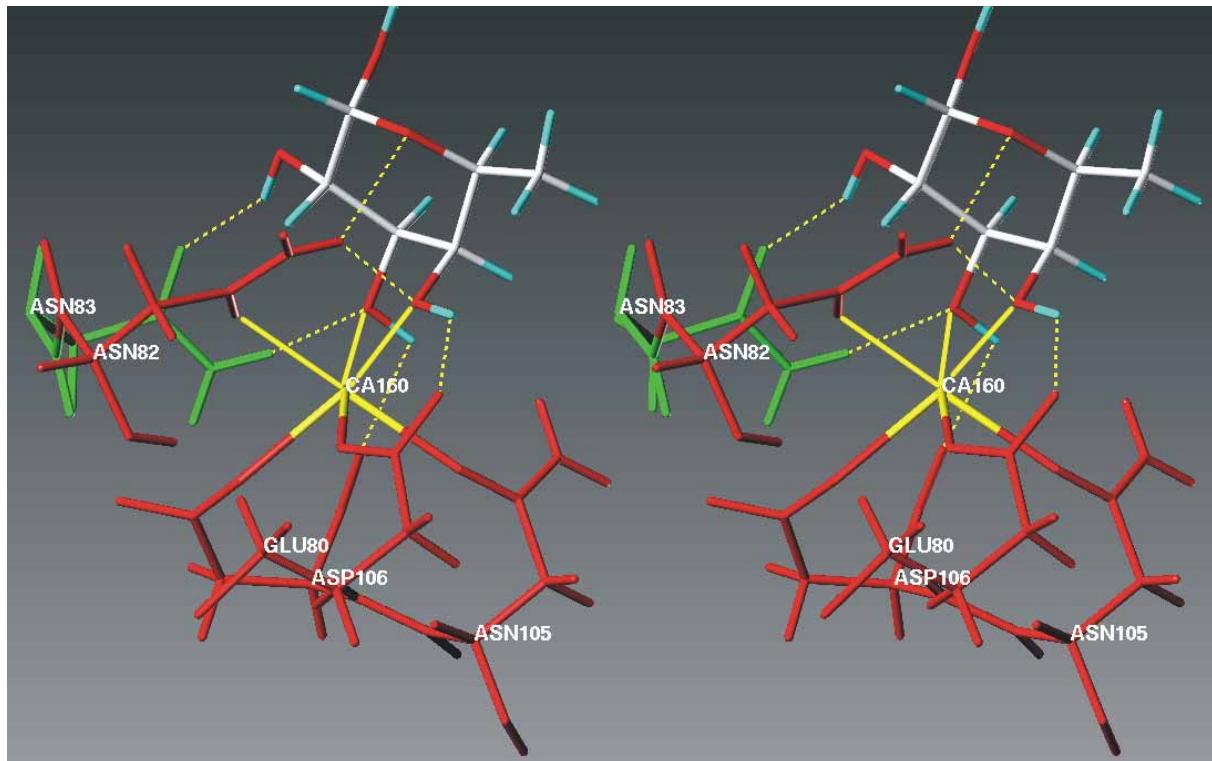


Abbildung 41: Stereoplot des Bindungsmodells der α -L-Fucose am Calcium des E-Selektins.

Das Calcium ist sechsfach koordiniert, wobei zwei Positionen von der Fucose belegt sind. Die anderen Positionen sind vom Asn82, Glu80, Asn105 und Asp106 abgedeckt. Zusätzlich erfolgt eine Bindungsstabilisierung durch Wasserstoffbrücken der 2-OH Gruppe zum Asn83, der 3-OH Gruppe zum Asn83 und zum Asp106 und der 4-OH Gruppe zum Asn82 und Glu80. Gegenüber dem Bindungsmodus des sLe^x ergibt sich eine leichte Abweichung in der Position der Fucose. Die Fucose ist um ca. 10° um das C4 Ringatom in Richtung Calcium geneigt.

Ausgehend von diesem Bindungsmodell wurde ein Fragmentbibliothek erzeugt, die eine Lactoseeinheit beinhaltet. Die Konformation der Lactose wurde mit Hilfe einer MMC-Simulation ermittelt. Alle Verknüpfungsvarianten der C1-Position der α -L-Fucose mit der Lactose, bis auf die eins Position der Glucose (in der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek ist die C1-Position der Glucose mit dem C₈-spacer verknüpft), waren erlaubt. Für die 6,6'-Positionen wurden jeweils alle drei gestaffelten Kon-

formationen freigegeben. Zusätzlich mußte die Dimension der Bindungsregion vergrößert werden. Die Abmessungen der Box wurde auf 26 Å · 22 Å · 28 Å gesetzt.

Der join *move* wurde nun zur Verknüpfung der Lactose an die α -L-Fucose verwendet. Für jeden *move* wurde ein *gridsearch* mit einer Schrittweite des ψ -Winkels von 1° durchgeführt. Alle Verknüpfungsvarianten wurden anschließend weiter optimiert. Mit insgesamt 500000 Schritten, die nur aus *twist*, *fly* und *save moves* bestanden, konnten folgende Bindungsenergien generiert werden.

Verknüpfung	Bindungsenergie [kcal/mol]
α -L-Fucose	-65.22
1-2-Fucosyl-lactose	-34.48
1-3-Fucosyl-lactose	-65.59
1-6-Fucosyl-lactose	-81.14
1-2'-Fucosyl-lactose	-45.97
1-3'-Fucosyl-lactose	-44.27
1-4'-Fucosyl-lactose	-54.54
1-6'-Fucosyl-lactose	-75.83

Tabelle 16: Bindungsenergien der Verknüpfungsvarianten.

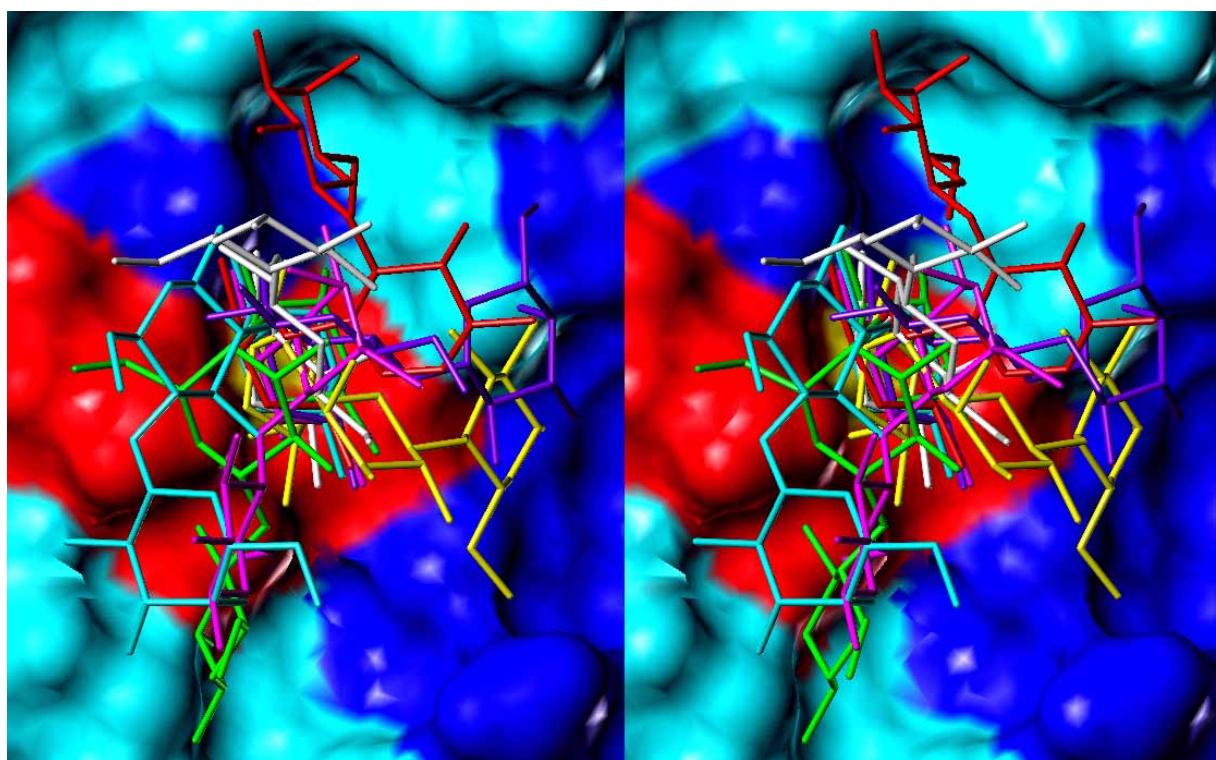


Abbildung 42: *Stereoplot* aller optimierten Verknüpfungsvarianten der α -L-Fucose mit der Lactose. Das Protein wird als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Bindung beteiligt, die dunkelblau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Die einzelnen Strukturen sind wie folgt gekennzeichnet: 1-2: cyan, 1-3: violett, 1-6: rot, 1-2': magenta, 1-3': weiß, 1-4': grün, 1-6': gelb (vgl. Tab. 16).

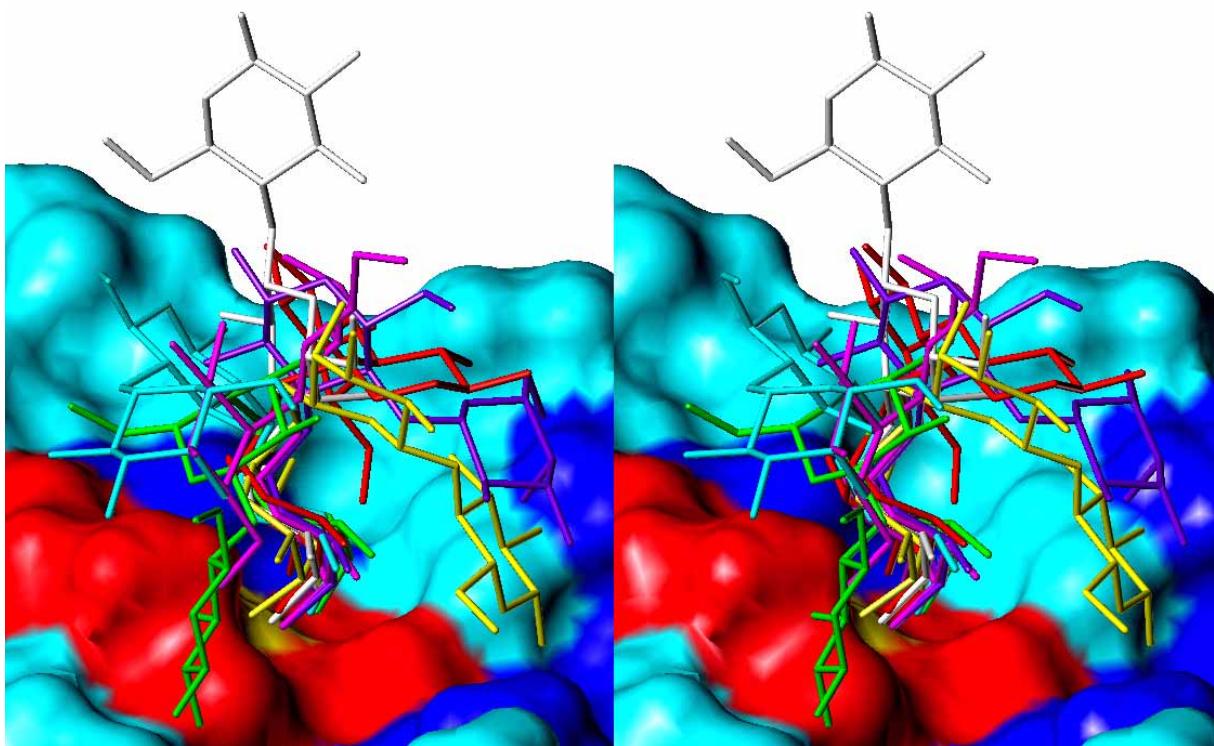


Abbildung 43: Wie Abbildung 42, seitliche Darstellung.

Bei allen computergenerierten Komplexen ist die Fucose am Calcium plaziert. Die größten Bindungsenergien ergaben sich für die 1-6- und 1-6'-Verknüpfungsvarianten. Die 1-2 verknüpfte Struktur besaß mit -34.49 kcal/mol die schlechteste Bindungsenergie. Die Orientierung des zweiten Monosaccharids, gezählt in der Reihenfolge nach der Verknüpfung mit der Fucose, ist bei den 1-3 und 1-6' verknüpften Verbindungen ähnlich. Dieser Bindungsmodus kommt dem vom Sialyl-Lewis^x am nächsten. Eine zweite Gruppe bilden die 1-2, 1-2' und 1-4' verbrückten Strukturen. Die 1-6 verknüpfte Variante zeigt mit der größten Bindungsenergie von -81.15 kcal/mol eine um 180° gedrehte Position der zweiten Zuckereinheit gegenüber dem Bindungsmodell vom sLe^x. Eine fast senkrechte Anordnung des Trisaccharids zur Oberfläche des E-Selektins bildet die 1-3' Struktur. Im nächsten Schritt soll die optimale Position und Verknüpfung von Sulfatgruppen an der Lactose ermittelt werden. Ausgehend von den im vorherigen Schritt generierten Liganden, sind alle Positionen der Lactose bis auf die 1-Position zugänglich. Zusätzlich wurden alle Kombinationen der gestaffelten Konformationen des ω -Winkels berücksichtigt. Somit ergibt

sich für die Liganden, bei denen die 6- und 6'-Position frei ist, neun Möglichkeiten der Anordnung. Insgesamt ergaben sich 51 Liganden, die virtuell sulfatiert wurden (Mehrfachsulfatierung war möglich). Die verwendete Sulfatgruppe wurde unproto-niert eingesetzt, somit lieferte der sp₃-hybri-disierte Sauerstoff als direkter Wechselwirkungspartner mit Wasserstoffbrücken-Do-natoren und partiell positive geladenen Atomen die größten Bindungsenergien. Über ein join Kommando wurde die Sulfatgruppe an alle relevanten Positionen der Lactose gesetzt. Parallel dazu wird eine Optimierung der Orientierung des Liganden über twist und fly Kommandos durchge-führt. Nach 86000 *moves* ergaben sich 187 Liganden. Alle Liganden, die eine schlechtere Bindungsenergie als -34 kcal/mol besaßen, wurden nicht weiter optimiert. Mit den restlichen 137 Liganden wurde anschließend eine Optimierung der Konformation und der Position in der Bindungsregion durchge-führt. Mit 185000 fly, twist und save *moves* wurde der Design-Prozeß mit LeapFrog beendet. In Tabelle 17 sind für jede Verknüpfungsvariante nur jeweils die fünf be-sten Strukturen und zusätzlich die monosul-fatierten Verbindungen aufgelistet.

Verknüpfung (Sulfatierungsmuster)	Bindungsenergie [kcal/mol]
1-2-Fucosyl-lactose	-34.46
1-3-Fucosyl-lactose	-66.52
6'-O-Sulfat	-113.37
4',6'-Di-O-sulfat	-120.08
3',4',6'-Tri-O-sulfat	-121.42
2',3',4',6'-Tetra-O-sulfat	-127.59
6,3',4',6'-Tetra-O-sulfat	-125.99
2,2',3',4',6'-Penta-O-sulfat	-122.84
1-2'-Fucosyl-lactose	-47.11
4'-O-Sulfat	-93.64
3'-O-Sulfat	-77.09
6'-O-Sulfat	-43.68
3',6'-Di-O-sulfat	-71.00
3,3'-Di-O-sulfat	-61.16

1-3'-Fucosyl-lactose	-44.52
1-4'-Fucosyl-lactose	-59.73
1-6-Fucosyl-lactose	-87.53
3-O-Sulfat	-115.67
4',6'-Di-O-sulfat	-140.10
3',4',6'-Tri-O-sulfat	-145.88
2,3',4',6'-Tetra-O-sulfat	-141.57
3,2',3',4'-Tetra-O-sulfat	-139.71
2,3,3',6'-Tetra-O-sulfat	-138.83
1-6'-Fucosyl-lactose	-76.10
2-O-Sulfat	-98.23
3,2'-Di-O-sulfat	-75.45
2,6,4'-Tri-O-sulfat	-75.82
2,3,6,4'-Tetra-O-sulfat	-135.58
3,2',4',6'-Tetra-O-sulfat	-133.00

Tabelle 17: Ergebnisse des Design-Prozeß mit LeapFrog. Gezeigt sind die Fucosyl-lactose Verknüpfungsvarianten und deren Sulfatierungsmuster mit den entsprechenden Bindungsenergien. Die grau unterlegte Struktur (1-6-Fucosyl-3',4',6'-Tri-O-sulfo-lactose) zeigt die größte Bindungsenergie (-145.88 kcal/mol)

Die unsulfatierten 1-2-, 1-2'- und 1-3'-Fucosyl-lactosen zeigen mit -34.46 kcal/mol, -47.11 kcal/mol und -44.52 kcal/mol die geringsten Bindungsenergien. Die virtuelle Sulfatierung der 1-3'- und 1-2'- Variante ergab keine Steigerung der Bindungsenergie. Die 1-2'-Fucosyl-lactose zeigt für das 4'-O-sulfat eine deutliche Verbesserung der Bindungsenergie um 46.53 kcal/mol auf -93.64 kcal/mol. Die anderen Sulfate ergaben nur moderate Steigerungen um maximal 29.98 kcal/mol. Für die 1-4'- Verknüpfungsvariante ergab sich ein Energiewert von -59.73 kcal/mol. Die anschließende virtuelle Sulfatierung führte zu keiner Verbesserung der Bindungsenergie. Von den noch verbleibenden unsulfatierten Trisacchariden zeigte die 1-6 verknüpfte Verbindung (-87.53 kcal/mol), gefolgt von der 1-6' (-76.10 kcal/mol) und 1-3-Variante (-66.52 kcal/mol), die höchste Bindungsenergie. Den größten Einfluß einer Sulfatierung ergab sich bei der 1-3-Fucosyl-lactose. Hier steigerte sich die Bindungsenergie für das 6'-O-Sulfat um 46.85 kcal/mol auf -113.37 kcal/mol. Das 2',3',4',6'-Tetra-O-sulfat änderte seine Bindungsenergie um 61.38 kcal/mol auf -127.59 kcal/mol. Das 4',6'-Di-O-sulfat hat mit -120.08 kcal/mol ebenfalls eine hohe Wechselwirkungsenergie. Eine Mehrfachsulfatierung der 1-6-Fucosyl-lactose führte zum 3',4',6'-Tri-O-sulfat, das mit -145.88 kcal/mol (Abb. 44, 45) insgesamt die höchste Affinität zum

E-Selektin aufweist. Alle weiteren mehrfach sulfatierten Verbindungen zeigen Werte zwischen -130 kcal/mol und -140 kcal/mol. Das Monosulfat an 3-Position besitzt den höchsten Wert von allen monosulfatierten Liganden (-115.67 kcal/mol). Als letzte Verknüpfungsvariante ergab sich für die 1-6'-Fucosyl-lactose die größte Bindungsenergie von -76.10 kcal/mol. Die virtuelle Sulfatierung dieses Liganden führte nur beim 2-Sulfat (-98.23 kcal/mol) und bei den Tetrasulfaten zu einer Steigerung der Bindungsstärke (2,3,6,4'-Tetra-O-sulfat -135.58 kcal/mol, 3,2',4',6'-Tetra-O-sulfat -133.00 kcal/mol).

Betrachtet man das Ergebnis der Simulation zeigt die 1-6-Fucosyl-lactose und deren sulfatierte Derivate die größten Bindungsenergien. An zweiter Stelle rangieren die 1-6'-Fucosyl-lactose Varianten und an dritter Position die 1-3-Fucosyl-lactosen. Betrachtet man nur die Monosulfate ergibt sich ein etwas anderes Bild. Das 3-O-Sulfat der 1-6-Fucosyl-lactose zeigt mit -115.67 kcal/mol die größte Bindungsenergie. Gefolgt vom 6'-O-Sulfat der 1-3-Fucosyl-lactose (-113.37 kcal/mol) und dem 2-O-Sulfat der 1-6'-Fucosyl-lactose (-98.23 kcal/mol). An vierter Position liegt die 1-2'-Fucosyl-4'-O-sulfo-lactose (-93.46 kcal/mol). Nur geringfügig schlechter ist das 2'-O-Sulfat der 4'-Fucosyl-lactose (-92.57 kcal/mol). Den Abschluß bildet das 6'-O-Sulfat der 1-3'-Fucosyl-lactose (-41.94 kcal/mol).

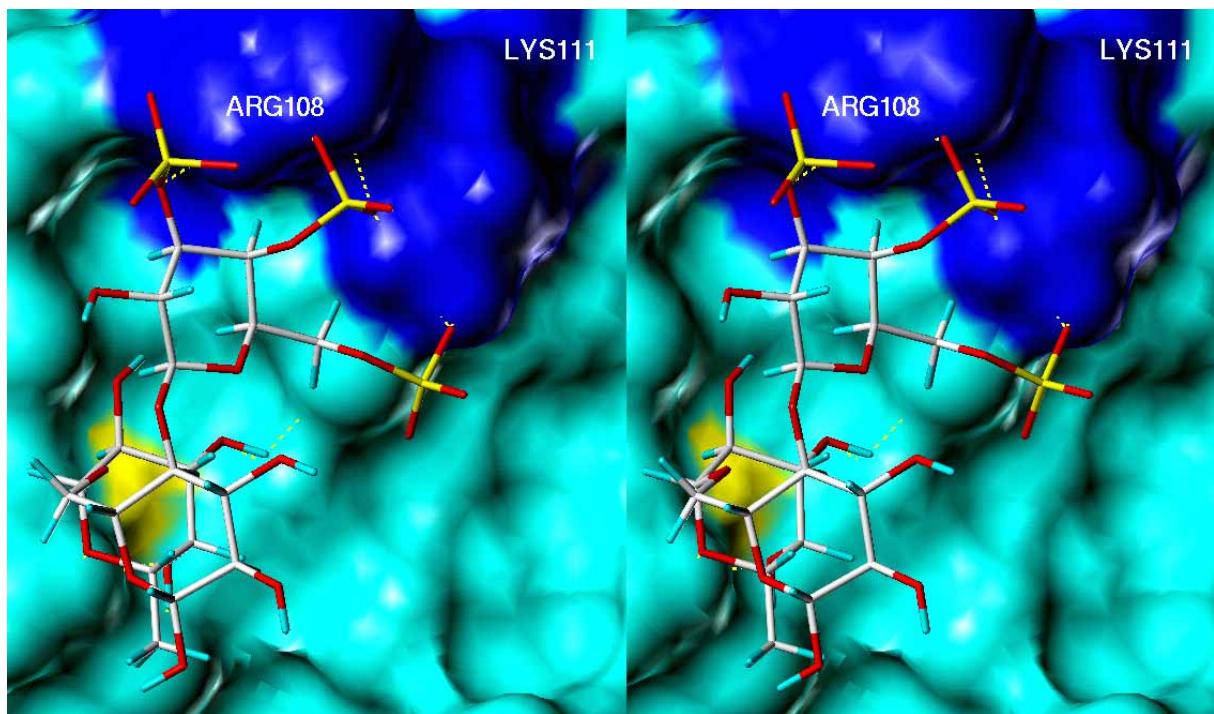


Abbildung 44: Das 3',4',6'-Tri-O-sulfat der 1-6-Fucosyl-lactose ist mit einer Bindungsenergie von -145.88 kcal/mol als beste Struktur aus dem Design-Prozeß mit LeapFrog hervorgegangen. Das E-Selektin ist als Conolly-Oberfläche dargestellt. Das Arg108 und das Lys111 zeigt mit der Guanidinium- und Amino-Funktion direkte Kontakte zu den Sulfatgruppen. Die Fucose ist am Calcium koordiniert. Die Wassersstoffbrücken sind als gelbe gestrichelte Linien dargestellt. Das Calcium ist gelb eingefärbt.

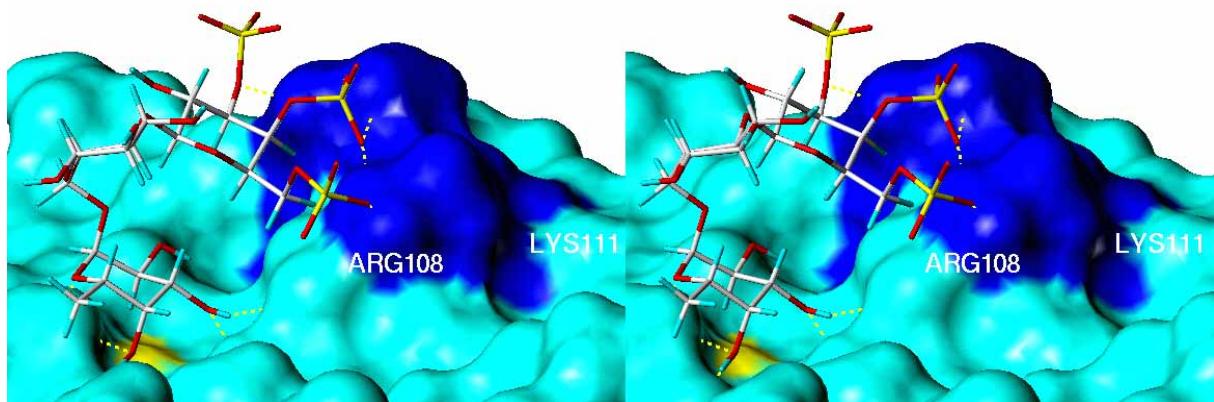


Abbildung 45: Wie Abbildung 44, seitliche Darstellung.

In der 1-6-Fucosyl-3',4',6'-tri-O-sulfo-lactose liegen die beiden Pyranoseringe der Fucose und Glucose fast parallel übereinander. Die Hauptwechselwirkungsenergie ergibt sich aus den Kontakten der Fucose zum Calcium und aus den Kontakten zwischen den Sulfatgruppen der Galactose zum Arg108 und zum Lys111.

In allen generierten Strukturen ist die Fucose am Calcium positioniert. Lediglich

eine Rotation der Fucose um das Calcium ist zu beobachten. Die Koordinierung erfolgt aber bei allen Strukturen über die 3-OH- und 4-OH-Gruppe der Fucose.

Zusammenfassend zeigen alle Fucosyl-lactosen, bis auf die 1-3', 1-4' und 1-2 verknüpfte Fucosyl-lactose, eine Steigerung der Bindungsenergie nach der virtuellen Sulfatierung.

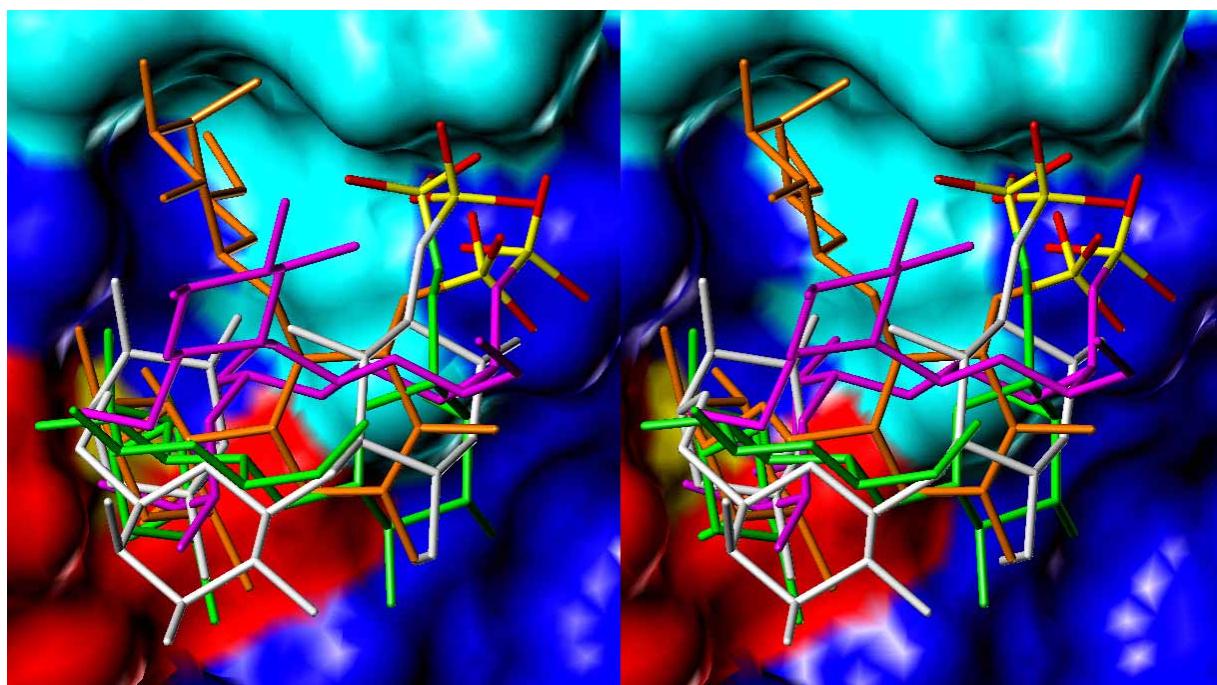


Abbildung 46: Stereoplot der monosulfatierten Verbindungen. Die Verknüpfungsvarianten sind wie folgt farblich markiert: 1-3-Fucosyl-6'-O-sulfo-lactose: grün, 1-2-Fucosyl-4'-O-Sulfo-lactose: magenta, 1-6-Fucosyl-3-O-sulfo-lactose: orange, 1-6'-Fucosyl-2-O-sulfo-lactose: weiß. Das Protein wird als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Bindung beteiligt, die dunkelblau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Das Calcium ist gelb eingefärbt.

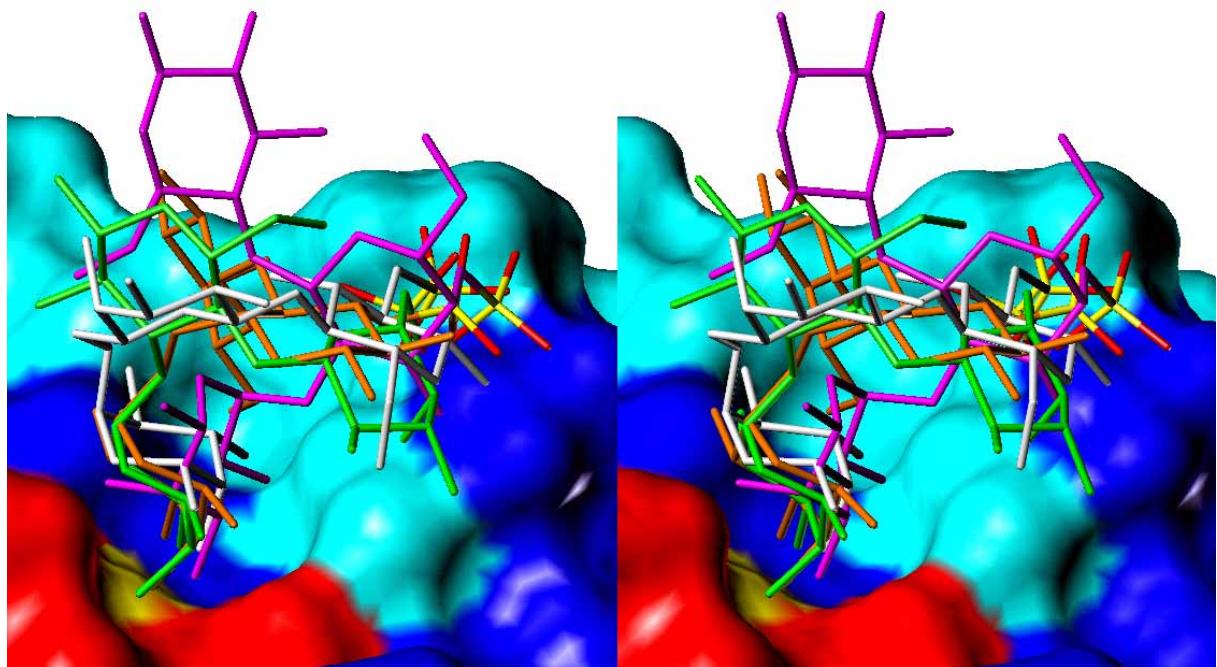


Abbildung 47: Wie Abbildung 46, seitliche Darstellung.

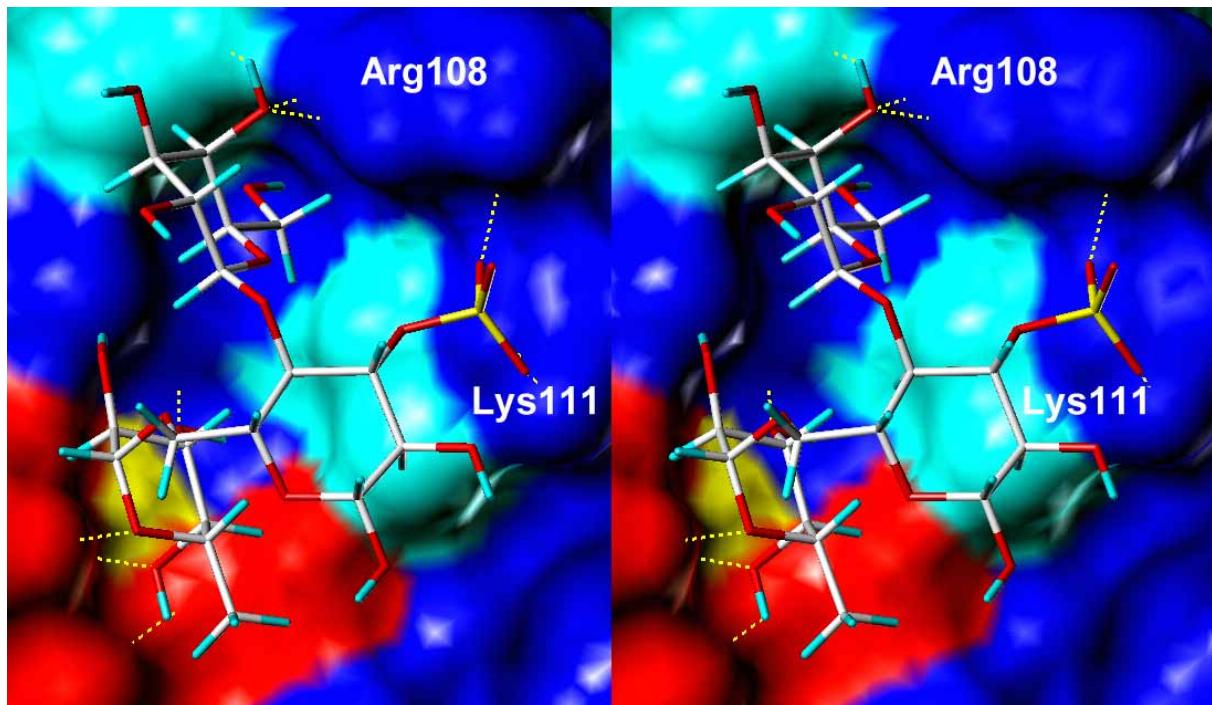


Abbildung 48: Stereodarstellung des 3-O-Sulfat der 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose. Dieser Ligand zeigt mit -115.67 kcal/mol die höchste Bindungsenergie der monosulfatierten Verbindungen. Die Fucose ist am Calcium koordiniert. Die Wasserstoffbrücken sind als gelbe gestrichelte Linien dargestellt. Das Protein wird als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Bindung beteiligt, die blau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Das Calcium ist gelb eingefärbt. Zusätzlich ist das Arg108 blau gefärbt.

Der Design-Prozeß mit LeapFrog ergab das 3-O-Sulfat der 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose als besten monosulfatierten Liganden. Die Bindungsenergie beläuft sich auf -115.67 kcal/mol (Abb. 48). Die Differenz zwischen dem unsulfatierten Derivat und der sulfatierten Verbindung beträgt 28.14 kcal/mol. Somit ist die Affinität zum Protein bereits ohne Sulfatgruppe hoch. Ausschlaggebend für diese hohe Bindungsenergie ist neben der Koordinierung der Fucose am Calcium, die Lage der Hydroxymethylgruppe der Galactose. Die Hydroxymethylgruppe liegt direkt in einer Ausbuchtung zwischen dem Arg108 und dem Calcium. Der Pyranose-ring steht dabei orthogonal zum Protein und bildet mit der 4-OH-Gruppe Wasserstoffbrücken zum Arg108 und zum Glu88 aus. Die Sulfatgruppe ist ähnlich zu den anderen monosulfatierten Strukturen positioniert. Sie liegt zwischen dem Lys111 und dem Arg108.

Vergleicht man die Strukturen der unsulfatierten Trisaccharide (Abb. 42) mit

den monosulfatierten Verbindungen, ergeben sich sehr ähnliche glycosidische Diederwinkel. Die maximale Abweichung beträgt ca. 14° . In Tabelle 18 sind die Diederwinkel aufgelistet. Somit hat die Sulfatierung keinen großen Einfluß auf die dreidimensionale Gestalt der Trisaccharide.

Dennoch kann aufgrund einer Sulfatierung eine räumliche Umorientierung der Trisaccharide erfolgen. Besonders deutlich wird dies bei der 1-2' verknüpften Fucosyl-lactose. Hier vollzieht der Ligand eine Rechtsdrehung um ca. 90° , so daß die Galactose nicht mehr über der Fucose steht sondern zum Lys111 ausgerichtet ist (Abb. 49). Die Sulfatgruppe, die an 4'-Position verknüpft ist, kann in dieser Anordnung optimal mit den basischen Seitenketten wechselwirken.

Verknüpfung: Lactose	ϕ [°] Gal	ψ [°] Gal	ϕ [°] Fuc	ψ [°] Fuc
1-2'-Fucosyl-lactose	73.2	-27.2	39.6	-63.3
1-3'-Fucosyl-lactose	52.3	4.5	62.2	-18.7
1-4'-Fucosyl-lactose	59.5	-2.5	41.8	-134.7
1-6'-Fucosyl-lactose	47.9	1.5	61.3	99.0
1-2-Fucosyl-lactose	63.6	-0.6	38.8	-136.9
1-3-Fucosyl-lactose	76.7	24.1	59.0	25.1
1-6-Fucosyl-lactose	69.4	1.8	71.6	137.5

Verknüpfung: Lactose, Sulfat	ϕ [°] Gal	ψ [°] Gal	ϕ [°] Fuc	ψ [°] Fuc
1-2'-Fucosyl-4'-O-sulfo-lactose	75.5	-21.5	39.0	-70.5
1-6'-Fucosyl-2'-O-sulfo-lactose	46.3	-0.7	66.8	96.3
1-3-Fucosyl-6'-O-sulfo-lactose	75.3	34.0	53.5	34.8
1-6-Fucosyl-3-O-sulfo-lactose	67.1	9.1	61.2	142.0

Tabelle 18: Diederwinkel der glycosidischen Bindungen der verschiedenen unsulfatierten und sulfatierten Trisaccharide. Gezeigt sind nur die Monosulfate, deren Bindungsenergie nach der Sulfatierung gestiegen sind.

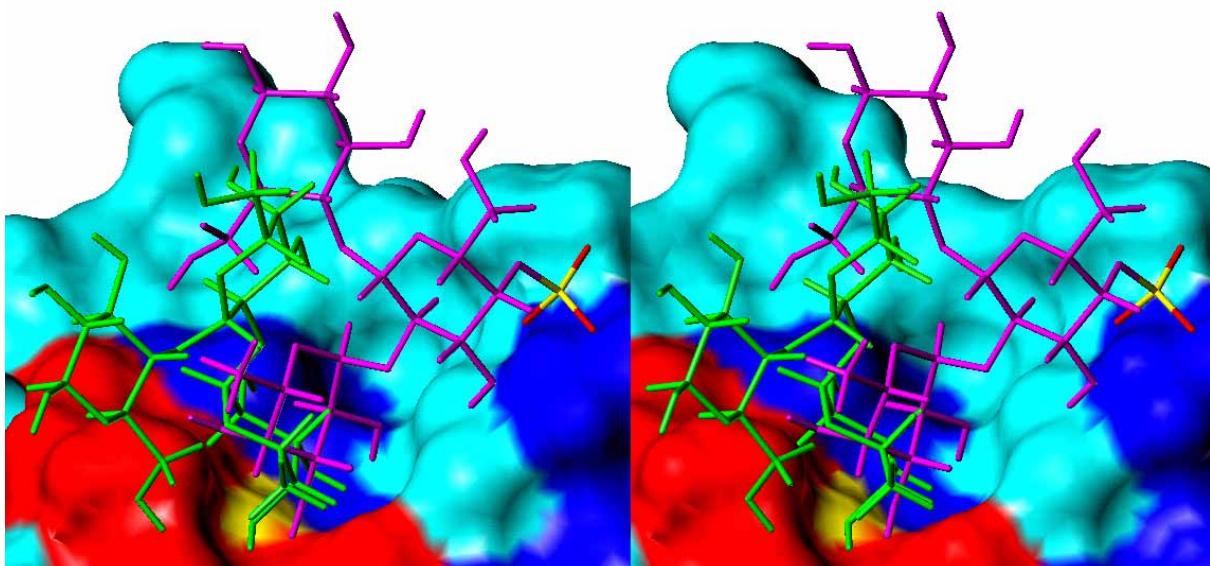


Abbildung 49: Stereoplot der unsulfatierten 1-2'-Fucosyl-lactose (grün) und der 6'-sulfatierten 1-2'-Fucosyl-lactose (magenta). Der Ligand vollzieht nach der Sulfatierung im Optimierungsprozeß eine Rechtsdrehung um ca. 90°. Das Protein wird als Connelly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Bindung beteiligt, die dunkelblau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Das Calcium ist gelb eingefärbt.

Die 1-6'-Verknüpfungsvariante zeigt nach der Sulfatierung an 2-Position auch eine veränderte Orientierung der Lactose (Abb. 47). Die Glucose liegt nicht wie im unsulfatierten Trisaccharid mit der 6-OH-Gruppe am Arg97. Die Glucose ist jetzt vielmehr zwischen dem Lys111 und dem Arg108 angeordnet, so daß die Sulfatgruppe zwischen der Aminofunktion und der Guanidiniumgruppe, maximale Wechselwirkungsenergie zeigt.

Die Position der 1-3, 1-3' und 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose ist vor und nach der virtuellen Sulfatierung fast identisch.

5.5.3 Ein Vergleich: Bindungsmodell sLe^x – De novo-Design von sulfatierten Trisacchariden mit LeapFrog

Die räumliche Orientierung vom Sialyl-Lewis^x im Bindungsmodell ist wesentlich durch vier Merkmale gekennzeichnet: die Fucose ist über die 3-OH- und 4-OH-Gruppe am Calcium gebunden, die Galactose zeigt mit der 6-OH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke zum Tyr94 und zum Glu92, die Koordinierung der Carboxylgruppe der Sialinsäure erfolgt über die Guanidiniumgruppe der Seitenkette vom Arg97, das N-Acetylglucosamin trägt nur unwesentlich zur direkten Wechselwirkung mit dem E-Selektin bei. Das Ergebnis des *docking* mit FlexiDock wurde für sLe^x mit LeapFrog überprüft. Die Bindungsenergie des Tetrasaccharids belief sich auf -76.37 kcal/mol.

Entscheidend ist für diesen Bindungsmodus die Position der Fucose am Calcium und die ionische Wechselwirkung der Carboxylgruppe der Sialinsäure zum Arg97. Diese Interaktion ist aber nur dann möglich, wenn ein Mindestabstand zwischen der Fucose und der Carboxylgruppe eingehalten wird. Im Protein beträgt der Abstand vom Calcium zum N^{η2} des Arg97 10.1 Å und zum

N^{η1} 10.4 Å. Im Bindungsmodell des sLe^x wird dieser Abstand mit einer parallelen Anordnung der Fucose zur Galactose überbrückt. Der Abstand vom Sauerstoffatom in 3-Position der Fucose, das den dichtesten Kontakt zum Calcium zeigt, zum Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe beträgt 9.5 Å.

Bei der 1-6'-Fucosyl-6-O-sulfo-lactose kann der Abstand im Protein vom Calcium zum N^{η2} des Arg97 (10.1 Å) mit einer an der 6-Position befindlichen Sulfatgruppe überbrückt werden. Hier beträgt der Abstand vom Sauerstoffatom der Fucose zum Schwefelatom 9.4 Å. Zusätzlich ist die Position der Glucose mit der Position der Galactose gegenüber dem Bindungsmodell im sLe^x ausgetauscht. Die 1-6'-Fucosyl-6-O-sulfo-lactose, die im Design-Prozeß mit LeapFrog generiert wurde, zeigte aber aufgrund einer nicht optimalen Anordnung der Sulfatgruppe zur Guanidiniumgruppe des Arg97 eine Bindungsenergie von -82.39 kcal/mol (Abb. 50). Eine bessere Bindungsenergie ergibt sich für die 1-6'-Fucosyl-2-O-sulfo-lactose (-98.23 kcal/mol), in der die Sulfatgruppe mit der 2-Position verknüpft ist. Hier ist die Sulfatgruppe zwischen dem Lys111 und dem Arg108 lokalisiert und die Koordinierung der Fucose am Calcium ist deutlich verzerrt (Abb. 50).

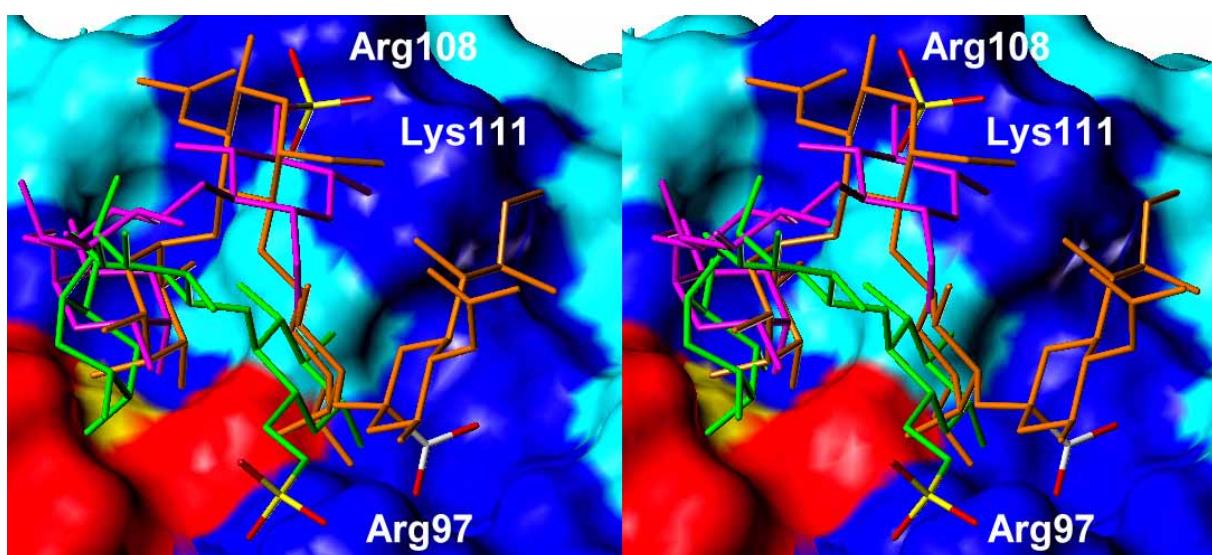


Abbildung 50: Stereoplot der 6'-Fucosyl-lactose (2-O-Sulfat: magenta, 6-O-Sulfat: grün) und des Sialyl-Lewis^x (orange). Das E-Selektin wird als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Bindung beteiligt, die dunkelblau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Zusätzlich ist das Arg108 blau markiert. Das Calcium ist gelb eingefärbt.

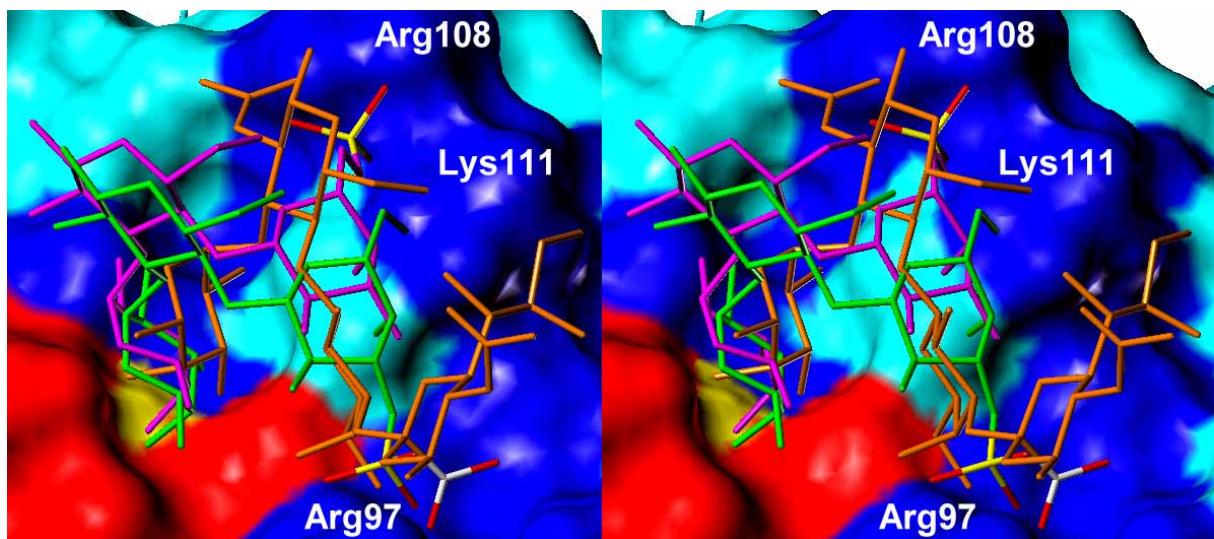


Abbildung 51: Stereoplot des 3'-O-Sulfat (grün) und des 6'-O-Sulfat (magenta) der 3-Fucosyl-lactose. Das Sialyl-Lewis^x ist orange eingefärbt. Das E-Selektin wird als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium-Bindung beteiligt, die dunkelblau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Zusätzlich ist das Arg108 blau markiert. Das Calcium ist gelb eingefärbt.

Die 1-3-Fucosyl-lactose, die dem Lewis^x ohne N-Acetylgruppe entspricht, zeigt gegenüber dem Bindungsmodell des sLe^x eine veränderte Anordnung. Das Trisaccharid, das in seiner 3'-sulfatierten, 6'-sulfatierten und in seiner unsulfatierten Form fast deckungsgleich ist, ist um ca. 45° gekippt. Die Bindungsenergie des 3'-O-Sulfat der 1-3-Fucosyl-lactose liegt bei -73.05 kcal/mol. Die Sulfatgruppe ist zum Arg97 ausgerichtet. Der Abstand zwischen dem Sauerstoffatom der Fucose in 3-Position und dem Schwefelatom beträgt 7.9 Å. Somit wird in dieser Konformation der notwendige Abstand vom Calcium zur Guanidiniumgruppe des Arg97 nicht überbrückt. Mit -113.37 kcal/mol zeigt das 6'-O-Sulfat die zweitgrößte Bindungsenergie von allen monosulfatierten Liganden. Verantwortlich für diesen hohen Wert ist die optimale Lage der Sulfatgruppe zwischen dem Lys111 und dem Arg108 (Abb. 51). Wenn beide Positionen sulfatiert sind, also die 2'- und die 6'-Position, wird nur eine Bindungsenergie von -105.29 kcal/mol erreicht. Der Abstand zwischen den beiden Sulfatgruppen ist demnach zu klein, um die Distanz vom Arg97 zum Lys111 optimal zu überbrücken.

Offensichtlich kommen nur zwei Positionen am Protein für eine negativ geladene Gruppe des Liganden in Betracht.

Die Position am Arg97 und die Position zwischen dem Lys111 und dem Arg108. Da der Abstand vom Calcium zu den Stickstoffatomen des Arg97 um maximal 1.5 Å größer ist als der Abstand vom Calcium zum Stickstoff des Lys111, kann die größere Distanz nur vom sLe^x überbrückt werden. Zusätzlich wird durch die relative Position der Fucose am Calcium, die glycosidisch mit der Lactose verknüpft ist, eine direkte Orientierung der Lactose in Richtung Arg97 erschwert. Die Verknüpfung der Fucose zur Lactose kann nur an einer dem Arg97 abgewandten Position erfolgen. Die optimalen Anordnungen der sulfatierten Trisaccharide sind somit durch die starken Wechselwirkungsenergien der Sulfatgruppen zum Lys111 und zum Arg108 bestimmt.

5.6 MMC-Simulationen

Entspricht die gebundene Konformation der Liganden der Vorzugskonformation der Liganden im freien Zustand? Mit Hilfe von MMC-Simulationen soll diese Frage geklärt werden.

Da das Sybyl-Kraftfeld nicht speziell für Zucker parametrisiert wurde und somit der exo-anomere Effekt nicht berücksichtigt

wurde, wurden MMC-Simulationen der monosulfatierten Strukturen mit GEGOP durchgeführt, die im Design-Prozeß mit LeapFrog eine Steigerung der Bindungsenergien lieferten. Zusätzlich wurde eine MMC-Simulation der Lactose durchgeführt. Alle Simulationen wurden mit einer abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstanten mit $\epsilon = 5$ durchgeführt. Die Sulfatgruppe wurde mit vier symmetrisch angeordneten Sauerstoffatomen mit einer Bindungslänge von je 1.43 Å verwendet.

Der C_8 -spacer ist bei den Trisacchariden nicht berücksichtigt worden. Es ist anzunehmen, daß die lange Alkylkette hoch beweglich ist und Wechselwirkungen zum Protein eher unspezifischer Natur sind.

Eine Clusteranalyse extrahierte anschließend die Hauptfamilien der MMC-Simulationen und ermöglicht die Erstellung einer sinnvollen Startstruktur für weitere docking-Experimente und liefert ein Modell für die Vorzugskonformation der ungebundenen Liganden.

5.6.1 MMC-Simulation von Lactose

Im Design-Prozeß mit LeapFrog wurde Lactose als Fragment definiert. Lactose sollte dabei mit einem Bindungsmodell der α -L-Fucose beliebig verknüpft werden. Die

Ausgangskonformation der Lactose wurde mit Hilfe einer MMC-Simulation bei einem Temperaturparameter von 2000 K ermittelt. Von insgesamt 5 Mio. MMC-Schritte wurde 3210049 Konformationen akzeptiert, welches einer Akzeptanzrate von 64.2 % entspricht. Die durchschnittliche Energie der akzeptierten Konformationen betrug 8.97 kcal/mol.

Für die Clusteranalyse wurden 3000 Konformationen von der Ausgabedatei der MMC-Simulation ausgewählt. Für die Clusterung wurden nur die ϕ und ψ Winkel der glycosidischen Bindung verwendet. Der Schnitt im Clusterbaum erfolgte bei sieben Gruppen. Die Numerierung der Gruppen entspricht ihrer Reihenfolge bezüglich des Ähnlichkeitskoeffizienten.

Es wurden zwei Hauptgruppen mit 32.1 % und 25.1 % gefunden, die einen Ähnlichkeitskoeffizienten von 0.345 und 0.411 zeigen. Die durchschnittliche Energie beträgt 6.91 kcal/mol und 7.75 kcal/mol. Die ϕ -Winkel betragen 47.4° und 35.62°. Der ψ -Winkel liegt bei 8.06° und 324.88°.

Eine Diskriminanzanalyse soll nun - ausgehend von den sieben Klassen - den gesamten Datensatz durchsuchen. Als Zuordnungskriterium wurde jeweils für den ϕ - und ψ -Winkel das zweifache der Standardabweichung der Winkel aus der Clusterung herangezogen.

Gruppe	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ [kcal/mol]	ϕ [°]	σ [°]	ψ [°]	σ [°]	ω [°] Gal	σ [°]	ω [°] Glc	σ [°]	τ [°]	σ [°]
4	32.1	1503	0.35	6.9	4.3	47.4	19.5	8.1	16.9	38.2	96.9	27.4	84.8	118.4	4.0
3	25.1	1176	0.41	7.8	4.0	35.6	18.9	324.9	16.2	50.4	92.5	324.7	99.0	118.6	3.9
7	22.7	1062	0.13	9.7	4.2	111.6	34.7	353.7	15.7	34.4	94.7	46.6	97.2	119.3	3.9
5	11.1	519	0.28	11.8	5.0	337.6	21.5	330.1	15.4	68.5	94.2	35.7	92.9	119.3	4.1
6	4.4	206	0.18	14.9	5.2	32.2	21.2	174.5	17.7	72.0	98.6	352.4	82.3	121.9	3.8
2	4.1	194	0.44	14.3	4.1	44.5	13.3	246.6	28.7	27.2	96.1	8.0	91.6	122.2	3.2
1	0.4	18	0.77	19.4	3.1	206.2	18.6	9.2	9.6	79.4	88.2	17.8	88.8	124.7	2.3

Tabelle 19: Schnitt im Clusterbaum bei sieben Gruppen. Dargestellt sind die Gruppen, numeriert nach den besten Ähnlichkeitskoeffizienten. Die nächsten beiden Spalten geben die prozentuale Größe und die tatsächlichen Anzahl der Konformationen an, die durch die jeweilige Gruppe repräsentiert wird. In der vierten Spalte ist der Ähnlichkeitskoeffizient gezeigt. Anschließend ist der durchschnittliche Energieinhalt und die entsprechende Standardabweichung σ dargestellt. In den folgenden Spalten sind die glycosidischen Winkel ϕ und ψ und der ω - und der τ -Winkel mit ihren Standardabweichungen aufgelistet.

Klasse	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	[kcal/mol]	σ	ϕ [°]	σ [°]	ψ [°]	σ [°]	ω [°] Gal	σ [°]	ω [°] Glc	σ [°]	τ [°]	σ [°]
4	32.7	1633592	0.99	6.1	3.8	50.8	17.5	5.4	13.6	43.9	96.2	15.6	89.6	118.3	3.8	
3	23.2	1158700	0.99	7.6	3.6	32.8	15.4	326.0	15.0	48.2	96.7	359.8	98.9	118.7	3.8	
7	17.4	868570	0.96	10.0	3.9	112.7	27.5	353.8	15.3	49.0	96.2	20.5	95.1	119.5	3.6	
5	10.7	536972	0.98	10.7	4.0	341.0	18.7	329.1	13.3	44.7	96.5	28.5	91.5	118.9	3.8	
6	4.6	232345	0.98	14.1	4.3	31.2	19.7	177.5	14.7	38.4	98.1	345.8	95.2	121.6	3.4	
2	4.0	201425	0.96	14.1	4.4	44.4	12.4	256.7	29.5	47.3	97.3	7.6	100.1	121.7	3.5	
1	2.2	112482	0.99	10.8	5.5	181.6	11.9	1.9	7.9	51.5	95.1	25.4	84.3	120.7	3.7	
Restklasse	5.1	255915	0.73	16.7		75.8		345.6		53.3		23.5		121.9		

Tabelle 20: Klasseneinteilung nach der Diskriminanzanalyse. Die Hauptklasse ist grau unterlegt. Die Spalten entsprechen der Tabelle 19. Zusätzlich ist die Restklasse angegeben, in der sich die Konformationen befinden, die keiner Klasse zugeordnet werden konnte.

Die Reihenfolge der Klassen hat sich nach der Diskriminanzanalyse nicht verändert. Auch die Größenordnung der prozentualen Verteilung der einzelnen Gruppen ist konstant geblieben. Die Hauptklasse ist mit 32.7 % populiert. Die Restklasse, in der die Konformationen liegen, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnte, liegt bei 5.1 %. Für den Aufbau der Liganden mit LeapFrog wurde die Lactose mit der Konformation aus der Hauptklasse gewählt.

5.6.2 MMC-Simulation der 1-2'-Fucosyl-4'-O-sulfo-lactose

Die MMC-Simulation des 4'-O-Sulfat der 1-2'-verknüpften Fucosyl-lactose wurde mit einem Temperaturparameter von 2000 K durchgeführt. Von fünf Millionen MMC-Schritte wurden 1822340 Konformationen akzeptiert, das einer Akzeptanzrate von 36.45 % entspricht. Die durchschnittliche Energie der akzeptierten Konformationen betrug 20.16 kcal/mol.

Für die Clusteranalyse wurden 3000 Konformationen von der Ausgabedatei der MMC-Simulation ausgewählt. Für die Clusterung wurden nur die ϕ - und ψ -Winkel der glycosidischen Bindung der Galactose und der Fucose verwendet. Zusätzlich wurde der für die Orientierung der Sulfatgruppe wichtige Torsionswinkel O-S-O-C geclustert. Der Schnitt im Clusterbaum erfolgte bei sieben Gruppen (Tab. 22). Die

Hauptgruppe ist mit 44.7 % populiert. Der Ähnlichkeitskoeffizient liegt bei 0.266 und die durchschnittliche Energie beträgt 16.73 kcal/mol. Anschließend wurde mit diesen sieben Gruppen eine Diskriminanzanalyse durchgeführt. Die Kriterien für die Diskriminanzanalyse entsprach denen, die bei der Analyse der Lactose verwendet wurden.

Nach der Diskriminanzanalyse wurden drei Hauptklassen erzeugt, die mit 33.3 %, 17.2 % und 16.2 % populiert sind. Die durchschnittliche Energie der ersten Klasse liegt bei 15.59 kcal/mol, die der zweiten Klasse liegt bei 17.54 kcal/mol und die Energie der dritten Klasse bei 20.52 kcal/mol. Die Restklasse ist mit 15.9 % populiert.

Vergleicht man die Torsionswinkel der LeapFrog-Struktur mit denen der MMC-Simulation, so entspricht die Konformation keiner der Klassen der Diskriminanzanalyse exakt. Dennoch sind die globalen Strukturen ähnlich. Mit GEGOP berechnet ergibt sich für die LeapFrog-Struktur eine Energie von 53.65 kcal/mol.

Ligand	ϕ [°] Gal	ψ [°] Gal	ϕ [°] Fuc	ψ [°] Fuc	S-O-C-H [°]
1-2'-Fucosyl-4'-O-sulfo-lactose	75.5	-21.5	39.0	-70.5	53.8
Klasse 3	70.8	2.0	43.8	24.8	11.4
Klasse 4	44.1	-19.8	61.4	40.3	18.1
Klasse 1	89.7	-2.2	1.5	-30.7	13.7

Tabelle 21: Diederwinkel des LeapFrog-Liganden und der drei am höchsten populierten Klassen der MMC-Simulation. Gezeigt sind nur die geclusterten Torsionswinkel.

Gruppe	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	$\phi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\psi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\phi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\psi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	
				[kcal/mol]	Gal	Gal	Gal		Fuc	Fuc	Fuc			
3	44.7	3623	0.27	16.7	7.3	73.9	27.6	1.9	18.9	43.9	24.0	25.2	19.5	
4	16.1	1392	0.24	19.6	8.2	43.2	20.1	331.8	33.8	56.8	22.5	40.7	18.4	
1	16.0	1298	0.34	21.0	7.2	90.3	31.2	357.1	21.9	0.3	22.0	324.5	19.8	
6	6.5	529	0.20	25.4	7.1	122.2	29.4	357.3	21.4	40.9	13.9	233.9	46.6	
2	5.9	481	0.27	24.1	7.5	62.4	20.7	348.5	33.9	36.4	14.8	184.3	36.3	
7	5.8	471	0.15	25.7	7.5	50.7	18.7	204.4	24.2	54.0	19.7	32.3	62.6	
5	4.9	396	0.23	26.6	7.6	42.1	18.6	233.5	55.9	358.4	22.1	341.1	29.0	
O-S-O-C [^{\circ}] Sulfat	$\sigma [^{\circ}]$	S-O-C-H [^{\circ}] Sulfat	$\sigma [^{\circ}]$	$\omega [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\omega [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\tau [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\tau [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	S-O-C [^{\circ}] Sulfat	$\sigma [^{\circ}]$	
78.1	100.7		11.5	17.5	59.0	88.5	18.7	91.1	118.5	3.8	118.7	3.7	119.5	3.8
77.2	101.8		20.4	21.0	43.4	90.0	10.6	91.8	118.9	4.0	119.2	3.9	119.6	3.9
95.6	101.0		14.7	19.9	46.2	95.0	9.5	89.8	119.3	3.6	119.1	3.6	119.1	3.7
260.7	96.5		11.7	14.4	46.6	85.7	16.4	91.9	119.3	3.4	121.8	2.9	119.1	3.7
55.8	89.5		16.9	18.5	76.5	89.9	2.9	84.9	119.5	3.8	121.6	3.2	119.6	4.0
94.8	97.6		14.7	18.7	64.2	87.0	65.1	94.1	122.5	3.3	119.5	3.2	119.7	3.6
116.7	91.8		12.5	18.6	136.5	99.4	18.4	90.2	120.7	3.2	118.2	3.6	120.1	3.3

Tabelle 22: Schnitt im Clusterbaum bei sieben Gruppen. Die Spalten entsprechen der Tabelle 19. Zusätzlich sind die Diederwinkel der Sulfatgruppe (O-S-O-C) und die S-O-C-Winkel mit ihren Standardabweichungen σ angegeben.

Klasse	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	$\phi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\psi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\phi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\psi [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	
				[kcal/mol]	Gal	Gal	Gal		Fuc	Fuc	Fuc			
3	33.3	1664418	0.98	15.6	6.7	70.8	22.2	2.0	16.8	43.8	21.8	24.8	14.3	
4	17.2	858053	0.97	17.5	7.0	44.1	15.0	340.2	26.2	61.4	19.2	40.3	15.5	
1	16.2	810287	0.97	20.5	6.5	89.7	30.5	357.8	19.7	1.5	21.6	329.3	18.0	
7	5.0	247651	0.97	23.9	6.9	48.0	16.3	196.6	23.5	52.0	18.9	29.6	26.6	
2	4.4	221939	0.96	24.2	6.9	63.8	19.8	347.8	29.4	37.7	12.7	186.1	28.7	
5	4.3	212510	0.94	25.7	6.9	43.9	15.3	249.3	49.3	0.4	20.1	337.6	27.9	
6	3.8	187733	0.95	25.0	6.4	121.6	30.4	356.8	18.1	40.7	11.7	238.1	42.9	
Restklasse	15.9	797410	0.85	27.2		79.8		343.6		34.3		35.2		
O-S-O-C [^{\circ}] Sulfat	$\sigma [^{\circ}]$	S-O-C-H [^{\circ}] Sulfat	$\sigma [^{\circ}]$	$\omega [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\omega [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\tau [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	$\tau [^{\circ}]$	$\sigma [^{\circ}]$	S-O-C [^{\circ}] Sulfat	$\sigma [^{\circ}]$	
66.7	99.6		11.4	16.1	56.3	89.1	13.6	91.7	118.5	3.8	118.4	3.8	119.3	3.6
86.5	99.9		18.1	18.8	54.8	90.7	3.3	89.5	118.5	3.8	118.9	3.8	119.5	3.7
76.6	101.2		13.7	17.5	57.2	89.1	7.0	90.7	119.1	3.7	118.8	3.8	119.4	3.7
55.3	100.5		13.4	16.7	63.4	90.3	352.6	98.1	121.9	3.3	118.8	3.9	119.4	3.6
23.9	101.1		14.1	17.1	57.3	90.5	15.6	86.3	119.0	3.8	121.7	3.4	119.3	3.6
74.5	99.2		12.6	17.1	56.9	90.7	20.3	94.5	121.4	3.7	118.8	3.8	119.4	3.7
41.5	100.3		12.0	14.3	54.8	90.1	31.7	90.9	119.8	3.6	121.5	3.4	119.3	3.7
47.5			15.1		58.3		19.7		120.3		120.2		119.9	

Tabelle 23: Klasseneinteilung nach der Diskriminanzanalyse. Die größte Klasse ist grau unterlegt. Die Spalten entsprechen der Tabelle 20. Zusätzlich sind die Diederwinkel der Sulfatgruppe (O-S-O-C) und die S-O-C-Winkel mit ihren Standardabweichungen σ angegeben.

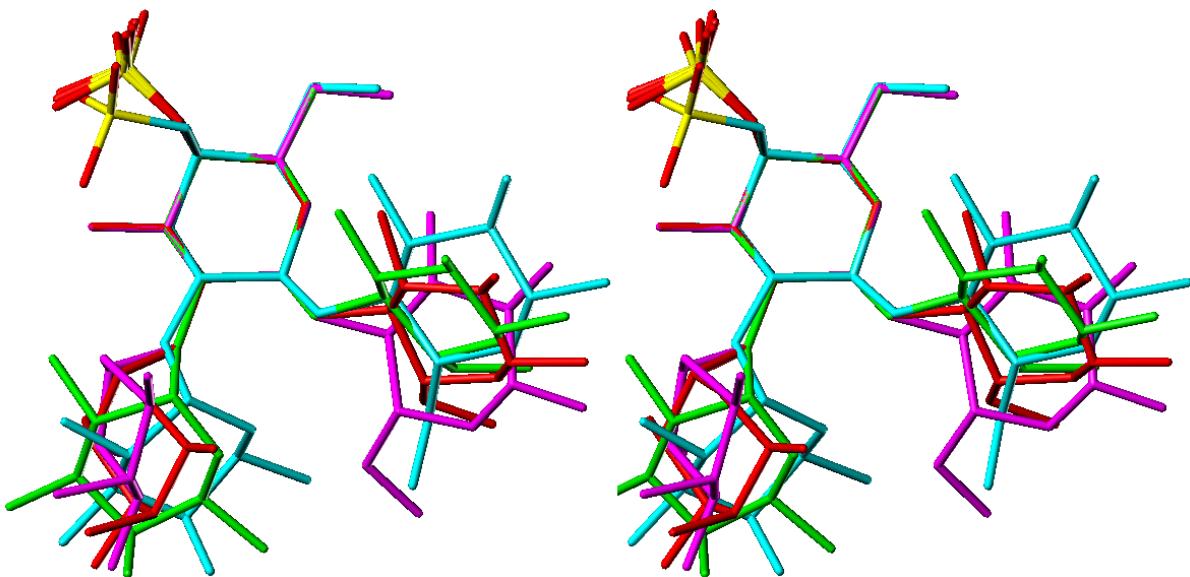


Abbildung 52: Stereoplot der LeapFrog-Struktur (1-2'-Fucosyl-4'-O-sulfo-lactose) und der gemittelten Strukturen der drei am höchsten populierten Klassen aus der Diskriminanzanalyse. Der *Fit* erfolgte über die Ringatome der Galactose. Die LeapFrog-Struktur ist cyan, die Struktur der Klasse 3 ist rot, die der Klasse 4 magenta und die Struktur der Klasse 1 ist grün eingefärbt.

Somit liegt die Konformation energetisch um über 39 kcal/mol über den gemittelten GEGOP-Konformationen.

Bezieht man die Standardabweichungen der Diederwinkel mit ein, ist die LeapFrog-Struktur der gemittelten Struktur der Klasse 1 am ähnlichsten. Besonders deutlich ist dies im *overlay plot* in Abbildung 52 zu erkennen. Die Klasse 1 ist allerdings nur mit 16.2 % in der MMC-Simulation populiert.

Die Fucose ist gegenüber den gemittelten Strukturen der MMC-Simulation gedreht. Die Sulfatgruppe zeigt ebenfalls eine Abweichung des Torsionswinkels S-O-C-H um ca. 40°. Offenbar sind die starken Wechselwirkungen der Fucose und der Sulfatgruppe zum Protein strukturbestimmend für den Liganden.

5.6.3 MMC-Simulation der 1-6'-Fucosyl-2-O-sulfo-lactose

Die MMC-Simulation des 2-Sulfat der 1-6'-verknüpften Fucosyl-lactose wurde mit einem Temperaturparameter von 2000 K durchgeführt. Von fünf Millionen MMC-Schritten wurden 2114956 Konformationen akzeptiert, das einer Akzeptanzrate von

42.3 % entspricht. Die durchschnittliche Energie der akzeptierten Konformationen beträgt 18.7 kcal/mol.

Der Schnitt im Clusterbaum erfolgte bei 24 Gruppen. Die Hauptgruppe ist mit 11% populiert und zeigt eine durchschnittliche Energie von 14.8 kcal/mol. Nach der Diskriminanzanalyse verkleinert sich die Hauptklasse auf 8.8 % und hat einen Energieinhalt von 13.5 kcal/mol. Die LeapFrog-Struktur besitzt eine mit GEGOP berechnete Energie von 9.95 kcal/mol. Aufgrund der erhöhten Flexibilität der 1-6'-Verknüpfung der Fucose sind die Klassengrößen wesentlich kleiner, da der ω -Winkel der Galactose, neben den ϕ - und ψ -Winkel der Fucose und Lactose und dem Sulfatwinkel (S-O-C-H), geclustert wurden.

Gruppe	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	ϕ [°] Gal	σ [°] Gal	ψ [°] Gal	σ [°]	ϕ [°] Fuc	σ [°] Fuc	ψ [°] Fuc	σ [°]
14	11.0	788	0.25	14.8	6.5	50.3	24.1	357.9	20.1	46.5	22.3	145.0	44.1
19	8.9	637	0.17	17.4	6.6	32.8	37.3	351.5	25.1	50.0	29.6	196.0	36.2
16	8.1	576	0.22	17.2	6.0	73.6	27.1	358.1	19.2	51.3	25.4	184.7	36.0
17	7.6	543	0.20	18.1	6.3	22.2	32.0	327.6	28.1	54.0	24.4	249.3	33.4
13	6.9	495	0.26	17.5	7.1	4.0	26.8	323.7	17.6	48.7	26.6	191.9	48.3
9	6.9	492	0.28	15.3	6.5	54.0	27.9	2.0	15.5	55.1	19.5	271.1	25.8
22	6.4	454	0.14	18.6	7.7	109.9	42.9	357.7	16.6	50.1	28.2	201.2	30.3
3	5.9	422	0.43	17.9	6.1	12.3	23.7	329.6	20.8	54.4	24.0	220.3	31.0

O-S-O-C [°] Sulfat	σ [°]	S-O-C-H [°] Sulfat	σ [°]	ω [°] Gal	σ [°]	ω [°] Glc	σ [°]	τ [°] Gal	σ [°]	τ [°] Fuc	σ [°]	S-O-C [°] Sulfat	σ [°]
83.0	99.4	358.5	30.5	67.4	30.8	19.2	85.6	118.7	3.7	117.8	4.2	119.6	3.6
42.7	99.4	356.0	24.6	271.0	34.1	32.3	92.3	118.6	3.9	118.3	3.9	119.1	3.7
337.5	99.6	11.6	24.1	150.4	45.2	353.5	98.5	118.6	3.7	117.7	4.0	119.0	3.7
306.0	90.3	8.4	26.9	180.4	33.1	36.9	90.7	119.3	3.7	118.0	3.6	119.0	3.7
57.7	95.2	2.9	23.3	79.3	28.3	64.8	100.0	119.1	4.0	118.0	4.0	118.8	3.6
73.5	95.4	2.5	24.3	84.5	31.0	12.4	88.4	118.4	4.2	118.8	4.1	118.9	3.6
83.9	102.4	1.1	39.3	333.6	39.8	8.1	85.9	119.7	4.0	118.0	3.6	119.7	3.3
218.1	95.4	3.1	26.9	349.7	31.8	20.2	93.0	118.6	3.4	118.4	4.1	118.8	3.8

Tabelle 24: Schnitt im Clusterbaum bei 24 Gruppen. Gezeigt sind nur die ersten acht Gruppen. Die Spalten entsprechen der Tabelle 22.

Klasse	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	ϕ [°] Gal	σ [°]	ψ [°] Gal	σ [°]	ϕ [°] Fuc	σ [°]	ψ [°] Fuc	σ [°]
14	8.8	441690	0.96	13.5	6.2	50.9	21.3	359.3	17.5	50.3	19.1	148.1	33.1
17	6.9	344767	0.95	17.3	6.3	30.4	28.0	336.0	24.2	53.9	21.2	252.1	29.2
19	6.2	312066	0.95	16.5	6.4	39.9	30.8	352.9	23.0	57.0	21.7	201.9	29.7
13	5.8	292317	0.95	16.7	6.2	5.3	26.2	325.0	16.2	50.1	23.5	193.7	43.4
18	5.7	285188	0.93	18.5	6.4	96.8	43.9	359.8	18.6	9.9	29.7	159.9	40.8
22	5.5	275154	0.94	17.2	6.7	98.2	37.2	1.4	15.8	54.2	23.2	203.0	28.6
9	5.4	271359	0.96	14.1	6.1	55.7	23.8	0.6	14.9	55.1	18.8	261.3	23.9
16	5.0	251296	0.95	16.5	6.2	68.6	24.0	359.3	18.4	53.9	22.2	191.1	30.0
Restklasse	14.8	741782	0.77	25.3	38.9			334.4		35.4		198.4	

O-S-O-C [°] Sulfat	σ [°]	S-O-C-H [°] Sulfat	σ [°]	ω [°] Gal	σ [°]	ω [°] Glc	σ [°]	τ [°] Gal	σ [°]	τ [°] Fuc	σ [°]	S-O-C [°] Sulfat	σ [°]
104.1	102.3	358.0	26.3	64.0	25.6	22.2	91.0	118.4	3.8	117.9	3.9	119.1	3.7
69.1	99.1	4.6	24.6	178.5	28.2	15.2	94.3	118.6	3.9	118.1	3.9	119.0	3.7
82.2	99.9	358.3	23.3	267.7	29.1	21.6	90.6	118.5	3.8	117.9	3.9	119.0	3.7
89.7	100.2	0.4	22.3	78.9	25.5	8.3	95.5	118.8	3.8	117.9	3.9	119.0	3.7
106.0	101.5	3.8	23.5	76.6	29.7	27.3	91.3	119.4	3.7	118.0	3.8	119.0	3.7
111.1	101.9	0.6	30.5	332.4	35.2	29.2	91.4	119.5	3.7	117.7	3.9	119.2	3.8
66.8	98.9	1.5	23.1	85.8	26.6	20.0	90.8	118.5	3.8	118.3	3.9	119.0	3.7
80.7	99.8	8.5	23.2	151.9	32.7	23.6	92.1	118.7	3.8	117.9	3.9	119.0	3.7
120.6		0.2		114.0		21.3		120.4		118.4		119.9	

Tabelle 25: Klasseneinteilung nach der Diskriminanzanalyse. Gezeigt sind nur die ersten acht Klassen. Die größte Klasse ist grau unterlegt. Die Spalten entsprechen der Tabelle 23.

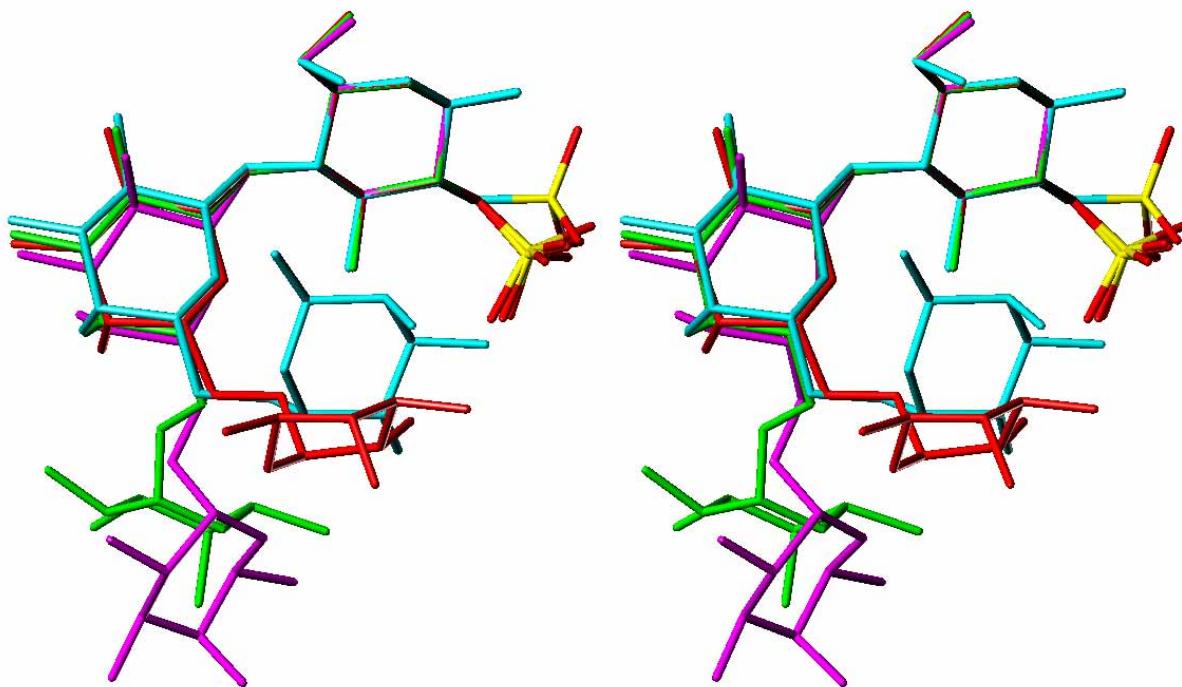


Abbildung 53: Stereoplot der LeapFrog-Struktur (1-6'-Fucosyl-2-O-sulfo-lactose) und der gemittelten Strukturen der drei am höchsten populierten Klassen aus der Diskriminanzanalyse. Der *Fit* erfolgte über die Ringatome der Glucose. Die LeapFrog-Struktur ist cyan, die Struktur der Klasse 14 ist rot, die der Klasse 17 magenta und die gemittelte Struktur der Klasse 19 ist grün eingefärbt.

Der *overlay plot* zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Lactose-Konformation der LeapFrog-Struktur und den ersten drei Konformationen aus der Diskriminanzanalyse. Die Fucose liegt aber nur in der Hauptklasse in einer Anordnung vor, die der LeapFrog-Struktur ähnlich ist.

Ligand	ϕ [°] Gal	ψ [°] Gal	ϕ [°] Fuc	ψ [°] Fuc	ω [°] Gal	S-O-C-H [°]
1-6'-Fucosyl-2-sulfo-lactose	46.3	-0.6	66.8	96.3	42.7	-54.1
Klasse 14	50.9	-0.7	50.3	148.1	64.0	-2
Klasse 17	30.4	-24.0	53.9	-107.9	178.5	4.6
Klasse 19	39.9	-7.1	57.0	-158.1	-92.3	-1.7

Tabelle 26: Diederwinkel des LeapFrog-Liganden und der drei größten Klassen der MMC-Simulation. Gezeigt sind nur die geclusterten Torsionswinkel.

Betrachtet man die geclusterten Torsionswinkel, so besteht zwischen den Werten der Klasse 14 und der LeapFrog-Struktur eine gute Übereinstimmung. Der ψ -Winkel der Fucose und der Sulfatwinkel (S-O-C-H) weicht jedoch um 51° bzw. um 52° ab.

5.6.4 MMC-Simulation der 1-3-Fucosyl-6'-O-sulfo-lactose

Eine MMC-Simulation des 6'-Sulfat der 1-3 verknüpften Fucosyl-lactose erfolgte mit einem Temperaturparameter von 2000 K, wobei 1570140 Konformationen akzeptiert wurden (31.4 %). Die durchschnittliche Energie der akzeptierten Konformationen beträgt 18.8 kcal/mol.

Die Clusteranalyse führt zu drei Hauptklassen mit einer Größe von 23.0 %, 21.2 % und 13.3 %. Die gemittelte Struktur der Hauptgruppe hat einen Energieinhalt von 14.3 kcal/mol. Nach der Diskriminanzanalyse wechselten die ersten beiden Klassen die Position. Somit ist Klasse 9 mit 14.7 % die Hauptklasse und Klasse 5 mit 13.2 % an zweiter Stelle. Dennoch besitzt die Klasse 5 mit 13.6 kcal/mol einen um 1.1 kcal/mol niedrigeren Energiewert. Die Restklasse ist mit 15.5 % populiert.

Gruppe	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ [kcal/mol]	ϕ [°] Gal	σ [°] Gal	ψ [°]	σ [°]	ϕ [°] Fuc	σ [°] Fuc	ψ [°]	σ [°]
5	23.0	2163	0.18	14.3	7.5	55.5	22.4	14.9	11.9	57.2	21.2	41.0	18.0
9	21.2	1993	0.11	15.7	6.8	65.7	23.2	18.8	14.0	53.1	23.4	40.2	16.8
10	13.3	1245	0.07	16.5	7.6	63.1	39.6	15.3	13.8	52.7	23.6	42.6	18.6
14	8.5	796	0.00	21.1	7.8	70.5	29.1	26.9	14.1	348.9	25.1	345.3	28.8
3	5.8	542	0.25	17.8	8.1	55.3	24.8	18.9	14.6	31.7	22.4	44.9	46.6
15	3.6	340	-0.01	23.6	6.9	334.6	22.9	337.8	16.1	52.0	20.5	71.2	35.8
11	3.4	317	0.06	22.3	6.7	335.8	29.5	334.7	20.4	44.9	26.5	70.1	46.7
1	3.2	302	0.42	16.7	9.0	56.8	31.0	14.7	11.3	45.4	23.5	39.5	19.7
7	3.1	294	0.13	26.3	8.4	72.1	23.7	30.4	13.8	39.4	13.6	182.9	31.2
6	3.1	290	0.14	28.7	6.9	51.5	23.9	186.4	23.1	46.1	25.3	63.7	25.2
8	2.9	276	0.12	23.9	7.9	144.0	33.2	5.8	13.6	52.8	23.1	64.2	20.3
13	2.9	273	0.00	28.9	6.8	36.9	22.9	193.1	30.0	32.1	17.0	184.9	35.6
12	2.8	262	0.06	26.5	5.8	38.8	23.5	169.6	17.7	12.9	17.7	342.2	29.3
4	1.7	160	0.22	25.6	8.5	321.2	20.2	327.8	20.1	56.1	19.0	68.4	38.1
2	1.5	139	0.34	26.7	6.6	52.8	31.4	182.4	25.2	2.3	19.7	6.9	34.3

O-S-O-C [°] Sulfat	σ [°]	S-O-C-H [°] Sulfat	σ [°]	ω [°] Gal	σ [°]	ω [°] Glc	σ [°]	τ [°] Gal	σ [°]	τ [°] Fuc	σ [°]	S-O-C [°] Sulfat	σ [°]
173.0	102.4	209.0	37.2	130.2	64.5	14.4	83.3	118.8	3.9	119.1	3.5	118.3	3.9
114.9	100.8	168.7	41.4	325.6	55.6	34.0	82.0	119.2	3.8	118.6	3.6	118.1	3.9
84.4	99.7	108.9	27.5	99.8	48.9	28.1	83.8	119.1	4.0	119.0	3.5	118.8	3.6
93.7	101.4	188.8	50.3	89.5	82.0	64.3	91.4	119.2	3.8	118.9	3.7	118.1	3.8
111.9	96.6	161.9	26.3	175.4	29.4	18.4	80.0	118.6	3.7	118.9	3.9	118.4	3.9
288.3	94.5	189.4	62.4	172.0	42.0	37.8	92.9	120.0	4.2	120.4	3.4	119.1	3.6
148.4	96.3	177.8	38.8	324.6	39.8	6.4	85.6	119.6	3.3	119.9	3.9	117.3	3.3
261.1	100.7	274.2	18.9	107.7	23.6	25.6	79.3	119.1	4.2	118.2	4.2	118.9	3.4
314.4	100.0	199.8	56.1	139.3	82.0	40.5	75.8	119.9	4.0	121.7	3.3	118.4	3.8
114.9	96.0	168.7	42.4	312.3	93.2	285.4	82.3	122.6	3.3	120.9	4.1	118.9	4.2
228.9	100.1	215.7	37.3	203.1	79.5	49.1	84.8	121.1	3.8	119.6	3.7	118.9	3.4
319.3	96.6	178.9	46.2	60.0	84.3	335.2	92.1	121.2	3.2	121.3	3.1	118.9	3.3
1.3	97.4	162.6	51.2	82.2	85.2	338.2	82.1	122.4	3.2	119.6	3.9	118.2	3.3
353.5	103.5	200.8	39.7	59.9	33.1	38.6	90.0	120.1	5.0	119.6	3.8	119.3	3.9
39.7	94.1	234.1	41.6	173.0	32.3	343.6	88.1	122.8	3.5	118.8	3.8	118.6	2.4

Tabelle 27: Schnitt im Clusterbaum bei 15 Gruppen. Die Spalten entsprechen der Tabelle 22.

Berechnet man die Energie der LeapFrog-Struktur mit GEGOP erhält man eine Wert von 13.90 kcal/mol.

Die globalen Konformationen der drei Hauptklassen und die Konformation der LeapFrog-Struktur sind zunächst sehr ähnlich. Abweichungen ergeben sich beim ω -Winkel der Galactose und leichte Differenzen beim Sulfatwinkel (S-O-C-H). In der Klasse 9 beträgt die Abweichung im ω -Winkel 58° und im Sulfatwinkel 13°. Die Orientierung der Sulfat wird auch hier maßgeblich durch die Wechselwirkung mit den basischen Seitenketten vom Lys111 und dem Arg108 bestimmt.

Ligand	ϕ [°] Gal	ψ [°] Gal	ϕ [°] Fuc	ψ [°] Fuc	ω [°] Gal	S-O-C-H [°]
1-3-Fucosyl- 6'-sulfo- lactose	75.3	34.0	53.5	34.8	-101.1	166.7
Klasse 9	64.1	18.5	54.7	37.9	-43.4	-179.8
Klasse 5	55.4	13.8	60.1	39.2	133	-146.9
Klasse 10	58.9	13.2	54.4	40.1	78.2	112.9

Tabelle 28: Diederwinkel des LeapFrog-Liganden und der drei größten Klassen der MMC-Simulation. Gezeigt sind nur die geclusterten Torsionswinkel.

Klasse	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	$\phi [{}^\circ]$ Gal	$\sigma [{}^\circ]$ Gal	$\psi [{}^\circ]$ Gal	$\sigma [{}^\circ]$ Gal	$\phi [{}^\circ]$ Fuc	$\sigma [{}^\circ]$ Fuc	$\psi [{}^\circ]$ Fuc	$\sigma [{}^\circ]$ Fuc	
9	14.7	735091	0.94	14.7	6.7	64.1	20.9	18.5	11.9	54.7	21.9	37.9	13.9	
5	13.2	661035	0.94	13.6	6.6	55.4	19.6	13.8	10.9	60.1	19.2	39.2	14.5	
10	13.2	660398	0.96	14.5	7.0	58.9	25.6	13.2	11.5	54.4	21.8	40.1	15.2	
3	8.7	436583	0.96	15.3	7.1	54.9	21.4	14.4	12.3	42.0	23.1	40.7	21.3	
14	7.2	360599	0.89	19.6	7.5	67.2	23.7	25.2	12.9	354.2	21.3	357.1	29.5	
8	4.8	240391	0.90	21.6	6.8	125.0	30.6	8.5	12.0	58.0	18.9	60.8	18.9	
1	3.8	190310	0.97	14.3	6.8	58.6	20.0	14.3	10.4	50.0	23.6	37.6	14.5	
15	3.2	161989	0.93	21.8	7.1	335.0	21.5	337.6	13.6	58.2	17.5	62.1	23.7	
11	3.2	158684	0.94	22.1	7.4	335.7	24.8	337.0	16.3	54.3	21.9	66.0	29.5	
7	2.6	131739	0.90	23.7	7.1	69.6	22.4	24.9	10.9	40.4	10.7	173.7	23.1	
6	2.5	127238	0.89	26.5	6.8	48.3	18.6	187.7	21.9	44.0	26.0	61.7	21.9	
13	2.4	120328	0.88	29.4	6.7	38.3	21.1	191.8	24.8	36.3	14.7	182.1	30.9	
12	2.0	99526	0.90	25.5	7.0	41.1	15.7	167.7	14.3	15.6	16.2	342.8	28.2	
4	1.9	93689	0.95	21.5	7.4	322.2	15.7	330.5	13.7	60.5	16.0	65.2	23.7	
2	1.0	47891	0.94	26.5	7.0	46.8	20.3	177.4	21.3	11.7	15.1	9.7	33.7	
Restklasse	15.5	774509	0.77	26.1		52.8		17.0		34.8		52.2		
O-S-O-C [{}^\circ] Sulfat	$\sigma [{}^\circ]$	S-O-C-H [{}^\circ] Sulfat	$\sigma [{}^\circ]$	$\omega [{}^\circ]$ Gal	$\sigma [{}^\circ]$	$\omega [{}^\circ]$ Glc	$\sigma [{}^\circ]$	$\tau [{}^\circ]$ Gal	$\sigma [{}^\circ]$	$\tau [{}^\circ]$ Fuc	$\sigma [{}^\circ]$	S-O-C [{}^\circ] Sulfat	$\sigma [{}^\circ]$	
104.6	102.5		180.2	36.7	316.6	50.0	22.1	84.1	118.8	3.8	118.5	3.8	118.3	3.8
83.8	100.6		213.1	32.6	133.0	54.3	18.7	85.4	118.5	3.8	118.7	3.8	118.4	3.8
91.8	100.7		112.9	27.9	78.2	37.6	24.1	86.3	118.6	3.8	118.6	3.8	118.8	3.8
71.4	100.9		163.3	26.4	183.8	26.6	19.7	84.5	118.6	3.8	118.8	3.8	118.4	3.8
133.3	102.0		187.6	48.8	82.6	79.1	24.6	81.3	119.4	3.8	118.7	3.8	118.5	3.8
71.3	100.3		206.6	37.7	197.6	84.8	39.1	86.6	119.9	3.6	119.6	3.7	118.4	3.8
70.1	100.8		267.8	17.9	108.3	24.5	18.9	85.1	118.5	3.8	118.5	3.8	118.9	3.7
50.4	99.7		186.5	55.5	178.7	39.7	22.1	86.3	119.3	3.7	119.7	3.8	118.6	3.8
66.5	98.7		181.9	39.4	309.0	35.6	23.8	88.2	119.5	3.8	120.0	3.8	118.4	3.8
243.9	103.5		183.0	50.7	132.9	83.6	13.3	80.6	119.7	3.8	121.9	3.4	118.5	3.8
10.0	103.6		170.7	42.0	9.1	91.8	321.9	95.5	122.1	3.3	120.4	3.7	118.5	3.8
14.5	100.5		176.7	44.9	72.0	89.9	335.8	98.6	121.8	3.4	121.7	3.4	118.6	3.8
22.9	99.2		160.9	45.1	53.1	81.6	321.4	88.6	121.9	3.5	119.4	3.7	118.6	3.8
92.8	100.9		198.1	41.4	59.5	31.1	46.2	89.3	119.9	3.8	120.0	3.7	118.4	3.8
343.3	101.0		215.8	39.0	176.9	32.2	339.6	91.1	122.0	3.4	119.5	3.7	118.5	3.8
75.7			177.3		93.3		22.6		120.8		120.1		118.7	

Tabelle 29: Klasseneinteilung nach der Diskriminanzanalyse. Die größte Klasse ist grau unterlegt. Die Spalten entsprechen der Tabelle 23.

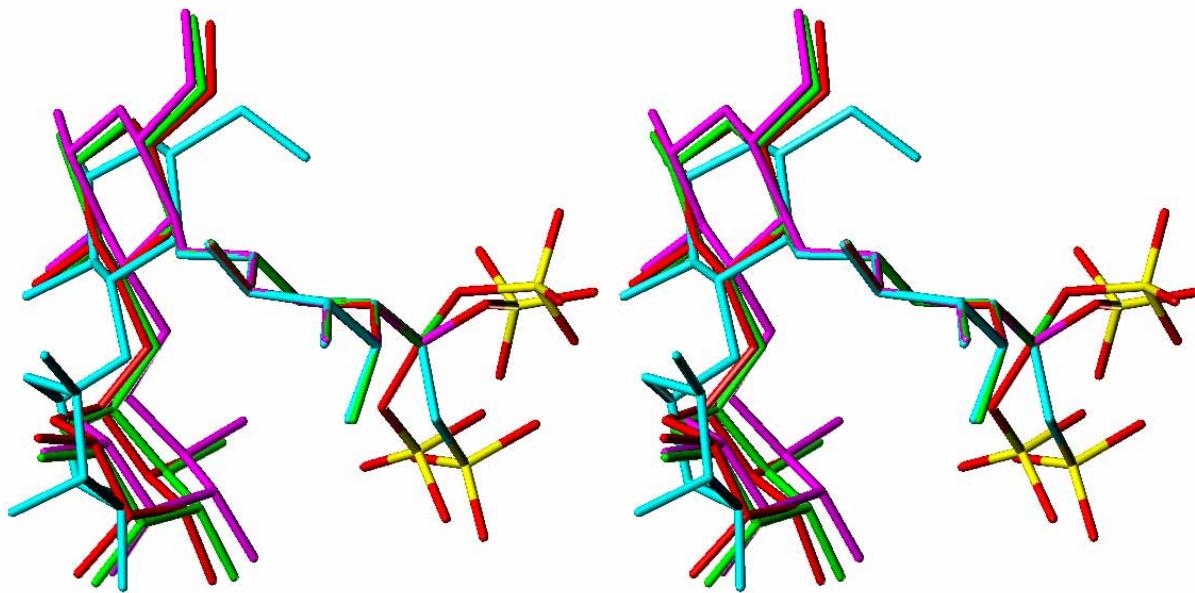


Abbildung 54: Stereoplot der LeapFrog-Struktur (1-3-Fucosyl-6'-O-sulfo-lactose) und der gemittelten Strukturen der drei am höchsten populierten Klassen aus der Diskriminanzanalyse. Der *Fit* erfolgte über die Ringatome der Galactose. Die LeapFrog-Struktur ist cyan, die Struktur der Klasse 9 ist rot, die der Klasse 5 magenta und die Struktur der Klasse 10 grün eingefärbt.

5.6.5 MMC-Simulation der 1-6-Fucosyl-3-O-sulfo-lactose

Die MMC-Simulation des 3-Sulfat der 1-6-verknüpften Fucosyl-lactose wurde mit einem Temperaturparameter von 2000 K durchgeführt. Von fünf Millionen MMC-Schritte wurden 1570140 Konformationen akzeptiert, daß einer Akzeptanzrate von 31.4 % entspricht. Die durchschnittliche Energie der akzeptierten Konformationen beträgt 18.81 kcal/mol.

Der Schnitt im Clusterbaum erfolgte bei 20 Gruppen. Die vier Hauptgruppen, die mit über 10 % populiert sind, zeigen durchschnittliche Energien von 14.8 kcal/mol bis 16.5 kcal/mol, wobei die vierte Gruppe die niedrigste Energie hat. Nach der Diskriminanzanalyse ergaben zwei Hauptklassen über 10 % Populationsanteil. In der Tabelle 32 sind die vier größten Klassen mit den entsprechenden geclusterten Torsionswinkel gezeigt. Die Restklasse ist mit 17.2 % populiert. Die LeapFrog-Struktur liefert mit GEGOP einen Energiewert von 12.92 kcal/mol.

Ligand	ϕ [°] Gal	ψ [°] Gal	ϕ [°] Fuc	ψ [°] Fuc	ω [°] Glc	S-O-C-H [°]
1-6-Fucosyl-3-sulfo-lactose	57.4	9.9	63.6	144.4	-95.8	52.2
Klasse 15	56.4	5.4	54.1	-127.3	63.1	12.6
Klasse 19	54.7	10.9	38.2	164.3	25.1	7.4
Klasse 8	60.3	2.1	56.5	-140.1	34.3	14.2
Klasse 17	50.6	4.1	25.6	139.0	-67.5	10.7

Tabelle 30: Diederwinkel des LeapFrog-Liganden und der vier am höchsten populierten Klassen der MMC-Simulation. Gezeigt sind nur die geclusterten Torsionswinkel.

Gute Übereinstimmung besteht bei der Lactoseeinheit zwischen der LeapFrog-Struktur und den gemittelten Konformationen der MMC-Simulation. Der ω -Winkel der Glucose korrespondiert aber nur mit der Struktur der Klasse 17. Der Sulfatwinkel (S-O-C-H) zeigt bei allen Konformationen nach der Diskriminanzanalyse leichte Abweichungen.

Klasse 17, die mit 9.1 % populiert ist, zeigt die größte Ähnlichkeit mit der LeapFrog-Struktur. Sie besitzt mit 13.6 kcal/mol die niedrigste Energie aller Klassen nach der Diskriminanzanalyse.

Gruppe	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	$\phi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\psi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\phi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\psi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$
19	15.4	1246	0.16	16.5	7.5	51.1	23.3	11.5	20.3	35.3	35.6	159.6	36.0
8	14.0	1134	0.33	15.2	6.7	65.6	26.7	1.8	14.7	55.7	21.3	215.5	42.0
15	14.0	1128	0.22	16.1	6.6	55.7	28.0	3.5	17.7	51.5	22.4	230.6	39.1
17	11.6	939	0.19	14.8	6.7	41.3	36.1	3.2	17.2	24.8	29.5	137.8	29.1
10	7.8	633	0.31	17.8	7.5	66.9	33.1	7.2	15.8	52.5	24.0	258.8	36.7
14	7.0	565	0.23	18.3	6.4	75.1	27.9	1.2	14.6	9.1	27.3	113.6	43.7
16	5.9	480	0.20	17.4	7.4	40.8	43.0	3.9	19.8	17.7	27.4	99.8	22.2
6	3.8	303	0.35	19.9	7.7	156.7	24.9	7.1	11.2	46.2	23.7	183.7	45.1
12	3.4	271	0.26	22.3	8.0	328.1	27.2	334.7	16.6	24.4	32.4	159.7	41.5
9	3.2	261	0.31	20.3	7.7	343.1	26.8	332.7	12.3	61.7	19.4	195.3	39.8
4	3.1	251	0.39	16.4	7.0	29.5	41.0	333.9	20.1	57.9	18.8	172.5	23.0
11	2.2	178	0.31	22.9	6.7	334.5	28.2	326.5	12.8	37.5	35.4	247.4	37.6
20	2.1	173	0.11	27.8	7.2	38.0	22.0	188.5	24.6	18.1	37.5	156.7	33.2

O-S-O-C [°] Sulfat	$\sigma [^\circ]$	S-O-C-H [°] Sulfat	$\sigma [^\circ]$	$\omega [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\omega [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\tau [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\tau [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	S-O-C [°] Sulfat	$\sigma [^\circ]$	
48.8	101.8		7.8	23.5	65.6	93.2	19.6	30.2	118.9	4.0	118.2	3.7	119.2	3.6
114.6	96.5		17.3	21.9	89.6	98.0	327.9	29.5	118.6	3.8	118.1	4.0	118.7	3.5
65.5	98.9		14.8	21.8	59.3	96.8	65.8	28.5	118.6	3.8	118.3	3.9	119.2	4.0
252.5	101.3		13.6	21.8	65.3	92.3	290.4	20.2	118.8	3.8	118.1	4.1	118.9	3.7
255.2	97.6		10.1	22.5	22.1	98.5	142.2	19.1	118.7	3.4	118.9	4.0	119.0	4.2
317.0	100.7		16.8	19.7	29.4	103.5	82.8	27.0	119.0	3.9	118.8	3.8	119.4	3.7
59.1	99.1		17.3	24.2	90.0	94.7	43.8	31.6	118.6	4.1	118.2	3.3	119.2	3.4
63.3	91.9		25.0	22.3	101.5	87.5	48.6	32.8	119.4	4.0	117.9	3.8	118.7	3.5
299.9	92.7		12.1	18.8	59.0	86.7	68.4	29.6	120.1	3.8	118.2	4.1	118.2	4.3
142.3	94.7		29.0	22.7	141.7	103.7	22.9	45.1	119.9	3.9	117.1	4.1	119.6	3.3
138.7	97.0		33.8	20.1	283.4	86.7	276.3	27.7	119.6	3.7	116.8	3.4	119.1	3.3
122.6	95.0		22.4	18.5	97.8	88.9	138.0	38.2	119.4	3.5	117.5	4.2	119.5	3.3
213.5	96.0		40.4	35.2	99.7	94.8	47.7	91.8	121.4	3.5	117.8	3.8	120.4	3.3

Tabelle 31: Schnitt im Clusterbaum bei 20 Gruppen. Gezeigt sind nur die ersten 13 Gruppen. Die Spalten entsprechen der Tabelle 22.

Klasse	Größe [%]	Anzahl	Ähnlichk.	Energie [kcal/mol]	σ	$\phi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\psi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\phi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$	$\psi [^\circ]$	$\sigma [^\circ]$
15	12.1	606285	0.96	14.8	6.2	56.4	23.9	5.4	14.7	54.1	20.8	232.7	33.4
19	11.7	583120	0.95	15.8	6.4	54.7	22.0	10.9	16.7	38.2	31.9	164.3	28.7
8	9.2	461658	0.96	14.1	6.3	60.3	23.5	2.1	12.8	56.5	19.6	219.9	31.9
17	9.1	454529	0.96	13.6	6.5	50.6	24.6	4.1	14.1	25.6	28.4	139.0	24.8
16	6.5	324070	0.96	16.1	6.8	45.2	29.1	5.3	17.3	24.0	27.6	98.2	20.9
10	6.3	316344	0.96	15.8	6.2	65.7	24.6	6.4	14.4	54.7	20.7	249.3	33.4
14	5.4	267887	0.95	17.1	6.5	73.3	23.9	1.3	13.4	16.5	27.7	112.7	38.3
6	3.4	170808	0.95	19.0	6.4	149.6	22.3	6.6	9.8	46.2	21.4	180.3	47.6
4	3.3	167371	0.96	15.0	6.9	32.3	34.7	346.0	15.9	60.1	16.6	170.5	21.9
9	3.1	156042	0.95	19.0	6.3	344.2	22.6	334.0	11.8	59.0	18.1	203.5	39.1
12	3.0	147995	0.95	19.7	6.6	336.8	21.2	334.4	13.3	28.4	29.9	150.2	38.7
3	2.4	120440	0.96	19.7	6.7	65.1	26.9	3.7	16.4	354.5	19.3	210.2	26.1
11	2.3	116546	0.95	20.6	6.5	340.1	21.8	330.1	11.6	46.3	28.5	248.2	33.9
Restklasse	17.2	860304	0.79	24.3		60.5		358.9		28.8		188.4	

O-S-O-C [°] Sulfat	σ [°]	S-O-C-H [°] Sulfat	σ [°]	ω [°] Gal	σ [°]	ω [°] Glc	σ [°]	τ [°] Gal	σ [°]	τ [°] Fuc	σ [°]	S-O-C [°] Sulfat	σ [°]
87.6	99.2	12.6	20.0	60.1	96.7	63.1	25.8	118.4	3.8	118.1	3.9	118.9	3.7
85.9	100.0	7.4	21.2	59.8	96.8	25.1	26.8	118.5	3.9	118.0	3.9	119.0	3.7
93.1	100.0	14.2	19.6	58.6	96.7	325.7	25.3	118.5	3.8	118.2	3.9	118.9	3.7
87.3	98.9	10.7	19.6	67.4	97.9	292.5	18.2	118.5	3.8	118.0	3.8	118.9	3.7
52.7	101.8	13.9	22.1	59.7	97.2	45.5	24.1	118.4	3.8	118.2	3.8	119.1	3.7
65.0	99.4	10.7	20.0	53.3	96.6	138.7	18.1	118.6	3.8	118.1	3.9	119.0	3.7
26.5	103.4	14.8	18.4	61.5	96.6	82.9	24.2	118.5	3.8	118.4	3.8	119.0	3.7
80.3	98.4	22.7	18.3	52.4	97.7	50.5	28.1	119.9	3.6	118.0	3.9	119.1	3.7
91.5	98.7	28.9	18.6	63.2	98.6	285.6	20.5	118.7	3.8	117.8	3.9	119.2	3.7
91.3	97.8	25.8	19.9	40.9	99.8	18.3	37.7	118.9	3.8	118.1	3.9	119.3	3.7
84.1	99.2	16.7	16.7	46.0	98.6	66.3	26.6	119.1	3.8	118.0	3.8	119.0	3.7
67.8	100.8	16.6	20.1	74.6	96.2	131.5	24.6	118.7	3.7	118.1	3.9	119.0	3.8
60.9	99.6	23.3	16.8	47.7	98.8	128.4	33.3	119.1	3.8	118.2	3.9	119.1	3.7
88.9		26.1		47.8		36.1		120.1		118.6		119.9	

Tabelle 32: Klasseneinteilung nach der Diskriminanzanalyse. Die größte Klasse ist grau unterlegt. Gezeigt sind nur die ersten 13 Gruppen. Die Spalten entsprechen der Tabelle 23.

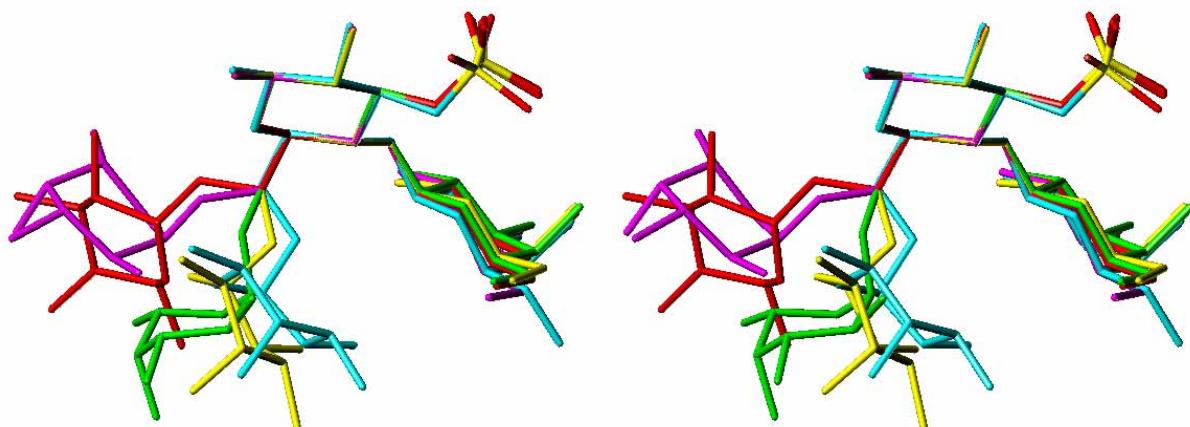


Abbildung 55: Stereoplot der LeapFrog-Struktur (1-6-Fucosyl-3-sulfo-O-lactose) und der gemittelten Strukturen der vier am höchsten populierten Klassen aus der Diskriminanzanalyse. Der *Fit* erfolgte über die Ringatome der Glucose. Die LeapFrog-Struktur ist cyan, die Struktur der Klasse 15 ist rot, die der Klasse 19 magenta, die der Klasse 8 grün und die Struktur der Klasse 17 ist gelb eingefärbt.

Die 1-6-Fucosyl-3-O-sulfo-lactose wurde im Design-Prozeß mit LeapFrog als bester monosulfatierter Ligand generiert. Nicht nur die optimale Position der Fucose am Calcium und die starken Wechselwirkungen der Sulfatgruppe mit dem Lys111 und dem Arg108 liefern hohe Bindungsenergien. Die Galactose ist ebenfalls durch die Position der Hydroxymethylgruppe in einer Kavität des Proteins und durch eine Wasserstoffbrücke der 4-OH-Gruppe mit dem Arg108 am Bindungsprozeß beteiligt. Zusätzlich ist die mit GEGOP berechnete interne Energie der Konformation des Liganden sehr günstig (12.92 kcal/mol) und wurde in einer

MMC-Simulation mit nennenswerten Anteil populiert (9.1 %).

5.7 Die LeapFrog-Strukturen im Vergleich mit den NMR-spektroskopischen Ergebnissen

Die Verknüpfungsvarianten der Fucose an einem Lactosecore sind durch unterschiedliche ^1H -chemische Verschiebungen der Fucose-Protonen charakterisiert. Für die 1-6' und 1-4' verknüpften Fucosyl-lactosen, die aufgrund der Synthesebedingungen der

sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek in der Mischung enthalten sein konnten, lagen keine NMR-spektroskopischen Daten vor. Somit wäre bei einer Übereinstimmung der ^1H -chemischen Verschiebungen, der zur Identifizierung herangezogenen Resonanzen mit den Resonanzen der als bindungsaktiv gefundenen Verknüpfungsmuster, eine andere Interpretation möglich. Dennoch wurde eindeutig die 1-6 Fucosyl-lactose als stärkste E-Selektin bindende Komponente mit dem STD NMR-Verfahren identifiziert. Die Position der Sulfatgruppe konnte für diese Verknüpfungsvariante mit Hilfe der NMR-Untersuchungen nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse des STD TOCSY-Experiments und die T_2 -Relaxationsdaten zeigen eine starke Beteiligung der Fucose am Bindungsprozeß. Die Protonen der Galactose sind ebenfalls nennenswert in der E-Selektin-Bindungstasche lokalisiert. Die Untersuchung einer Mischung aus Protein mit Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose konnte dies bestätigen. Auch hier zeigten die Fucose und die Galactose der 3-Fucosyl-lactose die stärksten STD Effekte.

Das rationelle Design mit LeapFrog von fucosylierten Disacchariden führte zu verschiedenen Verknüpfungsvarianten. Klassifiziert nach ihrer virtuellen Bindungsenergie, ist die unsulfatierte Form und das 3-Sulfat der 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose in Übereinstimmung mit den NMR-Ergebnissen der beste Ligand. Auch die Beschreibung des konformativen Verhaltens im nichtgebundenen Zustand mittels MMC-Simulation ergab für die gebundene Konformation des 3-Sulfat der 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose das globale Energieminimum. Der Bindungsmodus scheint aber gegenüber dem des Sialyl-Lewis^x, das den natürlichen Liganden darstellt, aufgrund eines kürzeren Abstands von der Fucose zur Sulfatgruppe nicht zu entsprechen. Vielmehr orientiert sich das negativ geladene Sulfat zum Lys111 und nicht, wie beim Sialyl-Lewis^x, die negativ geladene Carboxylatgruppe zum Arg97.

Die zweite Verknüpfungsvariante, die als bindungsaktive Komponente in der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek identifiziert wurde, ist die 2'-Fucosyl-lactose.

Selektive 1D ^1H -COSY- und 1D ^1H -TOCSY-Experimente deuten aufgrund eines tieffeldshifts des H3-Protons der Fucose von zumindest einer Komponente dieses Verknüpfungstyps auf die räumliche Nähe einer negativ geladenen Sulfatgruppe hin.

Im Design-Prozeß mit Leapfrog wurden verschiedene monosulfatierte 2'-Fucosyl-lactosen generiert. Eine von Ihnen – das 3'-Sulfat – zeigt mit -77.09 kcal/mol eine recht hohe Bindungsenergie. Bei näherer Betrachtung der Konformation dieses Liganden erkennt man den direkten Kontakt des H3-Protons der Fucose mit der Sulfatgruppe (Abb. 56). Der Abstand des H3-Protons zum Sauerstoffatom der Sulfatgruppe beträgt 2.75 \AA .

Daraufhin wurde eine Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose zusammen mit dem E-Selektin untersucht. Als wesentliche Bindungskomponente wurde die 3-Fucosyl-lactose identifiziert. Diese Verknüpfungsvariante wurde jedoch nicht in der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek als bindungsaktive Verbindung gefunden. Da diese Komponente im Gegensatz zu den anderen Verknüpfungsvarianten nur zu einem geringen Anteil in der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek vorhanden war, ist anzunehmen, daß auch bei hoher Bindungsaktivität keine STD-Effekte zu detektieren sind.

Die 2'-Fucosyl-lactose zeigte in der Mischung mit drei Verbindungen eine sehr geringe Bindungsaktivität. In der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek wurde diese Komponente jedoch als bindender Ligand identifiziert. Die Sulfatierung moduliert offensichtlich die Bindungsaffinität und ist somit für die 2'-verknüpfte Fucosyl-lactose essentiell. Betrachtet man die theoretischen Ergebnisse, so wird diese Annahme bestätigt. Das unsulfatierte Trisaccharid zeigt mit -47.11 kcal/mol eine geringe Bindungsenergie. Die sulfatierten Varianten besitzen mit -93.64 kcal/mol (4'-Sulfat) und mit -77.09 kcal/mol (3'-Sulfat) eine wesentlich höhere Wechselwirkungsenergie.

Vergleicht man die beiden unsulfatierten Strukturen der 2'- und der 3-Fucosyl-lactose, ergibt sich für die 3-Fucosyl-lactose eine um ca. 20 kcal/mol stärkere Bindungsenergie.

Dies führt zu einer fast vollständigen Verdrängung der 2'-Fucosyl-lactose in den STD NMR Experimenten der Mischung aus

Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose.

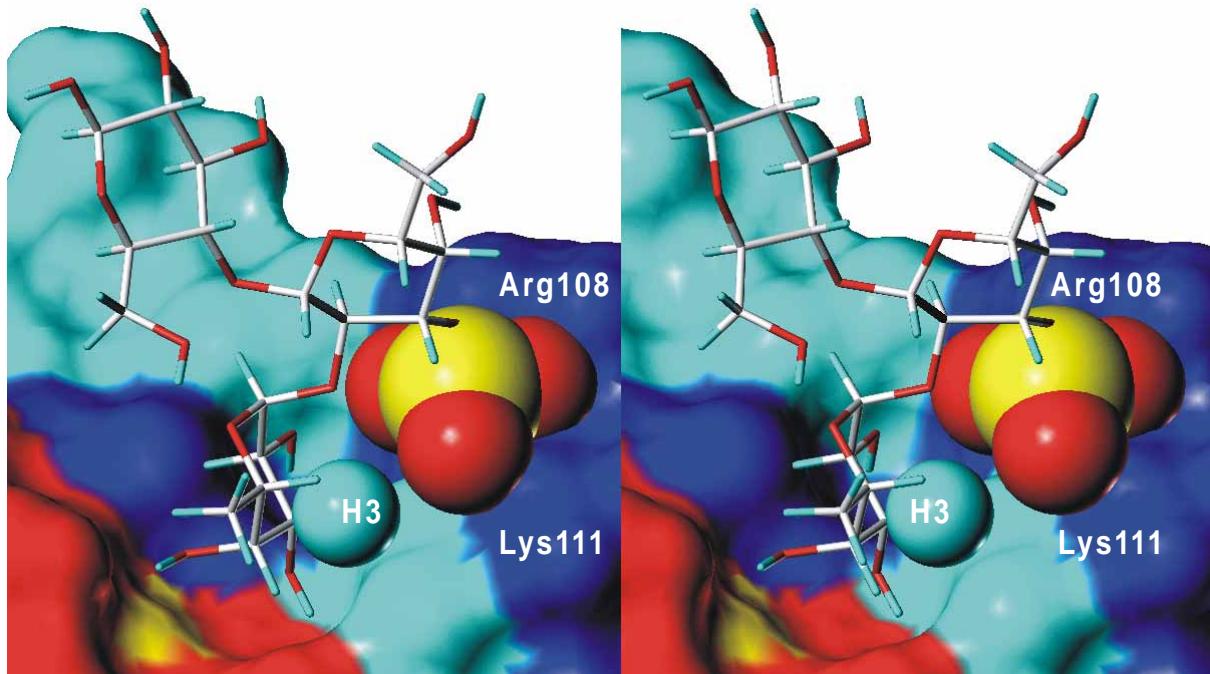


Abbildung 56: Stereoplot des 3'-Sulfat der 2'-Fucosyl-lactose. Das H3-Proton der Fucose und die Sulfatgruppe ist als Kalottenmodell dargestellt. Der Abstand vom H3-Proton der Fucose zum Sauerstoffatom der Sulfatgruppe beträgt 2.75 Å. Das Protein wird als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die rot eingefärbten Aminosäuren sind an der Calcium Bindung beteiligt, die dunkelblau eingefärbten Aminosäuren sind für die Bindung des Sialyl-Lewis^x essentiell. Zusätzlich ist das Arg108 blau markiert. Das Calcium ist gelb eingefärbt.

Zusammenfassung 6

6. Zusammenfassung

Die Entdeckung neuer Leitstrukturen und deren Optimierung sind die grundlegenden Herausforderungen moderner Wirkstoffforschung. Die Anwendung von Methoden zum effektiven *screening* von Substanzmischungen auf biologische Aktivität ist somit der erste Schritt zur Entwicklung neuer Pharmaka. Das *high throughput screening* (HTS) ist in der Lage mehrere zehntausend Verbindungen pro Tag zu untersuchen. Als ergänzende Verfahren etablieren sich zunehmend NMR gestützte Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Auf theoretischer Seite gewinnt das rationale Wirkstoffdesign immer mehr an Bedeutung. Ziel ist es, durch Kombination dieser und anderer Verfahren die Suche nach neuen Wirkstoffen effektiv zu gestalten.

Das E-Selektin, das als Initiator bei der Leukocyten-vermittelten Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle spielt, ist das molekulare Zielprotein dieser Arbeit. Neue Leitstrukturen, die als Antagonisten gezielt diese Immunreaktion unterdrücken können, sind somit von besonderem Interesse.

Ausgangspunkt hierfür war eine zufallsfucosyierte und zufallssulfatierte Trisaccharid-Bibliothek, in der eine oder mehrere Komponenten eine hohe Bindungsaktivität zum E-Selektin zeigten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses komplexe Gemisch von sulfatierten Trisacchariden auf seine E-Selektin Bindungsaktivität mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Verfahren untersucht. Parallel zu den experimentellen Untersuchungen wurden verschiedene Verfahren der theoretischen Analyse zur Bindung, zum konformativen Verhalten und zum virtuellen Design der Bestandteile der Substanz-Bibliothek durchgeführt. Eine vergleichende Analyse der virtuell erzeugten Verbindungen mit dem Sialyl-Lewis^x, das den natürlichen Liganden des E-Selektins darstellt, ergab genauere Einblicke in die molekularen Erkennungsprozesse der Liganden.

Das E-Selektin wurde als Chimäre eines IgG Immunglobulins mit der lec-Domäne

des E-Selektins und somit mit zwei Ligand-Bindungsstellen eingesetzt. Die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek lag als Gemisch von ca. 200 Verbindungen vor. Die Fucosylierung und die Sulfatierung erfolgte an allen Positionen des Lactoseeinheit. Die C1-Position der Lactose ist mit einem aromatischen C₈-*spacer* verknüpft, wodurch diese Position nicht modifiziert wurde. Als typische Instrumente zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen mittels der NMR-Spektroskopie wurden das *transferred NOE*-Verfahren, T₂-Relaxationszeitmessungen und ein neues Verfahren zum *screening* von Substanz-Bibliotheken auf Bindungsaktivität – das STD NMR Verfahren (*saturation transfer difference*) – eingesetzt. Besonders das zuletzt genannte Verfahren erwies sich als besonders erfolgreich. Es gelang, direkt aus der Mischung die bindenden Komponenten zu identifizieren.

Neben Standard TOCSY- und NOESY-Experimenten wurden selektive 1D-TOCSY- und 1D-COSY-Experimente zur Identifizierung der Verknüpfungsvarianten über die spezifischen ¹H-chemischen Verschiebungen der Fucose durchgeführt. Abhängig von der Position der Verknüpfung an der Lactose zeigen besonders die H1- und die H5-Protonen der Fucose charakteristische ¹H-chemische Verschiebungen. Die Analyse der 1D STD NMR-Experimente und des 2D STD TOCSY-Experiments ergab als Hauptbindungspartner Derivate der 6-Fucosyl-lactose und der 2'-Fucosyl-lactose. Spezielle Pulsprogramme für die STD TOCSY NMR-Experimente wurden entwickelt. Die Subtraktion der Spektren erfolgte bereits während der Akquisition. Mit geeigneten Phasencyclen wurde bei den eindimensionalen Experimenten die Differenzbildung nach jedem *scan* durch Drehung der Empfängerphase um 180° vorgenommen. Im STD TOCSY Experiment erfolgte die Subtraktion nach einem kompletten Phasencyclus des jeweiligen F1-Inkrementes.

Hinweise zur Position der Sulfatgruppe wurden bei der 1-2'-Fucosyl-lactose gefunden. Das H3-Proton der Fucose zeigt zumindest für eine Komponente dieses Verknüpfungstyps einen signifikanten tiefeldshift

der ^1H -chemischen Verschiebung. Dieser *shift* kann ursächlich auf die räumliche Nähe einer Sulfatgruppe zurückzuführen sein.

Die T_2 -Relaxationszeiten und die STD TOCSY-Signale zeigen für die Protonen der Fucose und der Protonen der Galactose beider Verknüpfungsvarianten die stärksten Bindungseffekte.

Der genaue Bindungsmodus des natürlichen Liganden sLe^x ist nicht bekannt. Bisher ist es noch nicht gelungen das Sialyl-Lewis $^\text{x}$ mit dem E-Selektin zusammen zu kristallisieren. Die Calcium-Abhängigkeit der Bindung und die für die Bindung wichtigen Aminosäuren sind jedoch mit Hilfe von Mutagenese-Experimenten aufgeklärt. Auch die Konformation des Liganden im gebundenen Zustand konnte durch tNOE -Messungen bestimmt werden.

Als Grundlage für weitere theoretische Untersuchungen wurde zunächst über ein *docking*-Verfahren (FlexiDock), das den Liganden flexibel und das Protein starr hält, ein Bindungsmodus generiert, der den Konformationsdaten der NMR-Analysen sowie der postulierten Orientierung des Sialyl-Lewis $^\text{x}$ in der Bindungstasche entspricht. In diesem Bindungsmodell ist die Fucose über die 3-OH- und die 4-OH-Gruppe am Calcium koordiniert. Die 6-OH-Gruppe der Galactose bildet mit dem Tyr94, Asn105 und dem Glu92 mehrere Wasserstoffbrücken. Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke ergibt sich für die 4-OH-Gruppe zum Tyr94. Die Position der negativ geladenen Carboxylgruppe liegt nahe an der Guanidiniumgruppe der Seitenkette vom Arg97. Das Glucosamin und die Seitenkette der Sialinsäure zeigen wenig direkte Kontakte zum E-Selektin.

Entscheidend für diesen Bindungsmodus ist die Position der Fucose am Calcium, die Lage der Carboxylgruppe am Arg97 und das Netzwerk an Wasserstoffbrücken der Galactose. Diese Anordnung wird nur erreicht, wenn der Abstand von ca. 10 Å vom Calcium zum N^H2 -Atom des Arg97 im Protein, von komplementären Gruppen des Liganden überbrückt wird.

Die NMR-Analysen der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek ergaben als Hauptbindungspartner die 6-Fucosyl-lactose und

die 2'-Fucosyl-lactose. In einem *de novo*-Design Prozeß mit der Software LeapFrog wurden alle möglichen Verknüpfungsvarianten generiert und auf ihre Bindungsaktivität untersucht. In diesem Prozeß wurden die Liganden schrittweise aufgebaut und entsprechend ihrer Bindungsenergie klassifiziert. Zunächst konnte die Bindungsregion der Fucose am Calciumatom definiert werden. Ausgehend von dieser Position wurden alle möglichen Variationen der Fucose mit der Lactose erzeugt. Die anschließende Sulfatierung der Lactose bildete den Abschluß. Betrachtet man die Bindungsenergien der monosulfatierten Strukturen, wurde in Übereinstimmung mit den NMR-Ergebnissen, die 1-6-Fucosyl-lactose als bindungsstärkster Ligand generiert. Die Sulfatgruppe ist bei diesem Ligand mit der 3-Position der Glucose verknüpft. Die 2'-Fucosyl-lactose wurde ebenfalls als 4'-Sulfat mit einer hohen Bindungsenergie erzeugt. Die Konformation dieser Verknüpfungsvariante liefert auch ein Modell für den in den NMR-Spektren gefundenen *tieffeldshift* des H3-Protons der Fucose. Die Sulfatgruppe ist in dieser Anordnung in unmittelbarer räumlicher Nähe des Protons, dessen Resonanz um 0.15 ppm verschoben ist.

Aufgrund der kürzeren Distanzen von der am Calcium koordinierten Fucose zur Sulfatgruppe aller generierten Trisaccharide, unterscheidet sich der Bindungsmodus im Vergleich zum Sialyl-Lewis $^\text{x}$ deutlich. Die negativ geladene Gruppe ist nicht, wie im Bindungsmodell des Sialyl-Lewis $^\text{x}$, am Arg97 lokalisiert, sondern ist zwischen dem Lys111 und dem Arg108 positioniert. Offensichtlich kann der Abstand vom Calcium zum Arg97 (ca. 10 Å) nicht von den sulfatierten Trisacchariden überspannt werden.

Da der gebundene Zustand der Liganden nur eine Konformation von vielen Möglichen darstellt, wurden MMC-Simulationen der bindungsaktivsten monosulfatierten Trisaccharide mit dem Programm GEGOP (*geometry of glycoproteins*) durchgeführt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, den gesamten Konformationsraum einer chemischen Struktur abzutasten.

Zusätzlich wurde eine Clusteranalyse verwendet, die zu einer mathematisch exakten Ableitung der konformativ bevorzugten Strukturen führt. Die Hauptklassen dieser Analyse stellen dann nicht nur die energetisch günstigsten Konformationen dar, diese Hauptklassen sind durch ihren hohen Populationsanteil auch ein Maß für die tatsächliche Existenz einer Konformation.

Der Vergleich der Konformationen im gebundenen Zustand mit den gemittelten Konformationen der Hauptklassen aus der Clusteranalyse, ergab eine hohe Übereinstimmung. Somit sind die im *De novo*-Design-Prozeß generierten Strukturen energetisch günstige Konformationen und entsprechen den bevorzugten Zuständen.

Besonders deutlich wird dies bei dem 3-Sulfat der 1-6 verknüpften Fucosyl-lactose. Die LeapFrog-Struktur zeigt eine Konformation, die der gemittelten Konformation einer der Hauptklassen entspricht und das globale Energieminimum darstellt.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, ein NMR-gestütztes *screening* Verfahren zu etablieren mit dem die bindungsaktivsten Komponenten aus einer extrem komplexen Mischung sehr ähnlicher sulfatierter Trisaccharide identifiziert wurden. Diese Strukturen, die im Gegensatz zum natürlichen Liganden Sialyl-Lewis^x eine andere Verknüpfungsposition der Fucose besitzen – statt der 3-Position, ist die Fucose dieser Liganden mit der 6- oder der 2'-Position verknüpft – stellen in Übereinstimmung mit theoretischen Methoden des Wirkstoffdesigns neue Leitstrukturen als Antagonisten des E-Selektins dar.

6.1 Summary

The discovery and optimization of new lead substances is a big challenge in modern drug research. The application of effective screening methods for testing biological activity of compound mixtures is the initial step in the development of new pharmaceuticals. High throughput screening (HTS) is able to test several 10000 compounds per day. However, NMR-spectroscopic tools are alternatives for the investigation of protein ligand interactions and are increasingly used for screening. Additionally, molecular modeling can be a useful technique for lead generation and lead optimization of biologically active compounds. Currently, computer docking studies are often used to simulate inhibitors or antagonists.

The biological target in this thesis is E-selectin which mediates the early steps of the recruitment of leukocytes from the blood stream during inflammation. New lead structures which suppress this immune response are therefore of special interest.

To find new inhibitors we tried to identify the bioactive component from a library which has high affinity in a bioassay. The library is composed of substances resulting from a random sulfatation followed by fucosylation of lactose. This complex mixture was investigated by NMR-spectroscopy and theoretical analysis, i.e. docking experiments, MMC-simulations, and methods for the virtual design and optimization of saccharide ligands. A comparative study of the virtually generated ligands and the natural ligand sialyl Lewis^x resulted in a more precise view of the binding properties.

The E-selectin used here was an IgG-chimera with the E-selectin lec-domain with two binding sites. The sulfated trisaccharide library contained about 200 compounds. The fucosylation and sulfatation was performed randomly at each position of the lactose unit. The C1-position of the lactose is joined to an aromatic C₈-spacer. The protein ligand interactions were studied by NMR-experiments such as transferred NOE (*tr*NOE) and T₂-relaxation time

measurement. Additionally the binding activity of the mixture was tested with a new NMR-experiment. This technique is called STD-NMR (saturation transfer difference) and can be used for screening compound libraries for binding activity to proteins.

The chemical shifts of the various compounds with different fucose linkage patterns were assigned by TOCSY-, NOESY-, and selective COSY-, and TOCSY-experiments. Especially the H1- and H2-proton shifts of the fucose are indicative of the linkage position to the lactose. By 1D and 2D STD NMR-spectroscopy two binding ligands with 1-6 and 1-2'-fucosylated lactose cores were characterized. A special TOCSY STD pulse program was developed. Subtraction was performed prior to Fourier transformation by phase cycling. In the case of the 1D STD NMR-experiment, subtraction occurs after every scan by inverting the receiver phase by 180°. In the 2D STD TOCSY NMR-experiment the subtraction took place after a complete phase cycle of the respective F1-increment.

Indications of the position of the sulfate group were found for the 1-2'-fucosyl-lactose. The H3-proton of the fucose shows at least for one compound a significant downfield shift. This shift can originate from a sulfate group which is in proximity to the H3-proton.

The T₂-relaxation time and the STD TOCSY experiments indicate that the fucose and galactose protons have the strongest interactions with the protein.

The exact binding mode of the native ligand sialyl Lewis^x has still not been determined unambiguously. Up to now, no crystallographic data of a complex of E-selectin with sialyl Lewis^x is available. But in all C-lectins the carbohydrate is complexed to the protein by forming coordination bonds with a conserved calcium, as well as by hydrogen bonding with acid and amide sidechains that also coordinate to the calcium. The essential amino acids involved in carbohydrate binding could also be determined by mutagenesis experiments. Additionally, the conformation of the sialyl Lewis^x tetrasaccharide bound to E-selectin was determined from transfer NOE

(*tr*NOE) data followed by a distance-geometry analysis.

The basis for further theoretical studies was generated with a docking procedure (FlexiDock), which keeps the protein fixed and the ligand flexible. The resulting structure is in good agreement to the NMR-analysis and shows the predicted orientation of sialyl Lewis^x in the binding pocket. In this orientation, the fucose is coordinated with the 3-hydroxy group and the 4-hydroxy group to the calcium atom. The 6-hydroxy group of the galactose formed multiple hydrogen bonds to Tyr94, Asn105 and Glu92. Additionally, a hydrogen bond was found between the 4-hydroxy group and Tyr94. The negatively charged carboxy group was in proximity to the guanidino group of Arg97. The glucosamine and the side chain of the sialic acid were not in close contact to the protein.

The crucial features of this binding mode is the coordination of the fucose to the calcium, the position of the carboxy group at Arg97, and the network of hydrogen bonds of the galactose. This orientation can only be reached, if a ligand can bridge the distance of about 10 Å between the calcium and the N¹²-atom of the Arg97.

In a *de novo* design process with the program LeapFrog, all possible fucose linkage combinations to the lactose were generated. The ligands were built stepwise and classified by their binding energy. First, the binding region of the fucose to the calcium could be defined. Starting from this position, all possible structures of the fucose with the lactose were generated in silico. Subsequently, the lactose core was sulfated randomly. In good agreement with the NMR data, the 1-6-fucosyl lactose is the best ligand. The sulfate group of this computer generated structure was in the 3-position. The 1-2'-fucosyl-4'-O-sulfo lactose was also found as a ligand with a high binding energy. The conformation of this compound results in a good model for the downfield shift (1.15 ppm) of the proton resonance of the H3 fucosyl proton. In this configuration, the sulfate group is situated in the vicinity of the H3-proton.

Because of the smaller distances of the fucose to the sulfate group, the binding mode of all sulfated trisaccharides differs from the one of the tetrasaccharid sialyl Lewis^x, where the negatively charged group is located at the Arg97. In all sulfated trisaccharides, the negatively charged sulfate group is positioned between Lys111 and Arg108. Apparently, the distance between the calcium and the Arg97 cannot be bridged by the vitally generated sulfated trisaccharides.

The bound conformation represents only one possible conformation, therefore a MMC-simulation of the most active mono sulfated trisaccharides with the program GEGOP (geometry of glycoproteins) was carried out. The method was chosen to ensure that all sterically possible conformations were considered. Additionally a cluster analysis was performed to create a mathematically exact description of the preferred conformations. The major classes of this analysis represent energetically favorable conformations.

Comparison of the structures in the bound state with the averaged structures from the major classes of the cluster analysis resulted in a good agreement. Therefore, the virtually generated structures are energetically reasonable and correspond to the preferred states of the molecules.

The LeapFrog structure of the 1-6-fucosyl-3-O-sulfo-lactose shows a conformation which is equivalent to one of the major groups of the cluster analysis.

In this thesis, a NMR-based powerful screening tool for investigating a complex mixture composed of very similar sulfated trisaccharides was established. The bioactive compounds could be identified and characterized. These structures are different from the natural ligand sialyl Lewis^x. The linkage of the fucose is in the 6- or in the 2'-position but not in the 3-position, which is found in sialyl Lewis^x. In good agreement with theoretical methods, these structures are new leads as antagonists to E-selectin.

Experimenteller

Teil

7

7. Experimenteller Teil

7.1 Probenpräparation

7.1.1 E-Selektin

Das E-Selektin wurde von der Firma Ciba Geigy zur Verfügung gestellt. Die rekombinante deglycosyierte Variante ist eine IgG Chimäre, in der die Ectodomänen von humanem E-Selektin mit der Fc-Region eines humanen Antikörpers der Klasse G1 kombiniert wurde^{50,71}. Die Molekülmasse beträgt 220 kDa. Die Aufreinigung erfolgte über eine Sephadex G4000PWXL Säule.

Zur Umpufferung wurde eine Ultrafiltration mit einer Centricon-30 (Amicon) durchgeführt, die zuvor sechsmal mit 2 ml ultrareinem H_2O gespült wurde. 2.5 mg E-Selektin in 4.583 ml PBS-Puffer wurde sechsmal mit je 2 ml Imidzol-D₄ Puffer (Imidazol-D₄ 75 mmol/l, $CaCl_2$ 1 mmol/l, 0.04 % NaN_3 , pH = 7.5) zentrifugiert. Das E-Selektin wurde vor und nach der Ultrafiltration zur Konzentrationsbestimmung mit einem UV-Spektrometer (Uvikon 922, UV-1609 Shimadzu) vermessen.

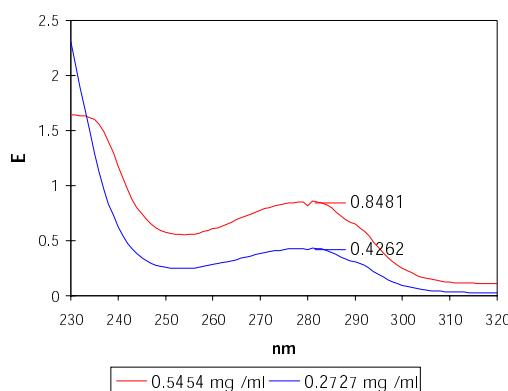


Abbildung 57: UV-Spektrum vor der Ultrafiltration. Die rote Kurve zeigt die Originalprobe (0.5454 mg/ml). Die Blaue Kurve zeigt das UV-Spektrum der halb verdünnten Probe. Die Werte in der Grafik zeigen die Extinktion bei 280 nm.

Nach der Ultrafiltration wurden 2.3 mg E-Selektin erhalten, welches ein Verlust von 8 % darstellt. Für die NMR-Analyse wurde die Probe auf ein Endvolumen von 600 μ l konzentriert. Bei zwei Bindungsstellen ergibt sich eine Konzentration von 33.3 μ mol/l, das einer Gesamtmenge von 20 nmol Bindungsstellen entspricht.

7.1.2 Die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek

Die sulfatierte Trisaccharid-Bibliothek wurde von Ole Hindsgaul zur Verfügung gestellt. Der Syntheseweg ist auf Seite 28 dargestellt. Die Gesamtmenge der Probe beträgt 7.7 mg. Bei ca. 200 verschiedenen Verbindungen ergibt sich für eine monosulfatierte und monofucosyierte Komponente (Natriumsalz) bei einem Molekulargewicht von 824.83 g/mol in 500 μ l D_2O -Lösung eine Konzentration von 93.4 μ mol/l. Das entspricht einer Substanzmenge von 46.7 nmol je Komponente. Für die NMR-Experimente wurde die Probe viermal in je 2 ml D_2O (99.9 %, Deutero GmbH) gelöst und lyophilisiert. Abschließend wurde die Substanz-Bibliothek mit Imidzol-D₄ Puffer auf ein Endvolumen von 500 μ l gebracht.

7.1.3 Die Mischung aus der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek und dem E-Selektin

Die STD NMR-Experimente wurden in einer Mischung von 8.7 zu 1 je Komponente im Verhältnis zum E-Selektin durchgeführt. Bei 500 μ l Lösungsvolumen der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek aus 46.7 nmol je Komponente ergab sich eine Proteinmenge von 5.3 nmol (160 μ l der Protein-Lösung 6.6.1). Das Gesamtvolume dieser Mischung belief sich auf 660 μ l (Imidazol-D₄ Puffer).

7.1.4 Die Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose, 3-Fucosyl-lactose und dem E-Selektin

Die Lactose wurde von der Firma Sigma bezogen. Die 2'-Fucosyl-lactose und die 3-Fucosyl-lactose waren bei CALBIO-CHEM erhältlich. Alle Verbindungen lagen als α/β -Gemisch der Glucose vor. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen auf Bindungsaktivität wurden die Verbindungen mit einem Überschuß je Komponente von 100/1 im Verhältnis zum E-Selektin eingesetzt. Die Gesamtmenge an Protein betrug bei zwei Bindungsstellen des E-Selektin (IgG Chimäre) 12 nmol. Das Protein wurde in Imidzol-D₄ Puffer (Imidazol-D₄ 75 mmol/l, CaCl₂ 1 mmol/l, 0.04 % NaN₃, pH = 7.5) gelöst. Für die NMR-Probe wurden zu 500 μ l der Protein-Lösung, 200 μ l einer Lösung (Imidzol-D₄ Puffer) aus 1.2 μ mol je Komponente hinzugefügt.

7.2 NMR-Experimente

Alle NMR-Experimente wurden an einem DRX 500 Spektrometer der Firma Bruker am Institut für Organische Chemie in Hamburg durchgeführt. Der Magnet hat eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla und eine Larmor-Frequenz für Protonen von 499.87 MHz und 125.77 MHz für ¹³C-Kerne. Der 90° *hard*-Puls für Protonen hat eine Pulslänge von 9.9 μ s bei einer Abschwächung von 0 dB.

Alle Experimente wurden mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen durchgeführt. Die Spektren wurden bei 310 K aufgenommen. Die 2D-Experimente wurden in F₁-Richtung phasensensitiv durch TPPI (*time proportional phase increment*) aufgenommen.

Die Messungen erfolgten in D₂O-Lösung (Deutero GmbH, 99.9 %) bei 310 K. Das HDO-Signal diente als interner Standard und wurde einer chemischen Verschiebung von 4.72 ppm zugeordnet. Zusätzlich erfolgte eine Wasserunterdrückung in Form einer Vorsättigung des HDO-Reso-

nanz-Signals¹⁰⁰ (Bei den STD NMR-Experimenten erfolgte keine Wasserunterdrückung). Die Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kalibrierung der Spektren, inklusive der Integration der 2D-NOESY-Experimente, erfolgte mit der Software XWINNMR (Ver.: 2.5) und Aurelia (Ver.: 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (Indy, O2, Octane).

7.2.1 ¹H-NMR-Experimente

Alle 1D ¹H NMR-Experimente und ¹H STD NMR Experimente wurden mit einer spektralen Weite von 10 ppm aufgenommen. Alle Spektren wurden mit 32 k Datenpunkten aufgenommen und vor der Fourier-Transformation auf 64 k mit Nullen aufgefüllt. Dies entspricht einer digitalen Auflösung von 0.076 Hz/Pkt. Zur Apodisierung wurde das FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert (lb = 0.3). Nach der Phasenkorrektur wurden die Protonenspektren einer automatischen Basislinien-Korrektur mit einem Polynom fünften Grades unterzogen. Zur Unterdrückung der Proteinresonanzen kam ein *spinlock*-Puls mit Länge von 10 ms und einer Abschwächung von 10 dB zum Einsatz.

Die Optimierung der Vorsättigung erfolgte durch ¹H STD NMR-Experimente mit unterschiedlicher Anzahl an Gauss-Pulsen (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40) mit 1 K scans. Die Pulslänge betrug 50 ms, der *delay* zwischen den Pulsen betrug 10 ms und die Pulssstärke der Vorsättigung lag bei 40 dB. Die Einstrahlposition für die Vorsättigung des Proteins (*on resonance*) wurde für die NMR-Experimente mit der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek auf -3000 Hz (-6 ppm) gesetzt. Die *off resonance* Frequenz betrug 20000 Hz (40 ppm). Bei 46.7 nmol je Komponente wurden 5.3 nmol E-Selektin eingesetzt. Das Mischungsverhältnis belief sich somit auf 8.7/1 je sulfatierten Trisaccharid.

Die ¹H STD NMR-Experimente der Mischung aus Lactose, 2'-Fucosyl-lactose und 3-Fucosyl-lactose wurden mit einer *on resonance* Frequenz von 3590.81 Hz aufgenommen. Es wurden 1.2 μ mol je Verbindung eingesetzt. Bei einer Proteinmenge von

12 nmol ergibt sich ein Überschuß pro Komponente von 100/1. Da es sich bei den STD Experimenten um Differenzmessungen handelt, wurde die Phasencyclen so gewählt, daß bei den eindimensionalen Experimenten die Subtraktion jeweils abwechselnd nach jedem *scan* erfolgte. Das heißt, die Frequenz der Vorsättigung wechselt ebenfalls nach jedem *scan*. Im 2D STD TOCSY Experiment wurde die Differenzbildung nach jeweils acht *scans* durchgeführt, bzw. die Experimente wurden abwechselnd für jedes Inkrement als *on resonance* und als *off resonance* Spektrum in zwei getrennte Datensätze gespeichert. Die Differenzbildung erfolgte dann erst nach der Akquisition.

Die T_2 -Relaxationszeitmessungen wurden mit der CPMG-Pulssequenz durchgeführt. Die Anzahl der *scans* betrug je Experiment 32 *scans*.

Zur Identifizierung des Spinsystems der Fucose wurden 1D-TOCSY und 1D-COSY-Experimente durchgeführt. Die selektiven Gauss-Pulse (80 ms, 62.5 dB) erfolgten jeweils auf die Fucose H1-Ringprotonen der α -L-1-6-Fucosyl-lactose (4.994 ppm) und der α -L-1-2'-Fucosyl-(lactose (5.240 ppm). Die selektiven TOCSY-Experimente wurden jeweils mit 480 *scans* aufgenommen, die selektiven COSY-Experimente mit 3 K *scans*.

7.2.2 2D-*tr*NOESY

Für die Aufnahme der 2D-*tr*NOESY-Spektren der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek in Gegenwart des E-Selektins (Mischungsverhältnis: 11.6/1, 46.7 nmol/4 nmol) wurde nach dem ersten $\pi/2$ -Puls ein *spinlock*-Puls mit einer Länge von 15 ms und einer Abschwächung von 10 dB eingesetzt. Die Anzahl der t_1 -Inkremepte betrug 512 mit jeweils 4 K Datenpunkte in 32 *scans*. Die Datenmatrix wurde vor der Fourier-Transformation auf 4 K · 1 K Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt und in F_1 und F_2 mit einer $\pi/2$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion multipliziert. Nach der Phasen-korrektur wurden alle *tr*NOESY-Spektren einer automatischen Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades unterzogen.

Die Bestimmung der *tr*NOE-Aufbauraten erfolgte durch die Aufnahme von Spek-

tren mit unterschiedlichen Mischzeiten: 25 ms, 50 ms, 75 ms, 100 ms und 250 ms. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Aurelia (Ver.: 2.5.9). Nach einem automatischen *peak picking* und anschließender Integration der Resonanzen, erhielt man durch ein doppelt exponentiellen Fit die jeweiligen Aufbaukurven:

$$f(t) = p_0 \cdot e^{-p_2 \cdot t} \cdot (1 - e^{-p_1 \cdot t})$$

7.2.3 2D STD NMR-Experimente

In dieser Arbeit wurden zur Identifizierung der bindenden Komponenten der sulfatierten Trisaccharid-Bibliothek - in Gegenwart des E-Selektins - ein 2D STD TOCSY aufgenommen. Der Überschuß an sulfatierten Trisaccharid betrug je Substanz 8.7 zu 1 (Ligand/Protein). Die STD TOCSY-Experimente der Mischung aus Lactose, 1-2'-Fucosyl-lactose und 1-3-Fucosyl-lactose erfolgten mit einem Mischungsverhältnis von 100/1. Die Anzahl der t_1 -Inkremepte betrug 256 mit jeweils 4 K Datenpunkte in 112 *scans*, (Das Standard TOCSY-Experiment wurde mit 64 *scans* aufgenommen). Die Datenmatrix wurde vor der Fourier-Transformation auf 8 K · 1 K Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt und in F_1 und F_2 mit einer $\pi/2$ verschobenen Sinusquadrat-Funktion multipliziert. Nach der Phasenkorrektur wurden das TOCSY und das STD TOCSY-Spektrum einer automatischen Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades unterzogen.

7.3 Theoretische Verfahren

Alle *Docking* Experimente wurden mit dem Programm Sybyl (Ver.: 6.5 *update* 3 und Vers.: 6.6, , Tripos Inc.) auf einer Silicon Graphics Workstation (O2, Octane) durchgeführt. Alle Rechnungen basierten auf dem Tripos Kraftfeld^{101,102}. Die Atomladungen wurden nach Gasteiger und Marsili berechnet^{103,104}. Die MMC-Simulationen erfolgten mit dem Programm GEGOP (Ver.: 2.7). Die anschließende Clusteranalyse wurde mit dem Programm CLAG (Ver.: 1.0) vorgenommen.

7.3.1 Docking Experimente

Die *docking* Experimente des sLe^x am E-Selektin erfolgte mit der bioaktiven Konformation des Tetrasaccharids. Verschiedene Orientierungen des Sialyl-Lewis^x in der Bindungsregion der CRD-Domäne des E-Selektins wurden als Startstruktur getestet.

Die α -L-1-6-Fucosyl-lactose und die α -L-1-2'-Fucosyl-lactose, die als bindende Hauptbestandteile der sulfatierten Trisaccharidbibliothek identifiziert werden konnten, waren ebenfalls als Liganden Gegenstand von *docking* Experimente. Da es für diese Verbindungen keine Konformationsdaten gibt, wurden MMC-Simulationen und ein schrittweises Aufbauen der Struktur mit dem Programmmodul LeapFrog durchgeführt.

7.3.1.1 De novo-Design mit LeapFrog

Das *de novo* Programm LeapFrog wurde zum Abtasten der Bindungsregion mit der α -L-Fucose als Ligand und anschließender Optimierung der Verknüpfungsposition an Lactose verwendet. Dieser Satz von Liganden wurde abschließend an allen relevanten Positionen der Lactose virtuell sulfatiert.

Für die Berechnung der Bindungsenergie zwischen dem Liganden und dem Protein wurden folgende Energieterme verwendet.

1) Sterische und Elektrostatische Energie

$$B_G = \sum_s \frac{b_s}{r_{Gs}^{12}},$$

abstoßender Anteil des Gitterpunktes vom Zentrum des Würfels indem sich ein Atom des Proteins befindet (*site*).

$$a_i = \sqrt{2k} \cdot (2R)^3,$$

anziehender Anteil der van der Waals Energie des Liganden.

$$b_i = \sqrt{k} \cdot (2R)^6,$$

abstoßender Anteil der van der Waals Energie des Liganden.

r = Abstand zwischen Ligandatom und Proteinatom
 R, k : Werte der Atomtypen.

2) Ligand-Desolvatationsenergie

$$E_{LS} = \sum_i Q_G q_i - A_G a_i + B_G b_i$$

$$Q_G = \sum_s \frac{q_s}{r_{Gs}^2},$$

elektrostatischer Anteil des Gitterpunktes vom Zentrum des Würfels indem sich ein Atom des Proteins befindet (*site*).

q_s = Ladung des Proteinatoms.

q_i = Ladung vom Ligandatom i .

$$A_G = \sum_s \frac{a_s}{r_{Gs}^6},$$

anziehender Anteil des Gitterpunktes vom Zentrum des Würfels indem sich ein Atom des Proteins befindet (*site*).

$$\begin{aligned} \text{Aktivitätskoeffizient} &= -(0.1) \\ &+ 0.035 \frac{\text{NAtome}}{\text{NWasserstoffbrückenatome}} \\ &+ 1.372 \frac{\text{NWasserstoffbrückenatome}}{\text{NAtome}} \end{aligned}$$

Dieser Koeffizient entspricht einer einfachen QSAR Beziehung und wird mit 1.38 multipliziert, bevor dieser Wert mit den anderen Anteilen der Bindungsenergie kombiniert wird. Er entspricht der \log_{10} Verteilung einer Verbindung, im Vakuum und in wässriger Umgebung.

3) Kavitäts-Desolvatationsenergie

$$\text{SE} = \text{Faktor} \cdot (\text{Grad} - \text{Neutralgrad}) \cdot (\text{Atomladung} - \text{Neutralladung})$$

Faktor = -1

Grad = Der elektrostatische Gradient des Gitterpunktes, der einem Proteinatom am nächsten liegt. Der Gradient des Gitterpunkts berücksichtigt alle elektrostatischen Beiträge der Kavitätsatome.

$$\text{Grad} = -2 \cdot Q_A \cdot \frac{(X_A - X_G)}{D^2}$$

X = X-Komponente des elektrostatischen Gradienten.

A = Kavitätsatom.

G = Gitterpunkt.

Neutralgrad = -10

Neutralladung = 0.2 (Abs. Ladung).

Zusätzlich werden die beiden Terme begrenzt. Der erste und zweite Term ist mit min. 0 und max. 2 begrenzt.

Betrachtet man die Formel ergibt sich aus einer Kombination eines kleinen Feldgradienten mit einer kleinen Atomladung oder eines hohen Gradienten mit einer hohen partiellen Atomladung – ein großer Beitrag zur Kavitätssolvatationsenergie. Dieser Beitrag steigt quadratisch mit der Differenz zu ihren Neutralwerten. Schlechte Solvationsenergien ergeben sich aus polaren Atomen in unpolarer Umgebung und aus unpolaren Atomen in polarer Umgebung.

Die Größe der Box, die das Bindungsepitop des E-Selektins einschließt, hat die Dimension von $20 \text{ \AA} \cdot 14 \text{ \AA} \cdot 21 \text{ \AA}$. Das dreidimensionale Gitter wurde mit einem Abstand der Gitterpunkte von 0.25 \AA berechnet.

In der ersten Phase wurden zwei Millionen Schritte (*moves*) durchgeführt. Es wurden zunächst nur *fly*, *twist*, *weed* und *save* Kommandos benutzt. Die maximale Schrittweite beträgt für den *fly move* 10 \AA und für den *twist move* maximal 360° . Im anschließenden *refinement* wurden noch weitere 200000 Schritte mit maximal 1 \AA und 45° Schrittweite gerechnet (Tab. 33).

Move	Rel. Häufigkeit (Phase I)	Rel. Häufigkeit (Phase II)
<i>Fly</i>	5	-
<i>Twist</i>	1	-
<i>Save</i>	1	-
<i>Join</i>	-	1
<i>Weed</i>	1	-

Tabelle 33: Relative Häufigkeiten der *moves*.

Die Endposition der α -L-Fucose wurde dann als neuer Startpunkt für die Optimierung der Verknüpfungstelle an Lactose verwendet. Jetzt wurde nur der *join move* verwendet. Das genaue Protokoll der einzelnen *moves* ist dem Sybyl Manual zu entnehmen⁸¹.

In der zweiten Phase (Tab. 33) wurde die OH-Gruppe in eins Position der α -L-Fucose gegen ein Wasserstoffatom substituiert, da LeapFrog nur Wasserstoffatome für die Verknüpfung zweier Moleküle auswählt und anschließend auch nur diese Atome entfernt, wäre sonst die Folge bei der Verknüpfung von zwei Hydroxylgruppen eine peroxidische Bindung und keine glycosidischen Bindung.

Alle Hydroxyl-Positionen der Lactose wurden als mögliche Verknüpfungsvarianten mit der α -L-Fucose freigegeben. Für die 6 und 6' Position wurden alle drei gestaffelten ω -Winkel berücksichtigt. Die Schrittweite des glycosidischen ψ -Winkels der α -L-Fucose betrug 1° . Die Anfangskonformation der Lactose wurde aus einer MMC-Simulation und anschließender Clusteranalyse erhalten. Mit insgesamt 50000 Schritten erhielt man alle Verknüpfungsvarianten in ihrer energetisch günstigsten Position. Die

Box für die Bindungstasche wurde auf $26 \text{ \AA} \cdot 22 \text{ \AA} \cdot 28 \text{ \AA}$ erweitert.

Die dritte Phase beinhaltet eine Optimierung der Position der Liganden und deren Konformation. Mit 500000 *fly* und *twist moves* wurde dieser Optimierungsprozeß durchgeführt. Die Schrittweiten betrugen 1 \AA und 10° (Tab. 34).

Move	Rel. Häufigkeit (Phase III)	Rel. Häufigkeit (Phase IV)	Rel. Häufigkeit (Phase V)
<i>Fly</i>	1	10	20
<i>Twist</i>	1	5	40
<i>Save</i>	-	1	1
<i>Join</i>	-	1	-
<i>Weed</i>	-	1	-

Tabelle 34: Relative Häufigkeiten der *moves*.

Ausgehend von den jeweils besten Liganden der verschiedenen Verknüpfungsvarianten ergaben sich insgesamt sieben Liganden. Zusätzlich wurde die Anzahl der Liganden um alle gestaffelten Rotationskonformere des ω -Winkels erweitert. Für Liganden mit einer freien 6- und 6'-OH Gruppe wurden also neun Strukturen erhalten. Die Gesamtzahl von 51 Liganden wurden anschließend in Phase IV virtuell sulfatiert (Tab. 34).

Mit 86000 Schritten wurde neben dem *join* Kommando auch der *twist*, *fly*, *save* und *weed move* verwendet. Die Schrittweiten betrugen 2 \AA und 45° . Es sollte somit gleichzeitig die virtuelle Sulfatierung der Lactose und eine Optimierung der Position und Konformation der neuen Liganden durchgeführt werden. Die Anzahl der generierten Strukturen belief sich auf 440.

In der letzten Phase (Phase V, Tab. 34) mit insgesamt 185000 Schritten wurde ein *refinement* bezüglich der Konformation und der Position der Liganden durchgeführt. Lediglich 136 Strukturen wurden verwendet, deren Bindungsenergie höher als -34 kcal/mol waren. Es wurden ausschließlich *fly*, *twist* und *save* Kommandos verwendet. Die maximale Varianz betrug für den *fly move* 1 \AA und für den *twist move* 10° .

7.3.1.2 Docking mit FlexiDock

Alle *docking* Experimente wurden mit dem Programmmodul FlexiDock von der *molecular modeling software* Sybyl durchgeführt. Die Anzahl der Generationen belief sich maximal auf eine Million pro Experiment. Die Startstruktur einer neuen Simulation ergab sich aus der Endstruktur der vorangegangenen Rechnung. Dieser Prozeß wurde solange durchgeführt, bis sich die Bindungsenergie nicht weiter verbesserte.

Während der Simulation wurde das Proteingerüst in seiner Struktur nicht verändert. Die Torsionswinkel des Liganden sind jedoch frei drehbar.

Die Berechnung der Bindungsenergie erfolgte mit folgenden Energietermen des Tripos *force field*^{101,102}:

- 1) van der Waals Energie
- 2) Elektrostatisches Potential
- 3) Torsionspotential

In Abweichung von den Standardwerten des Tripos Kraftfeldes wurde ein Wasserstoff van der Waals Radius von 1 Å statt von 1.5 Å, ein Wasserstoff van der Waals epsilon von 0.03 statt 0.042 und ein van der Waals *cutoff* von 16 Å statt 8 Å verwendet. Die Dielektrizitätskonstante wurde auf eins gesetzt.

Für die Experimente wurden folgende Parameter verwendet. Zur näheren Erklärung der Begriffe ist im Handbuch nachzusehen⁸⁴.

Parametersatz FlexiDock

h_vdw_radius	1.0
h_vdw_epsilon	0.030
grid_bounds	x -10.0 10.0
grid_bounds	y -10.0 10.0
grid_bounds	z -10.0 10.0
max_saved	20
diel_const	1.0
hb_factor	0.7
dist_cutoff	16.0
e_thresh	20.0
grid_resolution	0.35
extra_dist	1.5
site_radius	1.0
site_score	100.0
proximity_mult	2.0
proximity_fract	0.1
dist_dep_diel	yes

use_charges	yes
use_tors	yes
use_constr	no
use_backbone	no
use_nonrot	no
use_grid_vdw	no
use_site_points	no
restart_run	no
bounds	Torsional 0.0 360.0
bounds	Rotation 0.0 360.0
bounds	TransX -4.0 4.0
bounds	TransY -4.0 4.0
bounds	TransZ -4.0 4.0
initial_bounds	Torsional 0.0 360.0
initial_bounds	Rotation 0.0 360.0
initial_bounds	TransX -2.0 2.0
initial_bounds	TransY -2.0 2.0
initial_bounds	TransZ -2.0 2.0
mut_window	Torsional 60.0
mut_window	Rotation 60.0
mut_window	TransX 0.5
mut_window	TransY 0.5
mut_window	TransZ 0.5
large_mut_window	Torsional 360.0
large_mut_window	Rotation 360.0
large_mut_window	TransX 2.0
large_mut_window	TransY 2.0
large_mut_window	TransZ 2.0
conv_thresh	Torsional 5.0
conv_thresh	Rotation 5.0
conv_thresh	TransX 0.1
conv_thresh	TransY 0.1
conv_thresh	TransZ 0.1
###	
### chrom_rms	chrom_rms increased from {2.5,2.5,0.05,0.05,0.05} 3-11-98 jle
###	
chrom_rms	Torsional 60.0
chrom_rms	Rotation 60.0
chrom_rms	TransX 0.1
chrom_rms	TransY 0.1
chrom_rms	TransZ 0.1
initial_chrom_rms	Torsional 60.0
initial_chrom_rms	Rotation 60.0
initial_chrom_rms	TransX 0.5
initial_chrom_rms	TransY 0.5
initial_chrom_rms	TransZ 0.5
gene_mut_thresh	Torsional 30.0
gene_mut_thresh	Rotation 30.0
gene_mut_thresh	TransX 0.3
gene_mut_thresh	TransY 0.3
gene_mut_thresh	TransZ 0.3
Xover_method	GA_XOVER_TP
scaling_method	GA_SCALE_RANK
parent_method	GA_PARENT_ROUL
gen_method	GA_GEN_STEADY_STATE
island_method	GA_ISLAN_EXCHANGE
steady_state_method	GA_STEADY_STATE_REPLACE
rot_trans	GA_RT_ALLOW
num_islands	1
pop_size	500
num_elite	1
num_random	3
gen_number	0
exchange_int	0
num_exchange	5

print_interval	200
arch_interval	0
ss_Xover_chance	0.4 0.2
ss_mut_chance	0.4
Xover_chance	0.8
mut_chance	0.15
avg_Xover_chance	0.0
full_mut_chance	0.1
large_mut_chance	0.0
swap_mut_chance	0.25
tourney_chance	0.75
max_score	1e7
max_initial_score	0.0
box_sel_limit	0.4
crit_gene	0.95
crit_score	0.5
dupl_score_window	20.0
rank_increment	19000.0
rank_multiple	6.0
dynamic_mut_delta	0.02
max_dynamic_mut_delta	1.0
use_all_bonds	no
use_no_bonds	no
duplicate_check	yes
use_initial_geom	yes
print_settings	no
check_initial	no
exceed_window	no
avg_use_trans	no
dynamic_mut	no
gen_limit	1000
gen_limit	100000

7.3.2 MMC-Simulation

Das Programm GEGOP (*geometry of glycoproteins*, Vers. 2.7) kombiniert ein erweitertes HSEA-Kraftfeld (*hard sphere exo-anomeric*) und das ECEPP/2-Kraftfeld mit einem Metropolis-Monte-Carlo-Algorithmus⁸⁶.

Alle MMC-Simulationen wurden mit einem Temperaturparameter von 2000 K durchgeführt. Weiterhin wurde eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante mit dem Wert fünf verwendet.

Im Programm GEGOP werden die pyranosidischen Ringe als starr betrachtet, so daß nur die Diederwinkel ϕ und ψ der glycosidischen Bindung und ω der C5-C6-Bindung variiert werden. Zusätzlich wird noch der glycosidische Bindungswinkel τ während der Simulation variiert. Die Winkel sind wie folgt definiert: $\phi = \text{H1-C1-O1-CX}$, $\psi = \text{C1-O1-CX-HX}$, $\psi_{1,6} = \text{C1-O1-C6-C5}$, $\omega = \text{O6-C6-C5-O5}$, ϕ (Sulfat) = O4-S1-O1-CX, ψ (Sulfat) = S1-O1-CX-HX und $\tau = \text{C1-O1-CX}$. Hierbei ist mit X die Verknüpfungsposition des Aglycons bezeichnet.

Die maximalen Schrittweiten für die Variation der Diederwinkel ϕ , ψ und ω und der glycosidische Bindungswinkel τ der verschiedenen Simulationen sind nachfolgend gezeigt.

$\Delta \phi$	$\Delta \psi$	$\Delta \omega$	$\Delta \tau$
30.0	30.0	60.0	8.0

Tabelle 35: Maximale Schrittweiten der Winkel während der MMC-Simulation.

7.3.3 Clusteranalyse

Die großen Datensätze der MMC-Simulationen wurden mit Hilfe einer Clusteranalyse untersucht (CLAG, Cluster-analyse von Glycoproteinen, Vers.: 1.0). Ziel war es, die energetisch günstigsten Hauptfamilien von Molekülen aus den Simulationen zu erhalten und deren Konformationen für weitere docking Experimente zu verwenden.

Der Korrelationskoeffizient zweier Konformationen A,B mit den Winkelvektoren $a = (a_1, \dots, a_m)$ und $b = (b_1, \dots, b_m)$ wird berechnet, in dem man zunächst die Winkel als Punkte auf dem Einheitskreis auffasst, die durch cos und sin repräsentiert werden. Man erhält also zwei Vektoren:

$$a' = (\cos a_1, \sin a_1, \dots, \cos a_m, \sin a_m) \text{ und } b'.$$

Dieses sind Vektoren im \mathbb{R}^{2m} , die einen Winkel α (0° – 180°) einschließen. Je größer der Winkel ist, desto unterschiedlicher sind die Vektoren. Also nimmt man als Korrelationskoeffizient $\cos \alpha$ der 0° auf 1 und 180° auf -1 abbildet. Da man Werte zwischen 0 und 1 erhalten möchte, transformiert man die Werte noch in dieses Intervall $\left(\frac{(x+1)}{2}\right)$.

Den $\cos \alpha$ erhält man über das Skalarprodukt aus der Gleichung

$$\langle a, b \rangle = \|a\| \cdot \|b\| \cdot \cos \alpha$$

Wegen $\cos^2 x + \sin^2 x = 1$ gilt:

$$\|a\| = \|b\| = m$$

Ausserdem gilt folgendes Additionstheorem :

$$\cos(a-b) = \cos a \cdot \cos b + \sin a \cdot \sin b$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow \langle a, b \rangle &= \cos a_1 \cdot \cos b_1 + \sin a_1 \cdot \sin b_1 + \dots \\ &\quad + \cos a_m \cdot \cos b_m + \sin a_m \cdot \sin b_m \\ &= \cos(a_1 - b_1) + \dots + \cos(a_m - b_m) \end{aligned}$$

Also gilt :

$$\alpha = \cos^{-1} \left(\frac{(\cos(a_1 - b_1) + \dots + \cos(a_m - b_m))}{m^2} \right)$$

Dies ist die Gleichung für den Fall, daß alle Winkel mit 1 gewichtet wurden.

Um alle Informationen bei der Clustering zu erhalten, arbeitet das Programm nicht mit einer $n \cdot n$ sondern mit einer $2n \cdot 2n$ Matrix. Vor der ersten Zusammenführung beider Konformationen hat die Matrix im oberen linken Viertel als Einträge den Korrelationskoeffizienten. Die Diagonalelemente werden auf 1 gesetzt, da sie die Korrelation mit sich selbst repräsentieren. Alle anderen Elemente werden zunächst auf 0 gesetzt.

Ausserdem verfügt jede Zeile/Spalte über eine Sperre, die bei Aktivierung die entsprechende Zeile/Spalte ausblendet. Das Programm sucht nur in den Spalten und Zeilen nach den besten Korrelationskoeffizienten, die freigegeben sind.

Zu Beginn sind die ersten n Konformationen frei und die folgenden gesperrt. Bei der ersten Zusammenführung wird die $n+1$ nte Spalte geöffnet und die beiden Ursprungskonformationen gesperrt. Danach werden die entsprechenden Korrelationskoeffizienten in die neue Zeile/Spalte eingetragen. Ausserdem wird als Erkennungsmerkmal für den Urprung der virtuellen Konformation an den Stellen, wo der Korrelationskoeffizient mit den *childs* eingetragen werden müsste, -1 eingetragen. Ist ein *child* bereits eine virtuelle Konformation, wird mitgezählt, wie viele der realen Konformationen in dieser Gruppe sind und diese Zahl mit negativen Vorzeichen eingetragen. Dadurch lässt sich später leicht rekonstruieren, wie groß die Gruppen sind.

Dieser Vorgang wird nun so oft wiederholt, bis nur noch eine Gruppe übrig ist.

Der Ausgangspunkt der Diskriminanzanalyse war die Klasseneinteilung aus der Clusteranalyse. Die dort gefundenen Mittelwerte und Standardabweichungen der Klassen dienen als Vergleichswert für die Zuordnung der Konformationen in die Klassen. Die Konformationen wurden nacheinander aus der MMC-Simulation gelesen und den Klassen zugeordnet. Dabei wurde eine sogenannte Restklasse eingeführt, die alle Konformationen aufnimmt, die die Zuordnungskriterien bei keiner Klasse erfüllen. Erfüllt eine Konformation die Kriterien in mehreren Klassen, wurde sie derjenigen zugeordnet, mit der sie den besten Ähnlichkeitskoeffizienten hatte. Das Zuordnungskriterium war das σ -Kriterium. In den neu gebildeten Klassen wurden wieder Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Das σ -Kriterium prüft, ob eine Konformation in der σ -Umgebung der Klasse liegt. Als Vergleichswerte dienten dabei die Mittelwerte und Standardabweichungen aus der Clusteranalyse. Dabei wurde für jeden Winkel geprüft, ob der Abstand des Winkels zum Mittelwert der Klasse kleiner ist als die Standardabweichung. Ist dies für mindestens einen Winkel nicht der Fall, gilt das σ -Kriterium als nicht erfüllt. Dabei wurden die Winkel mit Nullgewicht nicht berücksichtigt. In allen Analysen wurde als σ -Kriterium das zweifache des jeweiligen σ -Wertes der entsprechenden Winkel eingesetzt.

Pulsprogramme

8

8. Pulsprogramme

8.1 1D STD NMR-Experiment

```

;zgdiffpsl2.os
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation
,defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan
;spin lock for protein suppression

;Avance.incl
"/u/exp/stan/nmr/lists/pp/zgdiffpsl2.os"

1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
d7 fq1:f2
4 p11:sp1:f2
d11
lo to 4 times i0
p1 ph1
d12 pl2:f1
p2 ph2
go=2 ph31
wr #0
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
ph2=1 3 1 3 2 0 2 0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1

;*****Power Level*****
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl2 : f1 channel - power level for spin lock pulse
(10-15 dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 40 -70 dB depending on protein and
,ligand
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr.
,(10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse
,(gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if necessary) for complete T1
,relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped presat pulses
,[1 msec]
;
;presaturation = (p11 + d11) * l7 (presaturation
;should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance
,presaturation
;O 499,87000 on resonance 8x(6000HZ) off
;resonance 8x(10000HZ)
;NS = 16*n
;DS = 16

```

8.2 T₂-Relaxationsmessung

```

;cpmgpr_os OS 03/98
;avance-version
;T2 measurement using Carr-Purcell-Meiboom-Gill
,sequence

#include <Avance.incl>

;:"p2=p1*2"
;:"d11=30m"

1 ze
2 d12 pl9:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
3 d20
p2 ph2
d20
lo to 3 times c
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 ivc
lo to 1 times l4
exit

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph2=1 3 1 3 0 2 0 2
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

;*****Power Level*****
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl9 : f1 channel - power level for presaturation
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d20: fixed echo time to allow elimination of diffusion
;and J-mod. effects
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [3 usec]
;
;vc : variable loop counter, taken from vc-list
;L4: l4 = number of experiments = number of values
,in vc-list
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;
;define VCLIST
;this pulse program produces a ser-file (PARMOD =
,2D)
;d20: d20 should be << 1/J ,but > (50 * P2)
;vc : vc should contain even numbers to provide
;for cancellation of 180 degree pulse errors

```

8.3 trNOESY-Experiment

```

;noeprtpslzq OS 8/97
;avance-version
;TRNOE measurement
;dipolar coupling may be due to trnoe or chemical
,exchange.
;phase sensitive using TPPI
;with presaturation during relaxation delay and
,mixing time
;with T1roh filter after first 90 deg pulse (Scherf &
,Anglister
;Biophys. J. 64, 754-761 (1993))
;zero quantum dephasing using a gradient and spin-
,locking
;at the same time (Davis et al. JMR A 105, 167-183
,(1993))
;with a gradient in the mixing time for water
,suppression
;
;Avance.incl
;Grad.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;
;,"d0=3u"
;,"d11=30m"
;,"d12=20u"
;,"d13=3u"

1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1
d13 do:f1
d12 pl1:f1
50u setnmr2|0 setnmr0|34
p1 ph1
d12 pl2:f1
p2 ph4      ;T1roh filter
d0
d12 pl5:f1
(p5 ph5):f1 (p15:gp5) ;spin-lock and gradient
d16
d12 pl1:f1
p1 ph2
d12 pl9:f1
d8 cw:f1
d13 do:f1
d12 pl1:f1
p16:gp2
d16
3u setnmr2^0 setnmr0^34
p1 ph3
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
d11 ip4
lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph4=1 3
ph5=1 3
ph6=0 2 1 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

```

```

*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f1 channel - power level for T1roh filter (10-15
dB)
;p15 : f1 channel - power level for spin-lock (~ 8 dB)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;
*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - spin lock pulse (10-20 ms,
dependent on the protein)
;p5 : f1 channel - spin-lock pulse
;p15: gradient for zero quantum dephasing [2.5 ms]
;p16: gradient for water suppression during mixing
time [1-2 ms]
;
*****Delays*****
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time with presaturation
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [3 usec]
;d16: gradient recovery delay [50 us]
;
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI
;
*****Gradienten*****
;gradient ratios of ~ 8 % corresponds appr. to the
,spin-lock of 8 dB

```

8.4 2D STD TOCSY-Experiment

```

;mlevprtpspdf.os 08/98
;avance-version
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using
,MLEV17 sequence
;for mixing
;using two power levels for excitation and Spinlock
;presat with shaped pulse defined by frequency list
;internal substraction
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360
,(1985)

#include <Avance.incl>

"p5=p6* 667"
"p7=p6*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"

1 ze
2 d12 fq1:f2
3 d12 pl1:f1
4 p11:sp1:f2
d14
lo to 4 times l7
p1 ph1
d0

```

```

d12 pl10:f1
(p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
(p5 ph23)
lo to 5 times l1
(p17 ph26)
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 2 times td1
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 0 2 2 0 1 3 3 1
ph22=3 1 3 1 0 2 0 2 3 1 3 1 0 2 0 2
ph23=0 2 0 2 1 3 1 3 0 2 0 2 1 3 1 3
ph24=1 3 1 3 2 0 2 0 1 3 1 3 2 0 2 0
ph25=2 0 2 0 3 1 3 1 2 0 2 0 3 1 3 1
ph26=0 2 0 2 1 3 1 3 0 2 0 2 1 3 1 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

;*****Power Level*****
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10: f1 channel - power level for TOCSY-Spinloc
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 30 - 70
;dB
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;
;*****Delays*****
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1 [30 msec]
;d11: delay for disk I/O [20 usec]
;d12: delay for power switching [3 usec]
;d13: short delay [1 msec]
;d14: delay between presat pulses
;
;L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;l7: loop counter, (d14 + p11) * l7 = presaturation time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 16 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPP1
;fq1 : define frequencies for on and off resonance
;presaturation
;O1 499,87000 on resonance (20000HZ) off resonance (-3000HZ)

```

8.5 2D STD TOCSY-Experiment (*epitope mapping*)

```

;stdmlev2fds
;O. Schuster, M. Mayer, B. Meyer, Department of
;Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sgi1.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using
;MLEV17 sequence
;for mixing
;using two power levels for excitation and Spinlock
;writing two files with dslist, subtraction of processed
;data only
;presat with shaped pulse defined by frequency list
;f1
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360
;(1985)
;dummy scans performed after every frequency
;switch

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Avance.incl"
;Avance.incl

"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"

1 ze
  3u fq1:f2
2 d11
3 d7 pl1:f1
4 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 4 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 5 times l1
  (p17 ph26)
  go=2 ph31
  d9 wr #1 if #1 ze fq1:f2
  goto 7
6 d11

```

```

7 d7 pl1:f1
8 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 8 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
9 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 9 times l1
  (p17 ph26)
  go=6 ph31
  d9 wr #2 if #2 id0 ip1 ze fq1:f2
  lo to 3 times td1
exit

```

```

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph22=3 1 3 1 0 2 0 2
ph23=0 2 0 2 1 3 1 3
ph24=1 3 1 3 2 0 2 0
ph25=2 0 2 0 3 1 3 1
ph26=0 2 0 2 1 3 1 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

```

```

*****Power Level*****
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10: f1 channel - power level for TOCSY-Spinlock
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 50 -60
;dB
;
*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p11: shaped pulse [50 msec]
;
*****Delays*****
;d0 : incremented delay (2D [3 usec]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : delay between on and off resonance switch
;[min 30msec]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switchi [20 usec]
;d13: short delay [3 usec]
;d14: delay between presat pul [1 msec]
;
:L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) +
;(p17*2) = mixing time
;l7: loop counter, (d14 + p11) * l7 = presaturation
;time
;in0: 1/(2 * SW) = DW

```

Literatur

9

9. Literatur

- ¹ L.J. Picker, *Curr. Opin. Immunol.*, **6** (1994) 394-406.
- ² N. Hogg und R.C. Landis, *Curr. Opin. Immunol.*, **5** (1993) 383-390.
- ³ M.J. Humphries und P. Newham, *Trends in Cell Bio.*, **8** (1998) 78-84.
- ⁴ L.A. Lasky, *Science*, **258** (1992) 964-968.
- ⁵ L. L. Kiesling und N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **3** (1996) 71-77.
- ⁶ R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6** (1996) 692-702.
- ⁷ M. Mammen, S. Choi und G.M. Whitesides, *Angew. Chem.*, **110** (1998) 2908-2953.
- ⁸ C. Foxall, S.R. Watson, D. Dowhenko, C. Fennie, L.A. Lasky, M. Kiso, A. Ilasegawa, D. Asa, B. Brandly, *J. Cell Biol.*, **117** (1992) 895-902.
- ⁹ A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91** (1994) 7390-7397.
- ¹⁰ T. P. Patel, S. E. Goelz, R. R. Lobb und R. B. Parekh, *Biochemistry*, **33** (1994) 14815-14824.
- ¹¹ Y. Hiramatsu, H. Tsujishita und H. Kondo, *J. Med. Chem.*, **39** (1996) 4547-4553.
- ¹² W. Jahnke, H. C. Kolb, M. J. J. Blommers, J. L. Magnani und B. Ernst, *Angew. Chem.*, **23** (1997) 2715-2719.
- ¹³ K. E. Norman, G. P. Anderson, H. C. Kolb und B. Ernst, *Blood*, **91** (1998) 475-483.
- ¹⁴ C.-Y. Tsai, W. K. C. Park, G. Weitz-Schmidt, B. Ernst und C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8** (1998) 2333-2338.
- ¹⁵ S. Yamazaki, M. Isobe, J. Suzuki, S. Tojo, S. Horie, Y. Okubo und M. Sekiguchi, *J. Heart Lung Transplant*, **10** (1998) 1007-1016.
- ¹⁶ K. J. Yarema und C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **2** (1998) 49-61.
- ¹⁷ T. W. Rademacher, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **9** (1998) 74-79.
- ¹⁸ T. Tsukida, Y. Hiramatsu, H. Tsujishita, T. Kiyo, M. Yoshida, K. Kurokawa, H. Moriyama, H. Ohmoto, Y. Wada, T. Saito und H. Kondo, *J. Med. Chem.*, **40** (1997) 3534-3541.
- ¹⁹ Y. Hiramatsu, H. Moriyama, T. Kiyo, T. Tsukida, Y. Inoue und H. Kondo, *J. Med. Chem.*, **13** (1998) 2302-2307.
- ²⁰ T. Tsukida, H. Moriyama, K. Kurokawa, T. Achiha, Y. Inoue und H. Kondo, *J. Med. Chem.*, **22** (1998) 4279-87.
- ²¹ T. Ikami, N. Tsuruta, H. Inagaki, T. Kakigami, Y. Matsumoto, N. Tomiya, T. Jomori, T. Usui, Y. Suzuki, H. Tanaka, D. Miyamoto, H. Ishida, A. Hasegawa und M. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.*, **46** (1998) 797-806.
- ²² G. Todderud, X. Nair, D. Lee, J. Alford, L. Davern, P. Stanley, C. Bachand, P. Lapointe, A. Marinier, A. Martel, M. menard, J. J. Wright, J. Bajorath, D. Hollenbaugh, A. Aruffo und K. M. Tramposch, *J. Am. Soc. Pharm. Exp. Therap.*, **282** (1997) 1298-1304.
- ²³ R. Stahn, H. Schäfer, F. Kärnchen und J. Schreiber, *Glycobiology*, **8** (1998) 311-319.
- ²⁴ A. Seppo, J.P. Turunen, L. Penttilä, A. Keane, O. Renkonen und R. Renkonen, *Glycobiology*, **6** (1996) 65-71.
- ²⁵ O. Renkonen, S. Toppila, L. Penttilä, H. Salminen, J. Helin, H. Maaheimo, C. E. Costello, J. P. Turunen und R. Renkonen, *Glycobiology*, **7** (1997) 453-461.
- ²⁶ M. Kruszynski, M. T. Nakada, S. H. Tam, A. H. Taylor, W. E. Fieles und G. A. Heavner, *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **331** (1996) 23-30.
- ²⁷ H.B. Stamper und J.J. Woodruff, *J. Exp. Med.*, **144** (1976) 828-838.
- ²⁸ F. Schweizer und O. Hindsgaul, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **3** (1999) 291-298.
- ²⁹ M. A. Gallop, R.W. Barrett, W. J. Dover, S. P. A. Fodor und E. M. Gordon, *J. Med. Chem.*, **37** (1994) 1233-1251.
- ³⁰ M. A. Gallop, R.W. Barrett, W. J. Dover, S. P. A. Fodor und E. M. Gordon, *J. Med. Chem.*, **37** (1994) 1385-1401.
- ³¹ D. C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li und O. Hindsgaul, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37** (1998) 3383-3387.
- ³² Y. Ding, J. Labbe, O. Kanie, O. Hindsgaul, *Bioorg. Med. Chem.*, **4** (1996) 693-692.
- ³³ G. J. Boons, B. M. Heskamp und F. Hout, *Angew. Chem.*, **108** (1996) 3053-3056; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35** (1996) 2845-2847.
- ³⁴ Y. Ding, O. Kanie, J. Labbe, M. M. Palcic, B. Ernst und O. Hindsgaul, *Glycoimmunology*, Plenum Press, (1995) 261-269.
- ³⁵ C. H. Wong, X. S. Ye, Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 7137-7138.
- ³⁶ T. Zhu und G. J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37** (1998) 1898-1900.
- ³⁷ P. M. St. Hilaire und M. Meldal, *Angew. Chem.*, **112** (2000) 1210-1228.
- ³⁸ W. I. Weis, K. Drickamer und W. A. Hendrickson, *Nature*, **360** (1992) 127-134.
- ³⁹ Z. Derewenda, J. Yariv, J. R. Hellwell, A. J. Kalb, E. J. Dodson, M. Z. Papiz, T. Wan, J. Campbell, *EMBO*, **8** (1989) 2189-2193.

- ⁴⁰ B. Shaanan, H. Lis und N. Sharon, *Science*, **254** (1991) 862-866.
- ⁴¹ Y. Bourne, A. Roussel, M. Frey, P. Rouge, J. C. Fontecilla-Camps, C. Cambillau, *Proteins*, **8** (1990) 365-376.
- ⁴² M. S. Quesenberry, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 10831-10841.
- ⁴³ B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K. S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky und D. K. Burns, *Nature* **367** (1994) 532-538.
- ⁴⁴ D. Hollenbaugh, J. Bajorath, R. Stenkamp und A. Aruffo, *Biochemistry* **32** (1993) 2960-2966.
- ⁴⁵ J. Bajorath, D. Hollenbaugh, G. King, W. Harte, D. C. Eustice, R. P. Daeveau und A. Aruffo, *Biochemistry* **33** (1994) 1332-1339.
- ⁴⁶ K. K.-S. Ng und W. I. Weis, *Biochemistry*, **36** (1997) 979-988.
- ⁴⁷ T. Uchiyama, V. P. Vassilev, T. Kajimoto, W. Wong, H. Huang, C. C. Lin, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 5395-5396.
- ⁴⁸ M. Rinnbauer, Dissertation, Univ. Lübeck (1999) 113.
- ⁴⁹ T. P. Kogan, B. M. Revelle, S. Tapp, D. Scott, P. J. Beck, *J. Biol. Chem.*, **270** (1995) 14047-14055.
- ⁵⁰ K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W. T. Wang, R. Weisemann und T. Peters, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34** (1995) 1841-1844.
- ⁵¹ K. Scheffler, J. R. Brisson, R. Weisemann, J. L. Magnani, W. T. Wong, B. Ernst und T. Peters, *J. Biomol. NMR*, **9** (1997) 423-436.
- ⁵² L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad und B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 1727-1736.
- ⁵³ R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah und M. P. Weir, *Biochemistry*, **33** (1994) 10591-10596.
- ⁵⁴ R. Harris, G. R. Kiddie, R. A. Field, M. J. Milton, B. Ernst, J. L. Magnani und S. W. Homans, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 2546-2551.
- ⁵⁵ G. M. Clore and A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.*, **48** (1982) 402-432.
- ⁵⁶ G. M. Clore and A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.*, **53** (1983) 423-442.
- ⁵⁷ F. Ni, *Prog. NMR Spectr.* **26** (1994) 517-606.
- ⁵⁸ A. Zvi, D. Feigelson, Y. Hayek und J. Anglister, *Biochemistry*, **36** (1997) 8619-8627.
- ⁵⁹ A. P. Campbell und B. D. Sykes, *J. Magn. Reson.*, **93** (1991) 77-92.
- ⁶⁰ M. R. Wormald, C. J. Edge und R. A. Dwek, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **180** (1991) 1214-1221.
- ⁶¹ S. W. Homans und M. Forster, *Glycobiology*, **2** (1992) 143-151.
- ⁶² T. J. Rutherford, D. G. Spackman, P. J. Simpson und S. W. Homans, *Glycobiology*, **4** (1994) 59-68.
- ⁶³ Y. Ichikawa, Y. C. Lin, D. P. Dumas, G. J. Shen, E. G. Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson und C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **114** (1992) 9283-9298.
- ⁶⁴ A. Chen und M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 10258-10259.
- ⁶⁵ P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak und S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 12257-12261.
- ⁶⁶ M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, **30** (1962) 11-15.
- ⁶⁷ D. Neuhaus und M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect*, VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, (1989).
- ⁶⁸ P. Balař, A. A. Bothner-By und J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.*, **94** (1972) 4015-4017.
- ⁶⁹ P. Balař, A. A. Bothner-By und E. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **94** (1972) 4017-4018.
- ⁷⁰ B. Meyer, T. Weimar und T. Peters, *Eur. J. Biochem.*, **246** (1997) 705-709.
- ⁷¹ D. Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W. T. Wang, B. Meyer und T. Peters, *Angew. Chem.*, **111** (1999) 106-110.
- ⁷² M. Mayer und B. Meyer, *Angew. Chem.*, **111** (1999) 1902-1906.
- ⁷³ J. Klein, R. Meinecke, M. Mayer und Bernd Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 5336-5337.
- ⁷⁴ K. Akasaka, *J. Magn. Reson.*, **36** (1979) 135-140.
- ⁷⁵ G. Valensin, T. Kushnir und G. Navon, *J. Magn. Reson.*, **46** (1982) 23-29.
- ⁷⁶ P. J. Andree, *J. Magn. Reson.*, **29** (1979) 419-431.
- ⁷⁷ I. Solomon, *CR. Acad. Sci. Paris*, **248** (1959) 92.
- ⁷⁸ S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.*, **29** (1958) 688.
- ⁷⁹ H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, (1996) 283.
- ⁸⁰ P. Goodford, *J. Med. Chem.*, **27** (1984) 557-564.
- ⁸¹ Sybyl, Receptor-Based Design, LeapFrog, Tripos, Inc., St. Louis, (1999) 7-156.
- ⁸² I. D. Kuntz, E. C. Meng und B. K. Shoichet, *Acc. Chem. Res.*, **27** (1994) 117-123.
- ⁸³ R. Judson, *Rev. Comp. Chem.*, **10** (1997).
- ⁸⁴ Sybyl, Receptor-Based Design, FlexiDock, Tripos, Inc., St. Louis, (1999) 7-54.
- ⁸⁵ Sybyl, Tripos, Inc., St. Louis.

- ⁸⁶ R. Stuike-Prill und B. Meyer, *J. Biochem.*, **194** (1994) 903-919.
- ⁸⁷ R. U. Lemieux, K. Bock, K. Delbaere, S. Koto und V. S. Rao, *Can. J. Chem.*, **58** (1980) 631-653.
- ⁸⁸ G. Nemethy, G. Pottle und H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **87** (1983) 1883-1887.
- ⁸⁹ B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Oladson, D. J. States, S. Swaminathan und M. Karplus, *J. Comput. Chem.*, **4** (1983) 187-217.
- ⁹⁰ P. Weiner und P. Kollman, *J. Comput. Chem.*, **2** (1981) 287-303.
- ⁹¹ W. F. Gunsteren und H. J. C. Berendsen, *Mol. Phys.*, **45** (1982) 637-647.
- ⁹² M. Clark, R. D. Cramer und N. Van Opdenbosch, *J. Comput. Chem.*, **10** (1989) 982-1012.
- ⁹³ K. Backhaus, *Multivariate statistische Analysemethoden*, 8. Auflage Berlin (1996).
- ⁹⁴ B. Everitt, *Cluster Analysis* (Second Edition) Heinemann Educational Books London (1980).
- ⁹⁵ T. Arzt, Staatsexamen, Univ. Hamburg (1999).
- ⁹⁶ B. Ernst, Ciba Geigy, Persönliche Mitteilung.
- ⁹⁷ http://www.boc.chem.uu.nl/sugabase/sugabase_java.html
- ⁹⁸ H. Kogelberg, Dissertation, Univ. Oldenburg (1991) 40.
- ⁹⁹ H. Tsujishita, Y. Hiramatsu, N. Kondo, H. Ohmoto, H. Kondo, M. Kiso und A. Hasegawa, *J. Med. Chem.*, **40** (1997) 362-369.
- ¹⁰⁰ W. R. Croasmun und R. M. K. Carlson, *Two-Dimensional NMR Spectroskopie*, VCH Verlagsgesellschaft GmbH Weinheim, (1994) 122.
- ¹⁰¹ M. Clark, R. D. Cramer und N. Van Opdenbosch, *J. Comp. Chem.*, **10** (1989) 982-1012.
- ¹⁰² Sybyl, Force Field, Tripos, Inc., St. Louis, (1999) 80-99.
- ¹⁰³ Sybyl, Force Field, Tripos, Inc., St. Louis, (1999) 160-163.
- ¹⁰⁴ J. Gasteiger und M. Marsili, *Tetrahedron*, **36** (1980) 3219-3228.