

Untersuchungen von Inhibitoren  
der pathologischen Aggregation  
des Tau-Proteins bei der  
Alzheimer Krankheit.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Atilla Çoksezen  
aus Istanbul - Türkei

Hamburg, 2006



Universität Hamburg



Untersuchungen von Inhibitoren  
der pathologischen Aggregation  
des Tau-Proteins bei der  
Alzheimer Krankheit.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 12.01.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2002 bis Oktober 2006 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Joachim Thiem, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die stets wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Der Friedrich-Naumann-Stiftung danke ich für die ideelle Förderung, die mir bei der Entwicklung meiner Persönlichkeit geholfen hat. Die finanzielle Förderung ermöglichte es mir, mich auf die Durchführung dieser Arbeit zu konzentrieren.

*“Such were the professor’s words - rather let me say such the words of fate (...). So much has been done, exclaimed the soul of Frankenstein - more, far more will I achieve; treading in the steps already marked, I will pioneer a new way, explore unknown powers, and unfold to the world the deepest mysteries of creation. (...)*

*From this day natural philosophy, and in particular chemistry, in the most comprehensive sense of the term, became nearly my sole occupation.”*

Aus Mary Shelleys (1797-1851) „Frankenstein“, 1818.





## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	10
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
1.1 Die Alzheimer Krankheit .....	13
1.2 Pathologie der Alzheimer Krankheit .....	15
1.2.1 Amyloide Plaques .....	18
1.2.2 Intrazelluläre Neurofibrillenbündel .....	20
1.2.3 Das Tau-Protein und die Stabilisierung der Mikrotubuli .....	20
1.3 Therapiemöglichkeiten .....	25
<b>2 Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1 Peptidsynthese .....	27
2.2 Charakterisierung von Peptiden .....	29
2.2.1 Massenspektrometrie .....	29
2.2.2 NMR-Spektroskopie .....	30
2.3 NMR-Techniken zur Detektion von Bindungsereignissen .....	32
2.3.1 Auf den trNOE beruhende Experimente .....	32
2.3.2 Veränderungen der chemischen Verschiebungen im $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ -HSQC .....	37
2.3.3 Das DOSY-Experiment .....	37
2.3.4 Veränderungen der Relaxationszeiten .....	38
2.4 Oberflächenplasmonenresonanz - SPR .....	38
<b>3 Problemstellung.....</b>	<b>41</b>
<b>4 Vorarbeiten .....</b>	<b>43</b>

<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>43</b>
5.1	Übersicht der verwendeten Peptide, Proteinkonstrukte und Inhibitoren.....	43
5.2	Bindungsstudien von Peptid <b>t3a</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	46
5.2.1	Synthese und Charakterisierung des Peptids <b>t3a</b> .....	46
5.2.2	Einfluss des Heparins auf die Geschwindigkeit der Komplexbildung .....	47
5.2.3	trNOE Messungen .....	48
5.2.4	STD NMR-Experimente mit Peptid <b>t3a</b> und dem Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	50
5.2.5	Synthese und Charakterisierung des <sup>15</sup> N-markierten <b>t3a15N</b> .....	53
5.2.6	<sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H-HSQC-Experiment zur Interaktionsanalyse des Peptids <b>t3a</b> mit dem Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	56
5.2.7	<sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H-HSQC- und <sup>1</sup> H-STD NMR-basiertes Bindungsepitop von <b>t3a</b> .....	58
5.2.8	SPR-Experimente von Peptid <b>t3a</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	59
5.2.9	Diskussion der Bindungsstudien von Peptid <b>t3a</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	61
5.3	Bindungsstudien von <b>B4D3</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	63
5.3.1	Identifizierung von <b>B4D3</b> .....	63
5.3.2	STD NMR-Experimente mit <b>B4D3</b> und dem Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	64
5.3.3	SPR-Experimente von <b>B4D3</b> an <b>K18</b> .....	68
5.3.4	Vergleich der Dissoziationskonstanten und Diskussion der Bindungsstudien von <b>B4D3</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	71
5.4	Bindungsstudien von <b>B4D3</b> an <b>t3a15N</b> .....	72
5.4.1	<sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H-HSQC-Experiment zur Interaktionsanalyse des Inhibitors <b>B4D3</b> mit dem Peptid <b>t3a15N</b> .....	72
5.5	Bindungsstudien von <b>B4A1</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	75
5.5.1	STD NMR-Experimente mit <b>B4A1</b> und dem Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	75
5.5.2	SPR-Experimente von <b>B4A1</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	78
5.5.3	Vergleich der Dissoziationskonstanten und Diskussion der Bindungsstudien von <b>B4A1</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	81
5.6	Bindungsstudien von <b>B4A1</b> an <b>t3a15N</b> .....	82
5.6.1	<sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H-HSQC-Experiment zur Interaktionsanalyse des Inhibitors <b>B4A1</b> mit dem Peptid <b>t3a15N</b> .....	82
5.7	Bindungsstudien von <b>bb-5</b> an das Tau-Proteinkonstrukt <b>K18</b> .....	84
5.7.1	STD NMR-Experimente von <b>bb-5</b> an <b>K18</b> .....	84
5.7.2	Diskussion der Bindungsstudien von <b>bb-5</b> an <b>K18</b> .....	87
5.8	Ausblick .....	88

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>93</b>
8.1	Verwendete Chemikalien .....	93
8.2	Verwendete Geräte und Materialien .....	94
8.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	95
8.4	Herstellung des Fmoc-L-Lys <sup>15</sup> N <sub>2</sub> (Boc)-OH-Bausteins.....	98
8.5	Peptidsynthesen .....	99
8.6	trNOE-Experimente .....	105
8.7	1D- <sup>1</sup> H-STD NMR-Experimente.....	105
8.8	<sup>15</sup> N, <sup>1</sup> H-HSQC-Experimente .....	108
8.9	SPR-Bindungsstudien.....	109
<b>9</b>	<b>Toxikologie und Handhabung der Chemikalien</b> .....	<b>111</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>125</b>
11.1	Benutzte NMR-Pulsprogramme .....	125
<b>12</b>	<b>Danksagungen</b> .....	<b>140</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>141</b>
<b>14</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-, zweidimensional
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CD	Circular Dichroismus
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
EA	Ethanolamin
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FmocOSu	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)succinimid
FTIR	<i>Fourier transformed Infrared Spectroscopy</i>
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HR-MAS	<i>High Resolution - Magic Angle Spinning</i>
k <sub>on</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k <sub>off</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K <sub>D</sub>	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
LC	<i>Liquid Chromatography</i>

MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time of Flight</i>
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
NFB	Neurofibrillenbündel
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
PAL	<i>peptide amide linker</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PHF	<i>Paired Helical Filaments</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance unit</i>
sAPP	<i>soluble Amyloid Precursor Protein</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TPPI	<i>Time Proportional Phase Increment</i>
trNOE	<i>transferred NOE</i>
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
WATERGATE	<i>Water Suppression by Gradient Tailored Excitation</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Aminosäuren

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

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit ist eine im Alter in Erscheinung tretende und irreversible Erkrankung des Gehirns, die sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren entwickelt. Die Erkrankung wurde das erste Mal im Jahre 1907 vom Psychiater Alois Alzheimer in der Fachliteratur erwähnt, von dem sie auch ihren Namen hat.<sup>1</sup>

Das anfängliche Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch Gedächtnisverlust und Konfusion. Diese Symptome führen Schritt für Schritt zu Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen, gefolgt vom starken Abfall wichtiger kognitiver Fähigkeiten, wie Konzentrations-, Entscheidungs- und Ausdrucksvermögen.

Die Symptome werden durch den Zelltod von Nervenzellen infolge der Krankheit und der dadurch entstehenden Verringerung von Vernetzungen zwischen den Nervenzellen hervorgerufen. Die Alzheimer Krankheit tritt im Allgemeinen erst ab einem Alter von 65 Jahren auf, wobei sich der Anteil der an Alzheimer Erkrankten in den einzelnen Altersgruppen alle fünf Jahre verdoppelt.<sup>2</sup>

Die Krankheit verläuft immer tödlich, wobei als Todesursachen fast immer die durch die Bettlägerigkeit am Ende des Leidens hervorgerufenen Beschwerden, wie z.B. Lungenentzündungen und Nierenversagen, angegeben werden. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Ausbruch der Krankheit liegt bei sieben bis acht Jahren, kann jedoch bis zu 20 Jahre betragen. Der Krankheitsverlauf variiert zwar stark von Fall zu Fall kann aber dennoch in drei grundlegende Stadien eingeteilt werden.<sup>3;4</sup>

Einer der gebräuchlichsten Tests zur Einteilung der Schwere der Krankheit ist der *Mini-Mental State Exam* (MMSE) von Galasko.<sup>5</sup> Es gibt aber auch noch weitere Tests, die zur Diagnose eingesetzt werden.<sup>6-10</sup> Bei allen beschriebenen Tests handelt es sich um psychiatrische Verfahren. Die folgende Tabelle 1.1 zeigt eine Zusammenfassung einiger Einschränkungen und Veränderungen der Patienten in Abhängigkeit von der Einteilung nach den Stadien der Erkrankung und nach MMSE-Punkten.

Ein großes Problem stellt die eindeutige Diagnose *ante mortem* dar. Itoh et. al beschrieben eine Methode, bei der die Konzentration eines Proteins in der Zerebrospinalflüssigkeit als Indikator für die Erkrankung genutzt werden kann, die jedoch nur eine Sensitivität und Spezifität von ca. 85 % liefert.<sup>11</sup> Die eindeutige Diagnose kann zurzeit nur *post mortem* durch pathologische Untersuchungsmethoden am Gehirn durchgeführt werden.

**Tabelle 1.1: Einschränkungen und Veränderungen der Fähigkeiten und des Sozialverhaltens in Abhängigkeit der Krankheitsphase.**

Stadium (MMSE - Punkte)	Einschränkungen und Veränderungen	
	der Fähigkeiten	des sozialen Verhaltens
<b>Frühes Stadium (21-30)</b>	Aufnahmefähigkeit Ausdrucksvermögen Problemlösungen Urteilsvermögen Rechenkraft	Teilnahmslosigkeit soziale Isolation Depressionen Reizbarkeit
<b>Mittleres Stadium (10-20)</b>	Kurzzeitgedächtnis Namensgedächtnis Paraphasie Bewusstsein Orientierung (räuml. & zeitl.)	Wahnvorstellungen Depressionen Schlafstörung Erregbarkeit
<b>Spätes Stadium (&lt;10)</b>	Aufmerksamkeit Motorik Sprache	extreme Erregbarkeit (physisch und verbal)

Die Alzheimer Krankheit ist mit sehr hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. So wurden 1998 die Kosten pro Jahr und Patient in den USA auf 18 000 bis 36 000 US-Dollar geschätzt.<sup>12</sup> Die jährlichen Gesamtkosten in den USA wurden in zwei Studien auf ca. 100 Milliarden US-Dollar geschätzt.<sup>13;14</sup> Diese Zahlen lassen sich auch auf Deutschland übertragen. Neuere Zahlen aus den Jahren 2005/2006 beziffern die Kosten auf 43 000 Euro pro Jahr und Patient bzw. 5.6 Milliarden Euro jährlichen Gesamtkosten für das Gesundheitssystem.<sup>3;15</sup>

Die demographische Entwicklung ist ebenso von immenser Bedeutung. So wird geschätzt, dass momentan weltweit 15 Millionen Menschen von der Alzheimer Krankheit betroffen sind. Bei der jetzigen Entwicklung wird diese Zahl im Jahre 2020 auf 30 Millionen und im Jahre sogar 2050 auf 50 Millionen angestiegen sein.<sup>3</sup> Die WHO beziffert den Anstieg der Todesfälle durch Alzheimer von 1998 bis 2002 von 216 000 auf 400 000 - ein Anstieg um 85 %. Der Vergleich mit der Krankheit *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) untermauert hierbei die hohe gesellschaftliche Relevanz. Im gleichen Zeitraum stieg die Anzahl der Todesfälle durch Aids um 22 % von 2.3 Millionen auf 2.8 Millionen.<sup>16;17</sup>

In Zusammenhang mit den Veränderungen der Altersstrukturen durch gesteigerte Lebenserwartung, Rückgang der Geburtenraten und den Folgen des ersten Babybooms (1946 bis 1964) stellt dies ein großes Problem für die Gesundheitssysteme in den Industriestaaten dar. All dies rückt die Verbesserung der zurzeit sehr stark beschränkten

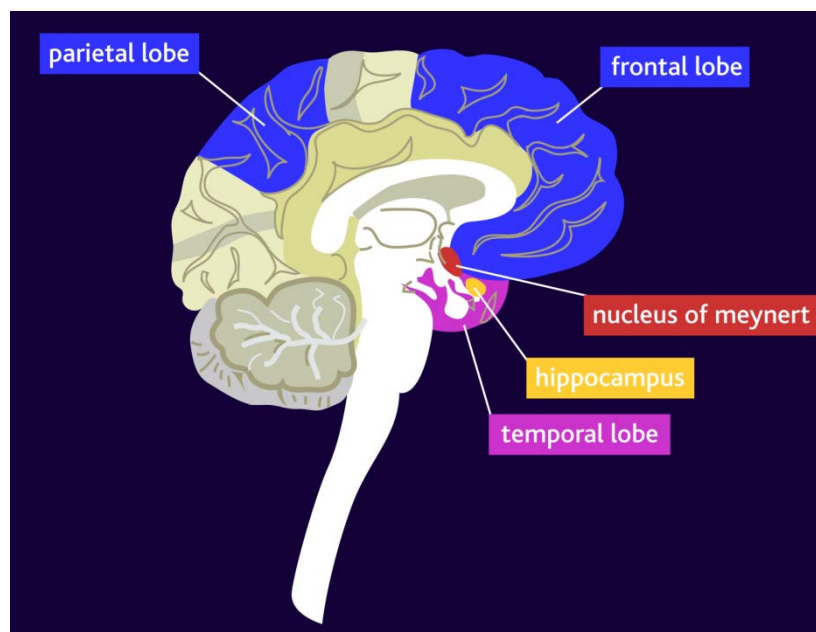


Diagnose- und Therapiemöglichkeiten auf hohe Priorität. So würde eine Therapie, welche den Fortschritt in der Krankheit um fünf Jahre hinauszögern kann, die Zahl der im Jahre 2050 an Alzheimer Demenz Erkrankten auf 25 Millionen halbieren.<sup>18;19</sup>

## 1.2 Pathologie der Alzheimer Krankheit

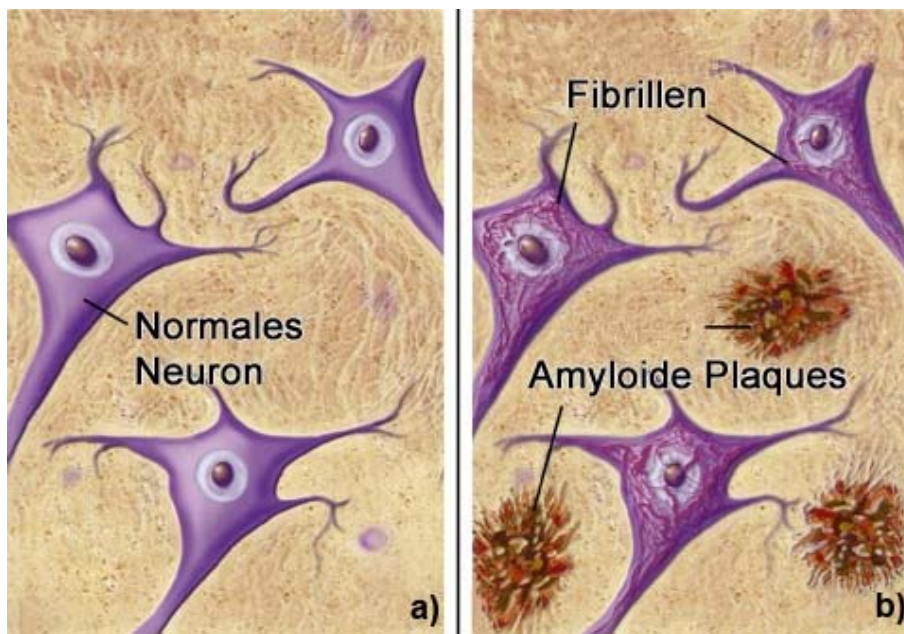
Das menschliche Gehirn bleibt im Normalfall bis über das 100. Lebensjahr hinaus voll funktionsfähig. Das physiologische Altern ohne neurodegenerative Krankheiten führt nicht zwangsläufig zum vermehrten Absterben der Nervenzellen.<sup>20</sup> Durch die Alzheimer Krankheit jedoch kommt es zum enormen Verlust großer Mengen an Nervenzellen.

Braak et al. haben 1991 eine Studie veröffentlicht, in der sie die Reihenfolge der betroffenen Gehirnregionen in sechs Stufen darlegen, die von neurofibrillären Ablagerungen betroffen sind: Als erstes sterben vermehrt Nervenzellen des Hippocampus und der dazugehörigen Regionen, wie der Meynert-Kern (*nucleus of Meynert*) ab (s. Abbildung 1-1). Sie spielen eine wichtige Rolle für das Kurzzeitgedächtnis, da sie für die Herstellung des Neurotransmitters Acetylcholin zuständig sind. Darauf folgt der Verfall von Strukturen in den Stirn-, Scheitel- und Schläfenlappen (*frontal, parietal and temporal lobe*), die v.a. für Sprachvermögen und logisches Denken zuständig sind. Im fortgeschrittenen Stadium verlieren sämtliche Neuronen in fast allen Gehirnregionen ihre Funktionsfähigkeit und der Patient entwickelt die beschriebenen dramatischen Symptome. Die Reihenfolge der Veränderungen in den unterschiedlichen Regionen lässt sich gut mit den in den unterschiedlichen Stadien beobachteten Verlusten der Fähigkeiten der Patienten in Deckung bringen.<sup>21</sup>



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung eines Gehirnschnitts und der durch Alzheimer betroffenen Regionen.**<sup>22</sup>

Zellulär äußert sich die Alzheimer Krankheit hauptsächlich in vier Symptomen: in zwei unterschiedlichen abnormalen Typen von Proteinablagerungen, der Verringerung der Verknüpfungsanzahl zwischen den Nervenzellen und dem Absterben derselbigen.<sup>2</sup> Bei den Proteinablagerungen handelt es sich um extrazelluläre amyloide Plaques und intrazelluläre Neurofibrillenbündel, die beide in der folgenden schematischen Abbildung 1-2 im Vergleich zu physiologischem Hirngewebe aufgezeigt sind.



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung a) gesunder und b) durch die Alzheimer Krankheit mit amyloiden Plaques und Neurofibrillen veränderter Neuronen.<sup>3</sup>**

Obwohl sich der Kenntnisstand der an der Alzheimer Krankheit beteiligten Faktoren in den letzten Jahren stark verbessert hat, gehen die Meinungen, welche Faktoren Ursache und welche Faktoren Wirkung der Krankheit sind, stark auseinander. Die folgende Abbildung 1-3 zeigt eine Übersicht der an der Krankheit beteiligten Faktoren. Es wird deutlich, dass es sich um ein kompliziertes Zusammenspiel unter Beteiligung verschiedenster Rezeptoren und Proteine handelt. Trotzdem wird davon ausgegangen, dass amyloide Plaques oder Neurofibrillenbündel bzw. deren Entstehung mit größter Wahrscheinlichkeit das Hauptereignis im neuronalen Abbau und damit in der Entstehung der Alzheimer Krankheit darstellen.

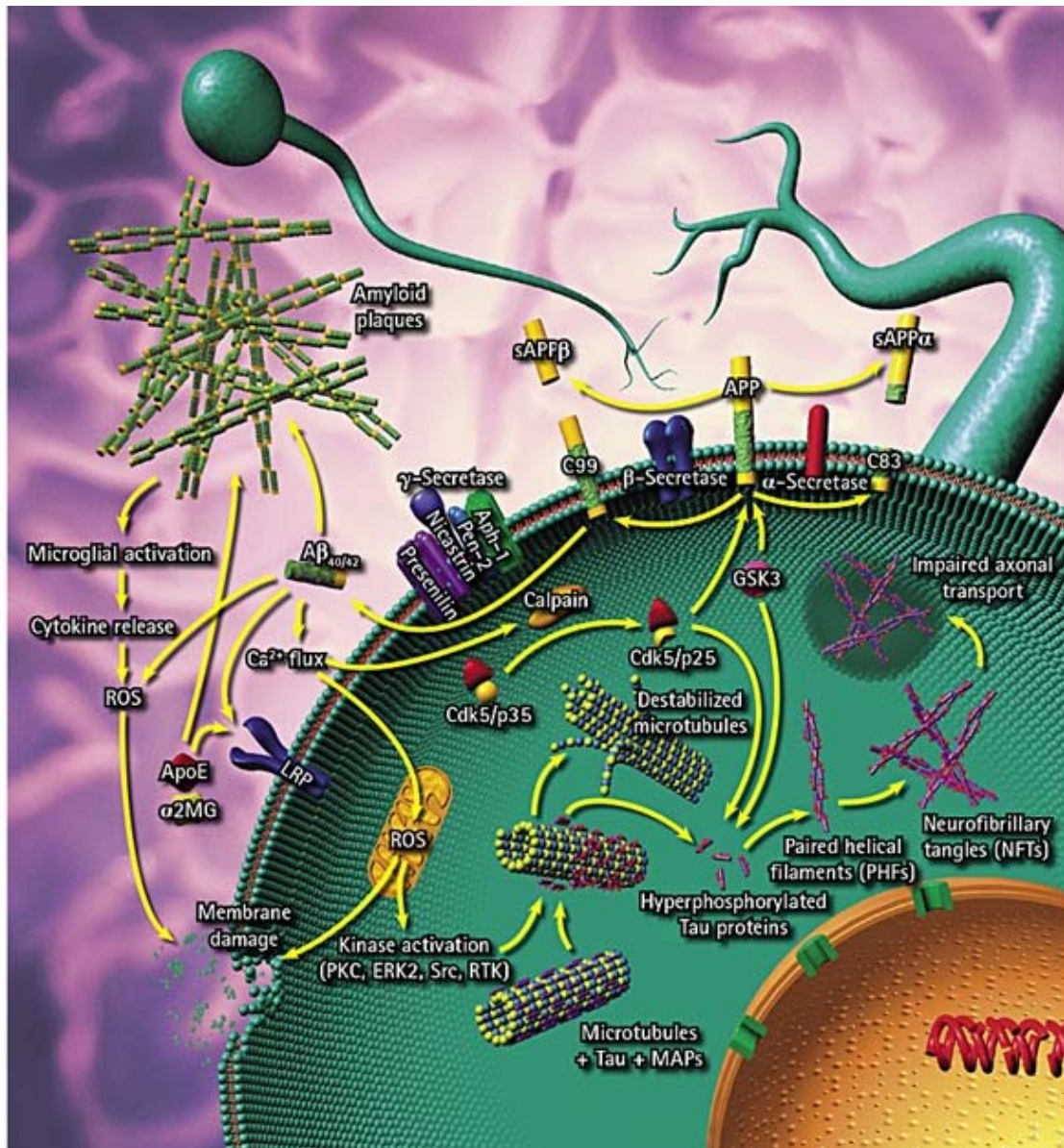
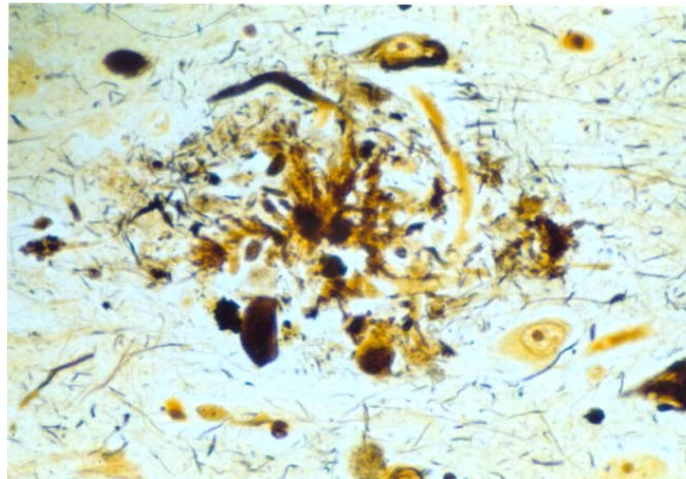


Abbildung 1-3: Übersicht der an der Alzheimer Krankheit zu beteilig scheinenden Faktoren.<sup>23</sup>

### 1.2.1 Amyloide Plaques

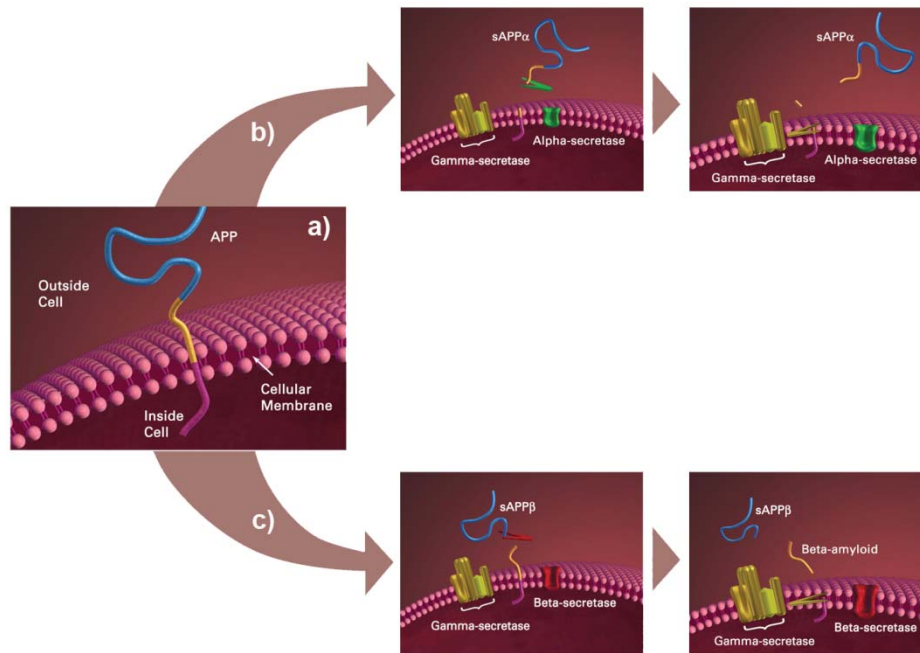
Wie schon im vorigen Abschnitt kurz beschrieben wurde, äußert sich die Alzheimer Krankheit unter anderem neuropathologisch in extrazellulär abgelagerten, amyloiden Plaques. Die Bezeichnung „amyloid“ beschreibt die stärkeähnliche Möglichkeit der Anfärbung durch Iodreagenzien. Diese Ansammlungen bestehen zu einem großen Teil aus dem Amyloid- $\beta$ -Protein und können einen Durchmesser von bis zu mehreren Millimetern erreichen (s. Abbildung 1-4).<sup>24</sup>



**Abbildung 1-4: Nach Bielschowsky angefärbtes, hippocampales Hirngewebe (500-fach vergrößert): Amyloide Plaque mit dystrophischen Neuronen in der Umgebung.**<sup>25</sup>

Das Amyloid- $\beta$ -Protein ist ein Bruchstück aus dem *Amyloid Precursor Protein* (APP), einem integralen Membranprotein (s. Abbildung 1-5), das in mehreren Isoformen vorkommt.<sup>26</sup> Das aus 695 Aminosäuren bestehende APP695 ist am häufigsten anzutreffen<sup>27</sup> Es ist ausschließlich auf Nervenzellen zu finden<sup>28</sup>

Durch endoproteolytische Spaltung des APP werden neben den extrazellulären sAPP-Proteinen mit Molmassen von 72-74 kDa kleinere Bruchstücke mit Molmassen von 3-4 kDa gebildet.<sup>29;30</sup> Hierbei sind zwei verschiedene Pfade für den Abbau des APP zu beobachten (s. Abbildung 1-5). Bei der physiologischen Variante wird das APP zuerst von der  $\alpha$ -Sekretase und anschließend von der  $\gamma$ -Sekretase gespalten - es entsteht dabei sAPP $\alpha$  mit einer Molmasse von 74 kDa und das p3-Peptid mit 3 kDa. Bei der amyloidogenen und somit pathogenen Variante wird das Protein zuerst von der  $\beta$ -Sekretase und anschließend von der  $\gamma$ -Sekretase gespalten - es entstehen dabei sAPP $\beta$  mit 72 kDa und das Amyloid- $\beta$ -Protein mit 4 kDa.<sup>2;31;32</sup>



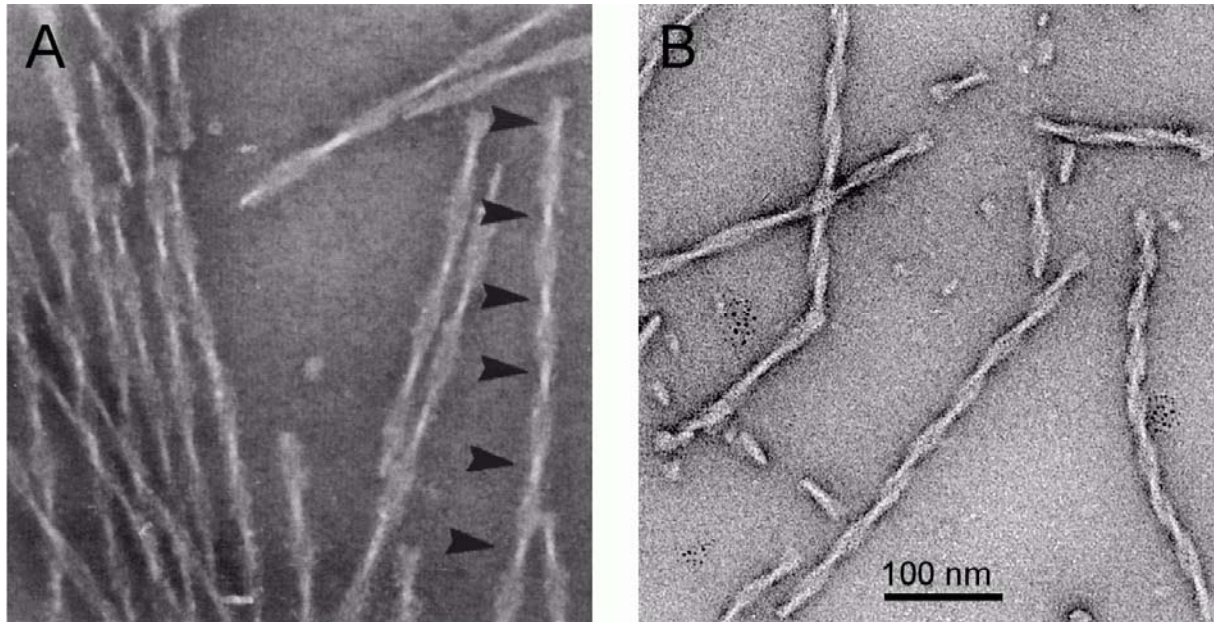
**Abbildung 1-5: a) Schematische Darstellung des Membranproteins APP. b) physiologische und c) amyloidogene Variante der endoproteolytischen Spaltung des APP.<sup>2</sup>**

Das Amyloid-β-Protein (auch als Beta-Amyloid bezeichnet) ist ein lösliches Protein, das in geringer Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Blut auch gesunder Menschen zirkuliert, wobei das Aβ40 am häufigsten vorkommt.<sup>33</sup> Die Konzentration dieser Proteine ist im Falle der Erkrankung jedoch soweit erhöht, dass es zur Anreicherung in Form von für die Alzheimer Krankheit typischen Plaques kommt.<sup>34;35</sup>

Ob die Anreicherung der Amyloid-β-Proteine in Plaques Ursache oder Ergebnis der Alzheimer Krankheit ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Da das Verteilungsmuster der Plaques nicht mit dem Muster der durch die Neurofibrillen zerstörten Neuronen und vor allem nicht mit dem neuronalen Schaden im von der Alzheimer Krankheit betroffenen Gehirn übereinstimmt, ist eine direkte, von ihnen ausgehende Neurotoxizität anzuzweifeln.<sup>24;36</sup> Es ist eher davon auszugehen, dass es sich bei den amyloiden Plaques um eine Begleiterscheinung der Alzheimer Erkrankung handelt.

### 1.2.2 Intrazelluläre Neurofibrillenbündel

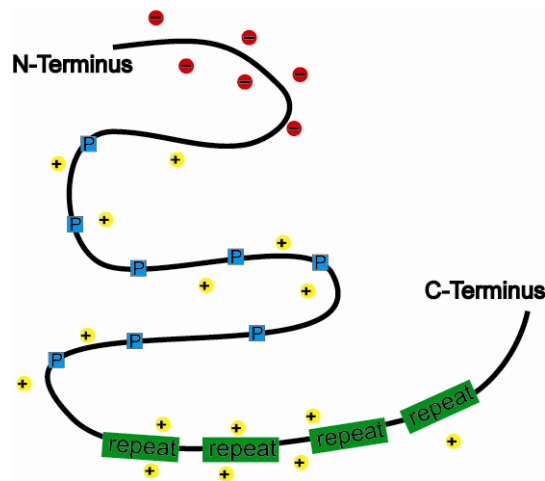
Die zweite neuropathologische Veränderung sind intrazelluläre Neurofibrillenbündel (NFB), die aus ungeordneten Ansammlungen der gepaart helikalen Filamente (*Paired Helical Filaments* - PHF) des Tau-Proteins bestehen (s. Abbildung 1-6).<sup>37</sup>



**Abbildung 1-6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der PHFs A) aus dem Gehirn eines verstorbenen Alzheimer Patienten, B) in vitro hergestellt aus htau23, der kleinsten Isoform der humanen Tau-Proteine.**<sup>38</sup>

### 1.2.3 Das Tau-Protein und die Stabilisierung der Mikrotubuli

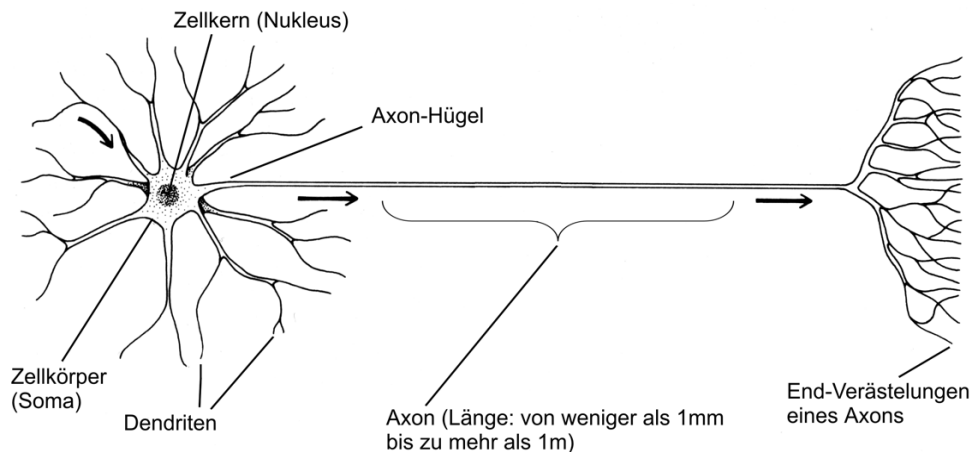
Das Tau-Protein ist ein sehr hydrophiles Protein, welches viele polare und geladene Gruppen hat und selbst nach Hitze- oder Säureeinwirkung in Lösung bleibt.<sup>39;40</sup> Es kann in drei Domänen eingeteilt werden - einem aciden N-Terminus, einem basischen, prolinreichen Mittelteil und einer basischen „repeat“-Domäne am C-Terminus (s. Abbildung 1-7).<sup>41;42</sup>



**Abbildung 1-7: Darstellung des Tau-Protein mit Gegenionen.**

Es hat in seiner natürlichen Form keine geordnete Struktur, sondern liegt ungeordnet vor.<sup>40</sup> Im zentralen Nervensystem sind sechs Isoformen mit 352 bis 441 Aminosäuren (ca. 40-50 kDa) anzutreffen.<sup>43-46</sup> Im peripheren Nervensystem sind auch noch größere Isoformen mit Molmassen von 50-70 kDa vorhanden.<sup>47</sup>

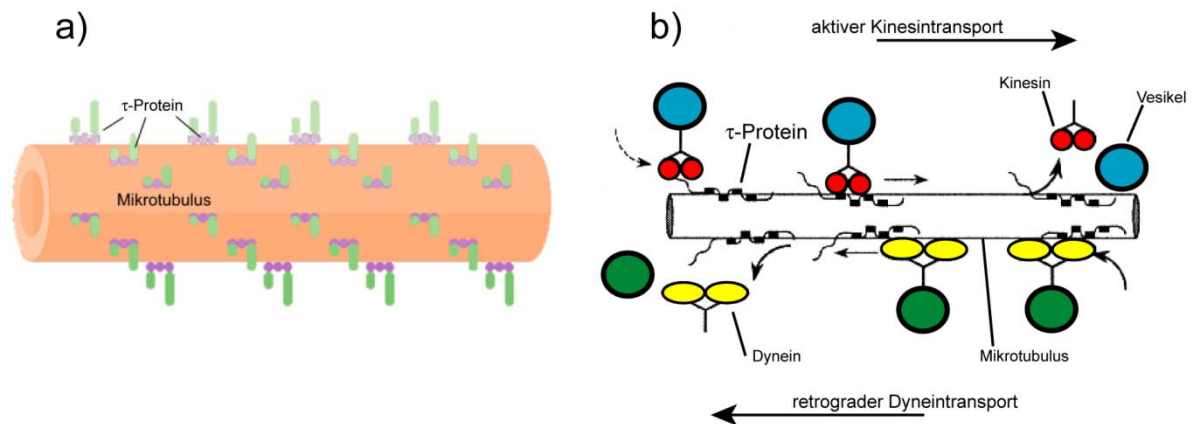
Die axonalen Fortsätze der Neuronen sind durch ihre Länge von bis zu einem Meter auf aktiven Stofftransport zur Versorgung aller Bereiche innerhalb der Zelle angewiesen.



**Abbildung 1-8: Schematische Darstellung eines Neurons ohne Myelinschicht.**

Der natürliche Bindungspartner des Tau-Proteins ist das Tubulin, welches in Form von langen Polymeren die Mikrotubuli bildet. Die wiederum reichen im Inneren des Neurons vom Zellkern bis zu den Endverästelungen der Axone. Die Mikrotubuli werden vom Tau-Protein stabilisiert. Es bindet in definierten Abständen an die Mikrotubuli, um sie zu stabilisieren und reiht sich in die Reihe der *Microtubule Associated Proteins* (MAPs) ein, deren Gemeinsamkeit die hohe Sequenzhomologie der bindenden *repeat*-Domänen ist. Der intrazelluläre Transport findet auf den Mikrotubuli statt. Dadurch wird ermöglicht, dass Stoffe (z.B. Neurotransmitter, Enzyme, etc.) in Zellorganellen (z.B. Vesikel und Mitochondrien)

mittels Motorproteinen (Kinesin und Dynein) an die Enden der Axone und zurück zum Zellkern transportiert werden können (s. Abbildung 1-9).<sup>37;48-57</sup>

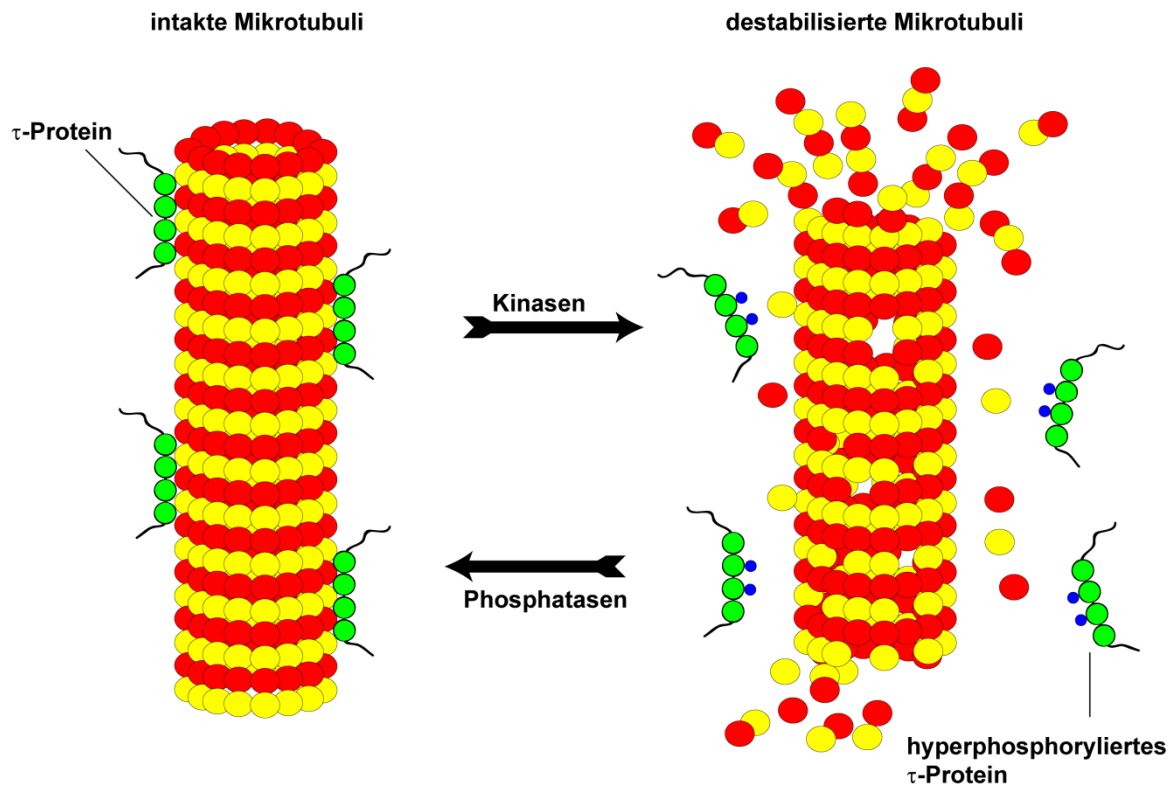


**Abbildung 1-9: Ausschnitt aus einem Mikrotubulus a) zur Darstellung der Stabilisierung durch das Tau-Protein und b) zur Darstellung des aktiven Kinesintransportes zum Axonenende und des retrograden Dyneintransportes zum Zellkern.**

Durch die Alzheimer Krankheit wird das Gleichgewicht jedoch gestört, das Tau-Protein stabilisiert nicht mehr die Mikrotubuli, sondern bildet Aggregate. Als Folge fallen die Mikrotubuli auseinander, die erwähnten Transportfunktionen können nicht mehr erfüllt werden, was zur Verkümmern und schließlich zum Tod der Nervenzellen führt. Die Lage des Gleichgewichts wird u.a. durch Phosphorylierungen an der Proteinsequenz beeinflusst. Die Phosphorylierung im Mittelteil des Tau-Proteins durch Kinasen und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen dient dieser Regulierung des dynamischen Gleichgewichts der Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und dem Tau-Protein.<sup>58</sup> Eine Phosphorylierung an Ser<sup>214</sup> und Ser<sup>262</sup> führt zu einem drastischen Abfall der Bindungsaffinität zum Mikrotubulus, so dass sich das Protein von Tubulin ablöst (s. Abbildung 1-10 ).<sup>59</sup> Widersprüchlich ist, dass die Phosphorylierung vom Tau-Protein die Bildung der PHFs verlangsamt. Trotzdem sind die Proteine, die in den NFBs und den PHFs aufgefunden werden, hyperphosphoryliert. Eine besondere Rolle spielen die Phosphorylierungen an den KXGS-Motiven (X = beliebige Aminosäure) durch die MARK-Kinase innerhalb der *repeat*-Regionen. Die Frage, ob die Bildung der Aggregate eine direkte Folge der Hyperphosphorylierung ist, ist noch zu klären.<sup>60</sup>

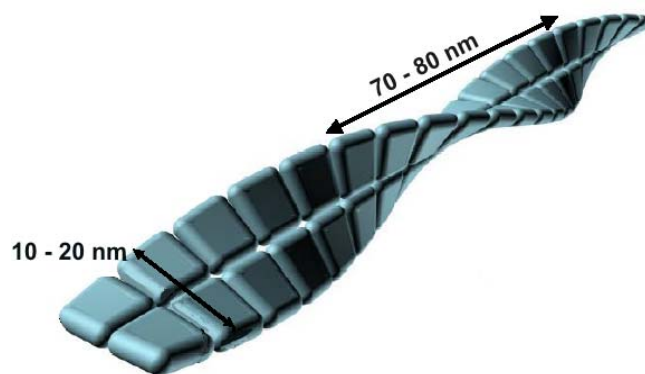
Der Einfluss weiterer posttranslationaler Modifikationen, wie Glycosylierungen und Ubiquitinierungen ist ebenfalls noch nicht eindeutig beschrieben.<sup>61-63</sup>





**Abbildung 1-10: Schematische Darstellung des Mikrotubuli / Tau-Protein-Gleichgewichts.**

Die polymerisierten PHFs zeigen gepaart helikale Struktur mit einer „repeat distance“ von 70 bis 80 nm und einem Durchmesser von 10 bis 20 nm (s. Abbildung 1-6 und Abbildung 1-11).<sup>64</sup> Außerdem sind alle sechs Isoformen des Tau-Proteins in den PHFs wieder zu finden.<sup>65-68</sup>



**Abbildung 1-11: Darstellung der Größe der PHFs.**

Die Bindung des Tau-Proteins an die Mikrotubuli erfolgt durch die vier *repeats* am C-Terminus, der gleichen Region, die auch für die Bildung der PHFs zuständig ist.<sup>41;42;69</sup> Der Kern der PHFs besteht hauptsächlich aus dieser Region, die im Vergleich zum Rest auch sehr proteasestabil ist.<sup>70</sup> Als kleinste, bindende Motive wurden die Hexapeptide <sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup> und <sup>275</sup>VQIINK<sup>280</sup> identifiziert, die an das Tau-Protein binden.<sup>71</sup> Beide Motive bilden für sich

schon vermehrt  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Ungefaltete Peptidteile bilden ebenfalls intermolekulare  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die durch FTIR nachgewiesen wurden.<sup>72;73</sup> Die Wichtigkeit der *repeat*-Regionen wird dadurch bestätigt, dass sie schneller aggregieren als größere Proteinkonstrukte.<sup>74</sup>

Viele Faktoren, die einen Einfluss auf die PHF-Bildung zu haben scheinen, wurden durch unterschiedliche Methoden schon in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Polyanionen verschiedenster Art, die extrazellulär (z.B. Heparin) und intrazellulär (z.B. Ribonukleinsäuren, acide Peptide, sogar Tubulin) aufzufinden sind, die Aggregation beschleunigen.<sup>75-80</sup> Trotzdem verläuft die Aggregation des Proteins zu den PHFs langsam.<sup>74</sup> Großen Einfluss scheint eine vorausgehende Dimerisierung durch Disulfidbildung an Cys<sup>322</sup> zu haben, die der geschwindigkeitbestimmende Schritt zu sein scheint.<sup>81</sup> Zur Erklärung der Aggregation wird ein Nukleations- / Kondensationsmechanismus vorgeschlagen.<sup>82;83</sup> Auch der Einfluss von Mutationen ist im Zusammenhang mit erblicher Vorbelastung untersucht worden. Alle im Zusammenhang stehenden Mutationen führen zu einem Verlust der Bindung an die Mikrotubuli, dem damit einhergehenden Abbau der Mikrotubuli und der dadurch erhöhten Bildung von PHFs.<sup>69</sup>

Trotzdem ist auch bei Anwesenheit von Polyanionen und unter oxidativem Einfluss die Bildung der PHFs relativ langsam, so dass die Suche nach weiteren Auslösern und Gründen fortzuführen ist.<sup>84</sup> Es scheint, dass durch unbekannte Faktoren das Gleichgewicht der Bindung zwischen dem Tau-Protein und den Mikrotubuli gestört wird. Da die Mikrotubuli auseinander fallen, verkürzt sich die Strecke, die von den Motorproteinen zurückgelegt werden kann.<sup>85</sup> Die Unterversorgung der Axonenden führt zum Tod der Zelle. Die unnatürlich hohe Konzentrationen an Tau-Protein und der gestörte Zellverkehr führen zur Anreicherung im Zellkörper und den typischen Ablagerungen.<sup>54</sup>

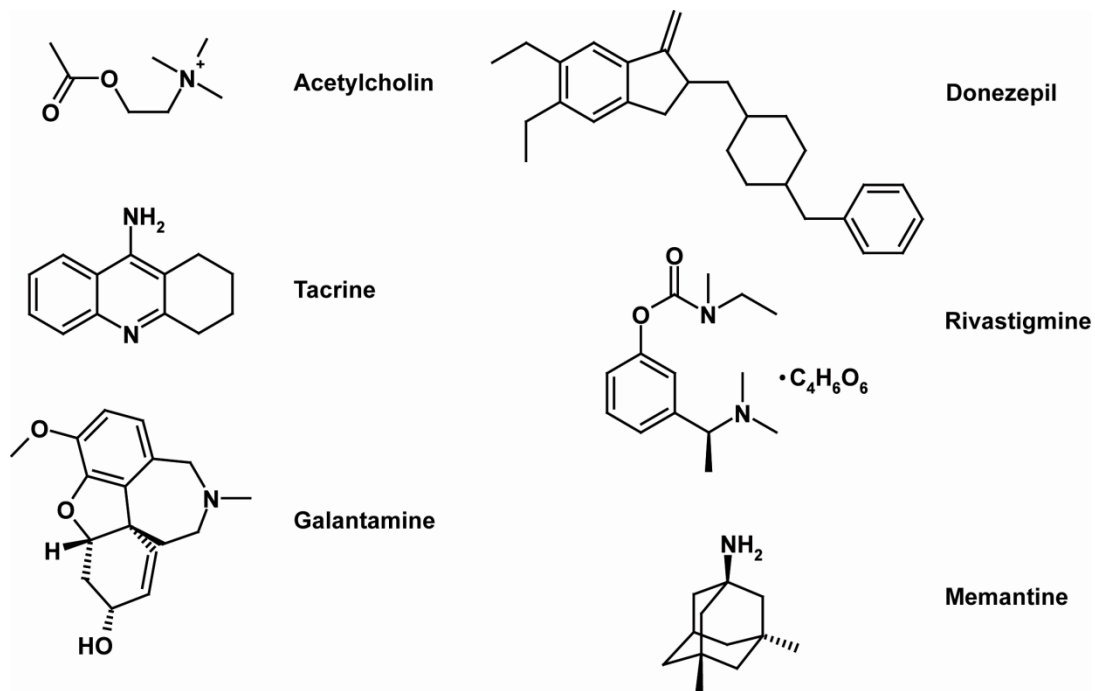
Abschließend bleibt zu sagen, dass Verteilung und Dichte der PHFs mit dem Fortschritt der Krankheit korrelieren und zur Einteilung der verschiedenen Phasen der Alzheimer Demenz genutzt werden können.<sup>21;54;86;87</sup> Von großem Interesse ist auch der Zusammenhang zu anderen so genannten Tauopathien, neurodegenerative Krankheiten, die ebenfalls zu Aggregaten des Tau-Proteins führen, wie z. B. Frontotemporale Demenz mit Parkinson Syndrom in Zusammenhang mit Chromosom 17 (FTDP-17), Morbus Pick, und weitere. Die Ergebnisse der Alzheimer Forschung könnten auch dort zu Fortschritten führen.<sup>21;54;88;89</sup>

### 1.3 Therapiemöglichkeiten

Jacobs et al. haben 2005 eine Übersicht der derzeit genutzten Wirkstoffe und Angriffspunkte für neue Wirkstoffe publiziert.<sup>90</sup> Die momentan zur Verfügung stehenden Wirkstoffe nehmen keinerlei Einfluss auf die Krankheit selbst, sondern bekämpfen lediglich die Symptome und werden folgend eingehend beschrieben.

Der verstärkte Zelltod acetylcholinproduzierender Nervenzellen führt zum ersten Therapieansatz. Die Acetylcholinesteraseinhibitoren hemmen den natürlichen Abbauweg des Acetylcholins durch die Acetylcholinesterase. Ihre Aufgabe ist die natürliche Regulierung der Neurotransmission an den Synapsen durch Zerstörung des Neurotransmitters Acetylcholin.<sup>91;92</sup> Der erste Wirkstoff, Tacrine, wurde wegen starker Hepatotoxizität vom Markt gedrängt und von Donezepil und Galantamine, zwei selektiven Acetylcholinesterasehemmern substituiert.<sup>93;94</sup> Mit Rivastigmine steht ein neuer Wirkstoff zur Verfügung, der sowohl die Acetylcholinesterase als auch die Butyrylcholinesterase zu inhibieren vermag.<sup>95</sup>

Es wird vermutet, dass oxidativer Stress und glutamatinduzierte Exitotoxizität ebenfalls eine Rolle bei der beobachteten Neurodegeneration spielen.<sup>96;97</sup> Der Wirkstoff Memantine blockiert den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, einen der wichtigsten Glutamatrezeptoren im Gehirn. Dadurch soll die erhöhte pathogene Glutamatkonzentration verringert und damit die Neurodegeneration verhindert werden.<sup>98</sup>



**Abbildung 1-12:** Acetylcholin und die Acetylcholinesterasehemmer Tacrine, Galantamine und Donezepil. Mit Rivastigmine steht ein Wirkstoff zur Verfügung, der auch die Butyrylcholinesterase inhibiert. Memantine ist ein N-Methyl-D-Aspartat-Inhibitor.

Sowohl die Cholinesterasehemmer als auch der N-Methyl-D-Aspartat-Inhibitor können die Alzheimer Krankheit nicht stoppen, sondern nur für wenige Jahre die Verschlimmerung der Symptome verlangsamen. Deshalb besteht großer Bedarf an einem Medikament, welches die Ursachen des neuronalen Abbaus bekämpfen oder sogar aufhalten kann.

Laut Jacobsen et al. sind ca. 40 Wirkstoffe in den klinischen Testphasen, die nach verschiedenen Mechanismen wirken sollen:

- Verringerung der Produktion von amyloidogenen Peptiden durch:
  - Inhibition der  $\beta$ -Sekretase
  - Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase
  - Begünstigung der  $\alpha$ -Sekretase
  - aktive und passive Immunisierung.
- Beschleunigung des Abbaus von amyloidogenen Peptiden und der Modulation der Phosphorylierung des Tau-Proteins.<sup>90</sup>

## 2 Methoden

### 2.1 Peptidsynthese

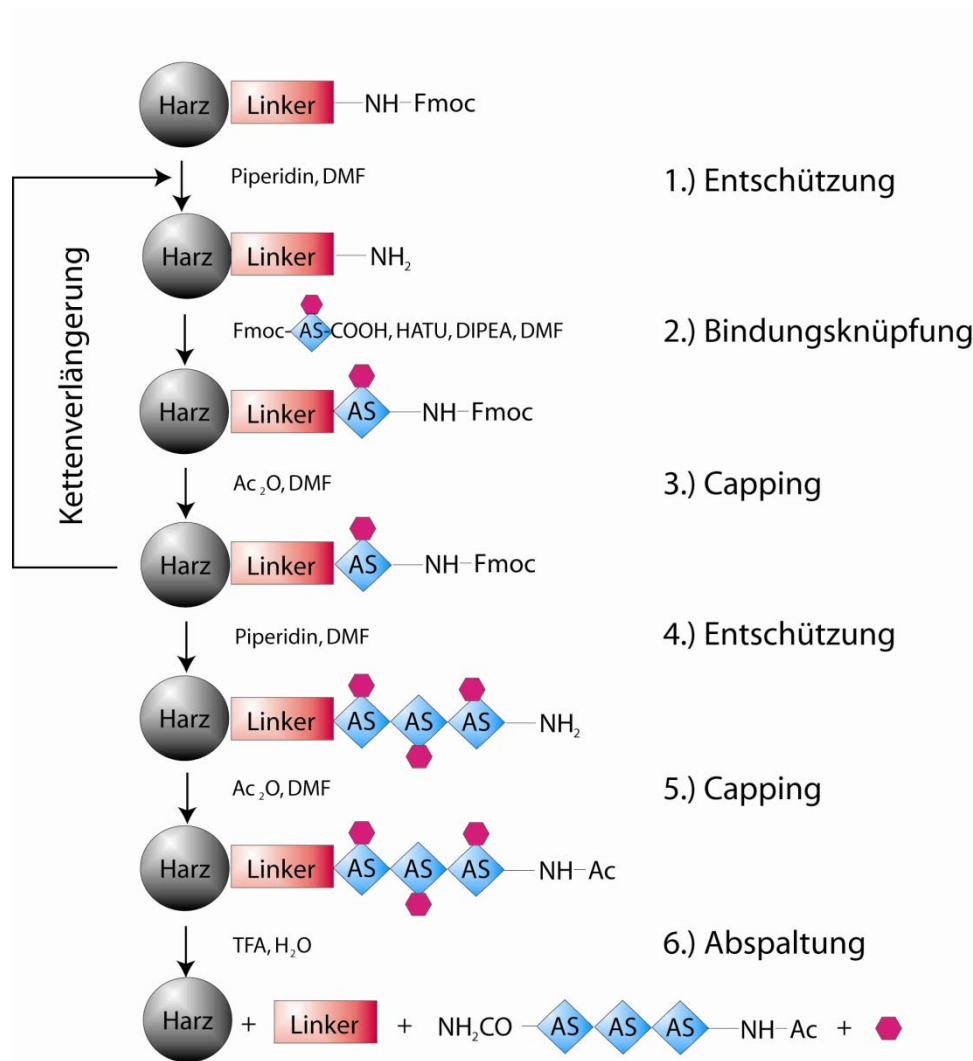
Zur Peptidsynthese werden heutzutage drei Methoden angewandt, bei denen die Aminosäuren in vorgegebener Reihenfolge über eine Peptidbindung miteinander verknüpft werden. In Kapitel 2.1.1 wird die rein chemische Methode nach Merrifield näher erläutert.<sup>99</sup> Die beiden anderen Methoden sind der enzymatische Aufbau unter Verwendung von Peptidasen, sowie die vor allem für Proteine angewandte, in Expressionssystemen durchgeführte gentechnologische Synthese.<sup>100;101</sup>

#### 2.1.1 Festphasenpeptidsynthese

Ziel der chemischen Peptidsynthese ist die wiederholte Ausbildung von Peptidbindungen. Sie wird entsprechend der Sequenz des Peptids zwischen der Carboxylfunktion einer und der Aminofunktion einer anderen Aminosäure geknüpft. Da Aminosäuren bi- oder trifunktionelle Moleküle sind, müssen zur selektiven Verknüpfung der Aminosäuren Bedingungen gefunden werden, bei denen immer nur die gewünschten Funktionalitäten reagieren können. Durch den Einsatz von Schutzgruppen kann dies bewerkstelligt werden. Ferner muss beachtet werden, dass die zu reagierende Carboxylfunktion in eine reaktivere Aktivesterfunktion überführt werden muss, um die Knüpfung der Peptidbindung unter angemessen milden Bedingungen durchzuführen, was durch Aktivatoren ermöglicht wird.

Durch die bahnbrechende Entwicklung der Festphasensynthese von R. B. Merrifield (Nobelpreis 1984) wurde die automatisierte Peptidsynthese erst ermöglicht.<sup>99;102</sup> Im Gegensatz zur biologischen Syntheserichtung werden bei der Festphasensynthese die Aminosäuren vom C- zum N-Terminus miteinander verknüpft. Die wachsende Peptidkette ist an ein funktionalisiertes Polystyrolharz als feste Phase mittels Linker gebunden. Durch die feste Bindung des Reaktionsproduktes an die Festphase ist es möglich, nicht reagierte Komponenten durch einfaches Waschen zu entfernen. Nach der Synthese wird das Peptid je nach Wahl des Linkers carboxyterminal als freie Säure oder als Säureamid vom Polystyrolharz abgespalten. Die Seitenketten der Aminosäuren können durch die Wahl des Linkers mit geeigneten Abspaltbedingungen frei oder geschützt erhalten werden.

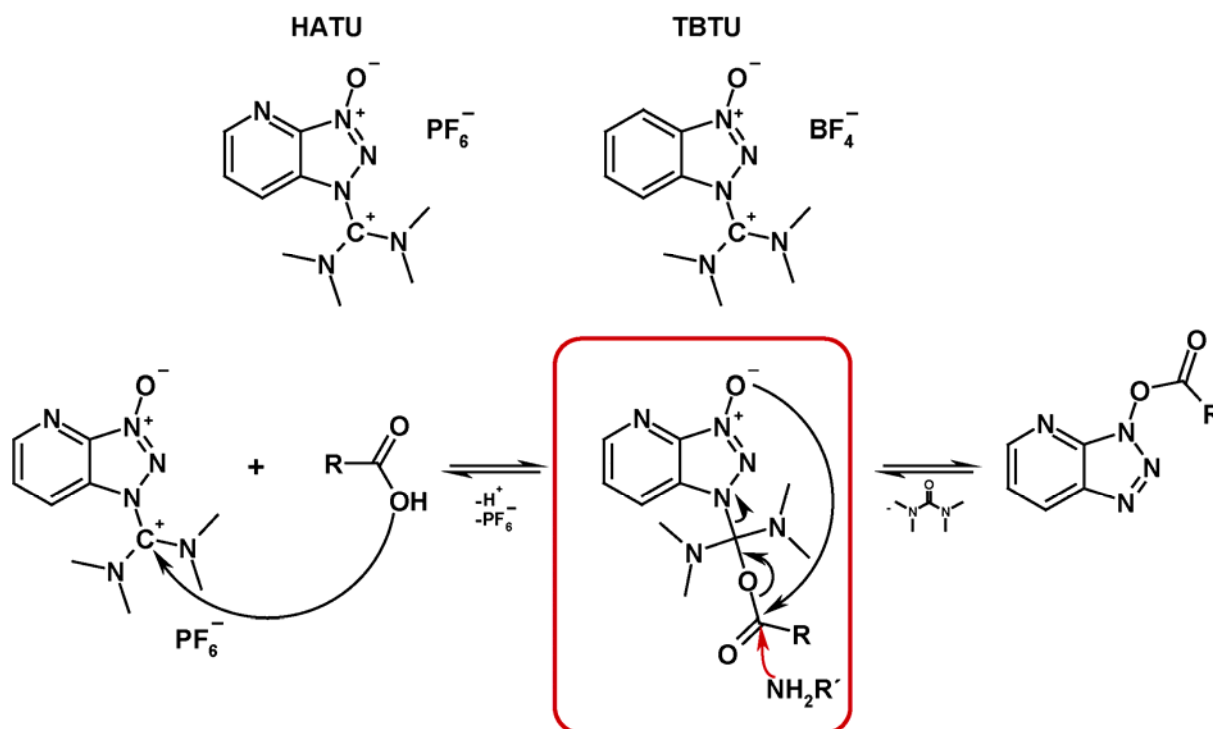
Die Synthese eines Peptids stellt sich als die wiederholte Durchführung verschiedener Entschützungs-, Aktivierungs- und Kupplungsreaktionen dar. Da die Kupplungsschritte trotz Optimierung nie quantitativ verlaufen, werden nach jeder Bindungsknüpfung noch frei vorliegenden Aminogruppen in einem *capping*-Schritt durch Acetylierung für weitere Reaktionen blockiert, so dass etwaige Fehlelongationen in der Primärsequenz verhindert werden. Der Ablauf einer Synthese im Detail ist in Abbildung 2-1 dargestellt.



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese.**

Als Amino-Schutzgruppe hat sich die 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) durchgesetzt, da sich die Rohausbeute der einzelnen Kupplungsschritte anhand des unter milden basischen Bedingungen (Piperidin/DMF 1:4) abspaltbaren Methylenefluorens photometrisch verfolgen lässt.<sup>103</sup> Als Seitenkettenschutzgruppen werden z.B. Trt-, *t*Bu und Boc-Gruppen eingesetzt, die sich alle mit wasserhaltiger TFA unter Zugabe von Triisopropylsilan als *scavenger* entfernen lassen. Dabei dient das TIPS als Hydridionendonator und reagiert mit den während der Abspaltung gebildeten Carbokationen, so dass diese ihrerseits nicht mit dem Peptid reagieren können.<sup>104</sup>

Zur Bildung der reaktiveren Aktivester haben sich die Aktivatoren TBTU und HATU etabliert.<sup>105;106</sup> Sie bieten eine Reihe wichtiger Vorteile, wie hohe Ausbeuten, kurze Kupplungszeiten, gute Kupplungseffektivität bei sterisch gehinderten Aminosäuren und geringe Racemisierung.<sup>107;108</sup> Die folgende Abbildung 2-2 zeigt die Strukturformel beider Aktivatoren und dem vorgeschlagenen Mechanismus der Aktivierung am Beispiel von HATU.



**Abbildung 2-2:** Die Aktivatoren HATU und TBTU und der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktionen durch HATU. Der rote Kasten zeigt die aktivierte Spezies, bei der es zur Bindung der aktivierten Säurefunktion mit der Aminofunktion kommt.

## 2.2 Charakterisierung von Peptiden

### 2.2.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie nach klassischen Methoden, wie zum Beispiel der Elektronen-Stoß-Ionisation (EI) oder der Chemischen Ionisation (CI) ist für Verbindungen mit hohen Molmassen nicht gut geeignet, da diese schlecht in die Gasphase übergehen und zusätzlich zur Fragmentierungen neigen. Als Alternativmöglichkeit stehen die *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight* (MALDI-TOF) und die *Electron Spray Ionisation* (ESI) Massenspektrometrie zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um besonders sanfte Ionisierungsmethoden, so dass vor allem unfragmentierte Moleküle nachgewiesen werden können.<sup>109</sup>

Bei der ESI MS handelt es sich um einen homogenes Ionisationsverfahren, wobei die Probe aus einer Lösung in einem elektrischen Feld versprüht wird.<sup>110</sup> Neben den einfach geladenen treten bei dieser Methode auch mehrfach geladene Molekülonen auf. Zur Bestimmung des Masse-Ladungsverhältnisses kann zum Beispiel ein Quadrupol genutzt werden. Die Methode liefert über die Intensität der Signale auch quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der Probenlösung. Außerdem besteht die Möglichkeit der Kopplung an eine HPLC, so dass Substanzgemische erst chromatographisch getrennt und dann vermessen werden können.

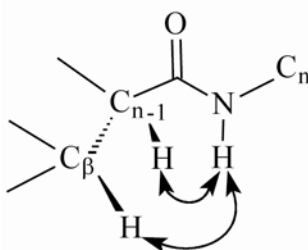
Bei der MALDI-TOF MS wird die zu untersuchende Substanz mit einer so genannten Matrix als Cokristallat auf einen Probenträger aufgebracht. Als Matrix werden zum Beispiel DHB oder CCA eingesetzt. Ein Laser lässt durch lokale Erhitzung die Matrixmoleküle schlagartig verdampfen, wobei die Probenmoleküle mitgerissen werden. Die Ionisation der Probenmoleküle erfolgt durch Ladungstransfer.<sup>111</sup> Diese Methode hat den entscheidenden Vorteil, dass sie sogar Substanzmengen im attomol-Bereich ( $10^{-18}$  mol) in kürzester Zeit nachweisbar macht.<sup>112</sup> Da bei diesem Verfahren von keiner homogenen Kristallisation auszugehen ist und nicht alle Moleküle gleich gut ionisiert werden, kann keine Aussage über die Quantität des Analyten gemacht werden.

### 2.2.2 NMR-Spektroskopie

Zur Charakterisierung größerer Moleküle, z.B. von Peptiden, reichen 1D-NMR-Spektren nicht mehr aus, da es zu starker Signalüberlagerung kommt. In diesem Fall kann auf zweidimensionale NMR-spektroskopische Methoden zurückgegriffen werden, die im Folgenden erläutert werden sollen.<sup>113</sup>

Das *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY)-Experiment lässt die Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäurespinsysteme eines Peptids zu.<sup>114</sup> Da die NH-Spuren am besten dispergiert und von den übrigen Signalen separiert vorliegen, wird dabei in Wasser gemessen. Über die NH-Spuren kann man so fast alle Protonen der einzelnen Aminosäuren den Signalen zuordnen. Im Idealfall ist auf einer Spur das gesamte Spinsystem der jeweiligen Aminosäure zu detektieren. Die totale Korrelation der gekoppelten Spins wird durch Anlegen eines Spinlockfeldes erreicht. Spinlockzeit, Kopplungskonstanten des Spinsystems und die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen beeinflussen die Effektivität des Prozesses.

Das *Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy* (NOESY)-Experiment dient der sequentiellen Zuordnung des Peptids. Es liefert Kreuzsignale von einer Aminosäure zur benachbarten (z.B.:  $\text{NH}_{\text{Aminosäure } n}$  zu  $\text{H}\alpha_{\text{Aminosäure } n-1}$  und  $\text{H}\beta_{\text{Aminosäure } n-1}$ , siehe Abbildung 2-3).



**Abbildung 2-3: Darstellung sequentieller NOE-Kontakte zweier benachbarter Aminosäuren am Peptidrückgrat.**



Bei der durch den Raum stattfindenden dipolaren Spin-Kopplung findet ein Magnetisierungstransfer zwischen zwei räumlich nahen Kernen (2-5 Å) statt, was einen Einfluss auf ihr Relaxationsverhalten hat. Hierbei ist es unerheblich, ob die Spins zusätzlich über skalare Kopplung in Verbindung stehen.<sup>115</sup> Diese Kreuzrelaxation führt zum Phänomen des Nuclear-Overhauser-Effekts (NOE).<sup>116</sup> Der räumliche Abstand der beiden Kopplungspartner hat somit direkten Einfluss auf die Intensität im NOESY-Spektrum.

Das *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC)-Experiment liefert eine zweidimensionale Darstellung chemischer Verschiebungen zwischen direkt miteinander verbundenen <sup>1</sup>H- und X-Kernen. Hierbei wird hauptsächlich als X-Kern <sup>13</sup>C bzw. <sup>15</sup>N genutzt, wobei Letzteres nur durch Isotopenmarkierung zugänglich ist.

Das *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Experiment liefert hierzu komplementäre Erkenntnisse, da hierbei die Kopplung zwischen <sup>1</sup>H- und X-Kernen über zwei oder mehr Bindungen dargestellt wird.

## 2.3 NMR-Techniken zur Detektion von Bindungsereignissen

Die Detektion eines Bindungsereignisses mittels NMR-Spektroskopie kann anhand folgender empfindlicher Parameter bzw. der dazugehörigen Experimente durchgeführt werden: Veränderungen der chemischen Verschiebung, Änderung des Diffusionsverhaltens und der Relaxationszeit von Liganden, Transfer von Sättigung und Aufbau des NOE.<sup>117</sup>

### 2.3.1 Auf den trNOE beruhende Experimente

Findet eine Bindung eines Liganden an einem Rezeptor statt, so kommt es zu starken Veränderungen der NOEs, so dass so genannte Transfer-NOE-Effekte (trNOEs) beobachtet werden können. Auf dieser Tatsache beruhend sind eine Reihe von Experimenten entwickelt worden, die zur Charakterisierung und Detektion des Bindungsereignisses genutzt werden können. Einige dieser Techniken werden in diesem Abschnitt kurz vorgestellt werden, wobei das in dieser Arbeit intensiv genutzte STD NMR-Experiment zunächst genauer betrachtet werden soll.

#### Das STD NMR-Experiment

Das *Saturation Transfer Difference* (STD) NMR-Experiment liefert vielseitige Informationen über das Bindungsereignis zwischen niedermolekularen Liganden und makromolekularen Rezeptoren. Die Methode liefert die Möglichkeit, Substanzbibliotheken nach bindenden Substanzen zu durchsuchen, deren Dissoziationskonstanten zu bestimmen und sogar das Bindungszeptop des Liganden zu beschreiben.<sup>117-122</sup>

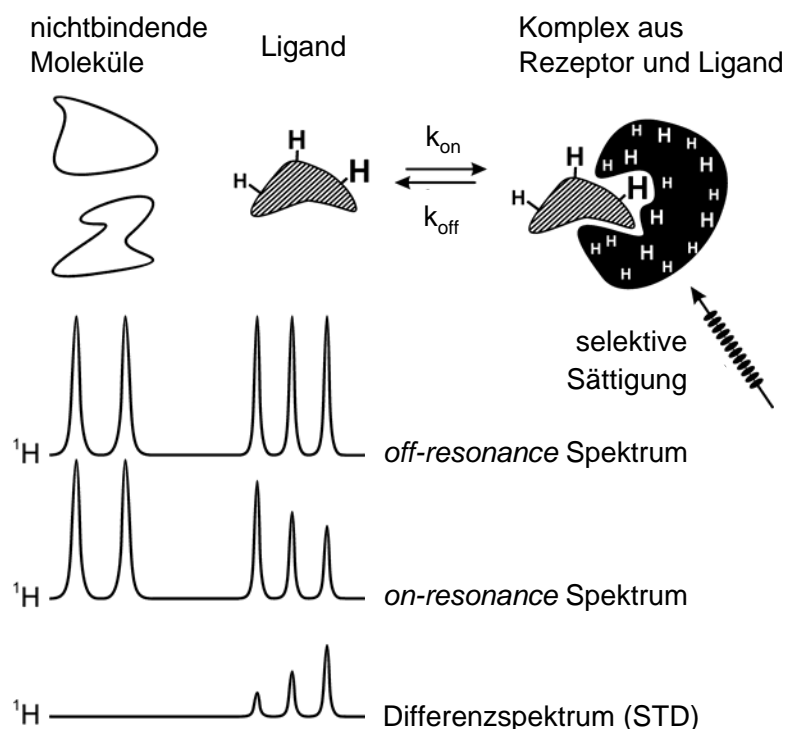
Das Experiment besteht aus zwei abwechselnd aufgenommenen Teilspektren, deren Differenz das STD NMR-Spektrum ergibt:

Im so genannten *on-resonance*-Spektrum werden die Resonanzen des Proteins selektiv gesättigt. Diese selektive Sättigung ist möglich, da es bei Proteinen, die größer als 10 kDa sind und damit die so genannte Spindiffusionsgrenze überschritten haben, zur starken Linienverbreiterung und außerdem durch Anisotropieeffekte in geordneten Bereichen zu extremen chemischen Verschiebungen kommt. Das führt dazu, dass man z.B. mit einem selektiven Gauss-Puls bei -1 ppm außerhalb des üblichen spektralen Fensters von 0-12 ppm noch Resonanzen des Proteins ohne Probleme selektiv sättigen kann, während die scharfen Resonanzen niedermolekularer Verbindungen unbeeinflusst bleiben. Da ab einer Proteingröße von ca. 10 kDa die Spindiffusion, d.h. der Magnetisierungstransfer über das gesamte Molekül, innerhalb weniger 100 ms von statten geht, kann man durch die so durchgeführte selektive Sättigung einzelner Resonanzen sämtliche Signale eines Proteins im NMR Spektrum so beeinflussen, dass die Signalintensitäten sich stark bis vollkommen verringern.

Im *off-resonance*-Spektrum werden die gleichen Sättigungspulse z.B. bei 40 ppm eingestrahlt. In diesem Spektrum werden jedoch keinerlei Proteinresonanzen gesättigt, so dass sich das

Spektrum nicht von einem „normalen“ Spektrum ohne Sättigungspulse unterscheidet. Die Einstrahlung ist aber wichtig, um den gleichen Energieeintrag in beiden Experimenten einzubringen. Ansonsten könnte es zu Temperaturschwankungen zwischen den beiden Spektren kommen, die sich bei der anschließenden Subtraktion durch Artefakte negativ auswirken würden.

Moleküle, die keine Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen, liefern in beiden Spektren die gleichen Signale, so dass die Differenzbildung keinerlei Signale liefert. Im Falle einer Wechselwirkung jedoch erhält man im Differenzspektrum Signale der an das Protein bindenden Spezies. Hierbei sind die Signalintensitäten der einzelnen Protonen stärker, je enger sie im Kontakt zum Protein standen, da sie im *on-resonance*-Spektrum einem stärkeren, intermolekularen Sättigungstransfer ausgesetzt sind. Der intermolekulare Sättigungstransfer ist in der sechsten Potenz umgekehrt proportional zum Abstand der an der Kreuzrelaxation beteiligten Protonen. Die Intensitätsunterschiede der einzelnen Ligandenresonanzen im STD-Spektrum liefern die nötigen Informationen, um daraus das Bindungssepitop des Liganden zu beschreiben. Die folgende Abbildung 2-4 fasst das Prinzip noch einmal zusammen.



**Abbildung 2-4: Darstellung des Prinzips der STD NMR-Spektroskopie: nicht bindende Moleküle liefern keine, bindende Moleküle liefern Signale.**

Proteinsignale liefern im STD-Spektrum ebenfalls Signale, die mit Ligandsignalen überlagern können. Zur Unterdrückung dieser Signale wird ein so genannter  $T_{1\rho}$ -Filter, häufiger Spinlock-Filter genannt, eingesetzt. Dabei wird die Magnetisierung nach dem ersten  $90^\circ$ -Puls

eine Zeit lang in der xy-Ebene gehalten. Durch die erheblich kürzeren  $T_2$ -Relaxationszeiten der Makromoleküle klingt ihre Magnetisierung im Vergleich zu den Liganden sehr schnell ab. Deshalb spielen sie im weiteren Pulsgeschehen keine Rolle mehr. Die Dauer des Spinlock-Filters muss experimentell bestimmt werden und liegt im Bereich von 100 ms.

Folgende Parameter haben direkten Einfluss auf die Signalintensitäten: Zusammensetzung der Probe und Wahl der Aufnahmebedingungen, kinetische und thermodynamische Eigenschaften der beobachteten Interaktion und  $T_1$ -Relaxationszeiten der beteiligten Protonen.<sup>117;123</sup> Da gerade Protonen mit langen  $T_1$ -Relaxationszeiten bei langen Sättigungszeiten mehr Sättigung als andere beteiligte Protonen akkumulieren können und damit eventuell das Bindungsepitop verfälscht werden kann, ist bei Systemen, die lange Sättigungszeiten zur Beobachtung eines STD-Effekts erfordern, eine Abschätzung oder Bestimmungen der  $T_1$ -Relaxationszeiten wichtig.

Um das Bindungsepitop zu beschreiben, wird der Quotient aus dem Integral eines Protonensignals im STD NMR-Spektrum ( $I_0 - I_{\text{sat}}$ ) und im *off-resonance*-Spektrum ( $I_0$ ) gebildet (s. Gleichung 1). Dies wird für alle detektierten Protonensignale durchgeführt. Der Einfachheit halber kann das Signal mit dem stärksten STD-Effekt auf 100% normiert werden.

$$\text{STD [\%]} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \times 100$$

**Gleichung 1**

Um Dissoziationskonstanten zu bestimmen, müssen mehrere STD NMR-Spektren mit unterschiedlichen Ligandenüberschüssen aufgenommen werden. Dafür trägt man den STD-Amplifikationsfaktor (s. Gleichung 2) gegen die Ligandenkonzentration  $[L]$  auf. Handelt es sich um ein System, welches sich durch das *one site binding*-Modell beschreiben lässt (s. Gleichung 3), kann daraus die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt werden.

$$\text{STD}_{\text{Ampl.}} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \times \text{Überschuss}$$

**Gleichung 2**

$$\text{STD - Ampl.fakt.} = \frac{\text{STD - Ampl.fakt.}_{\text{max.}} \times [L]}{K_D + [L]}$$

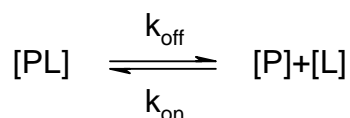
**Gleichung 3**

Der STD-Amplifikationsfaktor steigt bei Erhöhung der Ligandkonzentration auch bei fast vollständiger Rezeptorbelegung noch weiter an. Dies liegt bei schneller Dissoziation begründet im hohen Durchsatz an Liganden und der langen Lebensdauer der Sättigung im Liganden nach Verlassen der Bindungstasche. Dadurch kann es vorkommen, dass man höhere Konzentrationen der gebundenen Spezies erhält als Bindungsstellen vorhanden sind. Dies führt bei Auftragung der Messwerte nach Gleichung 3 im Vergleich zu anderen Assays zum

späteren Erreichen des Plateaus. Das wiederum führt zu Dissoziationskonstanten, die höher liegen als die tatsächlichen.

### *Kinetik*

Die folgende Reaktionsgleichung zeigt die Dissoziations- und Assoziationsreaktion, die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  und damit ihren Einfluss auf die Konzentrationen an Protein [P], Ligand [L] und Komplex aus beiden [PL]. Daraus ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz die Gleichung 4, welche die Dissoziationskonstante  $K_D$  als Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten liefert.



$$K_D = \frac{[\text{P}] \times [\text{L}]}{[\text{PL}]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

**Gleichung 4**

Im Folgenden sollen drei Szenarien beschrieben werden, um den Einfluss unterschiedlicher Kinetik auf Bindungsereignisse und deren Charakterisierung per STD NMR zu verdeutlichen. Häufig wird bei hohen Ligandenüberschüssen gemessen, um die maximale Empfindlichkeit des STD-Experiments zu erlangen. Bei einigen Systemen wird erst dadurch ein Effekt sichtbar, v.a. wenn die Menge an zur Verfügung stehendem Protein limitierender Faktor ist. Bei steigendem Überschuss sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass ein schon gesättigtes Ligandmolekül während der Sättigungsphase zwei- oder mehrmals in die Bindungstasche tritt. Dadurch ist gewährleistet, dass so viele Liganden wie möglich durch die Bindungstasche Sättigung aufnehmen können und ein dadurch großer STD-Effekt beobachtbar wird.

Im Falle von sehr langsamen Dissoziationen kann jedoch ein geringerer Überschuss von Vorteil sein, da dadurch die STD-Effekte, relativ gesehen, größer werden. Jedoch kann das zu Empfindlichkeitsproblemen führen, da sich dabei das Signal/Rausch-Verhältnis verringert.

Bei Systemen mit sehr schneller Assoziation und Dissoziation reicht die Residenzzeit des Liganden in der Bindungstasche nicht aus, um die nötige Sättigung zu erhalten. Die STD-Effekte sind in diesem Fall, wenn überhaupt zu detektieren, sehr gering.

In den beiden letzten Fällen ist die Erhöhung der Proteinkonzentration manchmal die einzige Möglichkeit, um überhaupt einen STD-Effekt zu sehen. Durch die Konzentrationserhöhung des Proteins wird bei gegebenem Ligandüberschuss direkter Einfluss auf die Konzentration an durch die Bindungstasche gegangenem und damit gesättigtem Liganden genommen. Dies hat wiederum direkten Einfluss auf den messbaren STD-Effekt.

Das HDO-Signal wird meistens durch eine *Water Suppression by Gradient Tailored Excitation* (WATERGATE)-Pulssequenz unterdrückt. Dabei wird durch eine Folge von Gradientenpulsen ein Anregungsprofil erzeugt, welches die Region des Wassersignals ausspart.

Das STD NMR-Verfahren lässt Untersuchungen von Bindungen in einem  $K_D$ -Wertebereich von  $\mu\text{M}$  bis  $\text{mM}$  zu. Ferner kann es mit einer Vielzahl von Pulsprogrammen kombiniert werden, wobei die jeweilige Empfindlichkeit und die daraus resultierende Messzeit zu berücksichtigen sind. Die Methode ist nicht nur auf Messungen mit gelöstem Protein beschränkt. Es gelang z.B. die Immobilisierung eines Proteins auf *controlled pore glass-beads* (CPGs) und die anschließende Untersuchung des Systems mittels HRMAS-STD NMR.<sup>122</sup> Ferner konnte Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , ein heterodimeres Transmembranprotein, in Liposomen eingebettet werden und die Wechselwirkungen zu dem Pentapeptid Cyclo(RGDfV) untersucht werden.<sup>121</sup> 2005 gelang sogar die Untersuchungen des gleichen Systems an intakten Thrombozyten.<sup>124</sup>

### Das WaterLOGSY-Experiment

NMR-Studien haben gezeigt, dass sich Wassermoleküle an der Grenzfläche von Protein-Ligand-Komplexen befinden.<sup>125</sup> Im *Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy* (WaterLOGSY)-Experiment wird die Sättigung von Wasser auf bindende Liganden übertragen. Da sich die Wassermoleküle in der Grenzfläche einige hundert  $\mu\text{s}$  aufhalten, erhält man negative Wasser-Ligand-NOEs. Ungebundene Moleküle, die von Wasser umgeben sind zeigen positive NOEs. Durch Differenzbildung zwischen einem *off-resonance*-Spektrum, bei dem das Wasser nicht gesättigt wird, und einem *on-resonance*-Spektrum, bei dem das der Fall ist, erhält man positive Signale für bindende Moleküle und negative für nichtbindende.<sup>126</sup>

### Das trNOE-Experiment

Kleine Moleküle haben aufgrund ihrer geringen Korrelationszeit positive NOEs. Die NOEs erreichen ihren Maximalwert üblicherweise nach einigen Sekunden. Proteine und andere große Moleküle haben lange Korrelationszeiten, zeigen negative NOEs und erreichen ihren stärksten Effekt in der Größenordnung von einigen 100 ms. Im Falle einer Komplexbildung mit einem makromolekularen Rezeptor übernimmt der Ligand aufgrund der geringeren Beweglichkeit die lange Korrelationszeit des Proteins. Dadurch liefert er nach der Dissoziation aus der Bindungstasche stark negative, intramolekulare trNOEs. Dies ist ein Zeichen für die Bindung an das Protein. Darüber hinaus ist die Konformation des gebundenen Liganden durch die Kreuzrelaxationsrate bestimmbar. Dazu werden NOESY-Spektren bei unterschiedlichen Mischzeiten aufgenommen und die Peakvolumina gegen die Mischzeit aufgetragen. Der NOE-Auf- und Abbau gehorcht im Idealfall einer doppelt exponentiellen Kinetik aus der man die Kreuzrelaxationsrate bestimmen kann. Die Kreuzrelaxationsrate steht über die Korrelationszeit des Moleküls im direkten Zusammenhang mit dem Abstand der beiden beteiligten Protonen. Da jedoch die Korrelationszeit der Moleküle meist unbekannt ist,

wird auf den bekannten Abstand zweier Protonen, z.B. den Abstand zweier geminaler Protonen, referenziert. Die Methode ist auf Abstände von maximal 5 Å beschränkt, da die Kreuzrelaxationsrate umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands der beteiligten Kerne ist.<sup>127;128</sup>

### Das NOE-Pumping- und das Reverse NOE-Pumping-Experiment

NOE-Pumping und das davon abgeleitete Reverse NOE-Pumping (RNP) nutzen aus, dass sich im Falle eines Bindungsereignisses die Relaxationsumgebung von Ligand und Protein verändern. Beim NOE-Pumping-Experiment wird der NOE vom Protein auf den Liganden übertragen. Hierbei wird zunächst die Magnetisierung des Liganden durch einen Diffusionsfilter zerstört. Bei der sich nun anschließenden, dem NOESY-Experiment ähnelnden Mischzeit, kann das Protein zusätzlich über den gebundenen Liganden relaxieren und es werden Ligandensignale in Abhängigkeit der Mischzeit sichtbar.<sup>129</sup> Beim RNP wird die Magnetisierung des Proteins durch einen  $T_2$ -Filter zerstört. Bei der sich anschließenden Mischzeit kann nun der Ligand über das Protein relaxieren. Die Ligandensignale zeigen im Vergleich zum Referenzexperiment, bei dem  $T_2$ -Filter und Mischzeit vertauscht sind, geringere Intensitäten. Die Differenzbildung beider Spektren liefert nur Signale der Moleküle, die einen engen Kontakt zum Protein eingegangen sind.<sup>130</sup>

### 2.3.2 Veränderungen der chemischen Verschiebungen im $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC

Chemischen Verschiebungen verändern sich im Fall eines Bindungsereignisses, da sich die Umgebung der beteiligten Kerne verändern. Fesik et. al. haben auf dieser Tatsache das so genannte „SAR by NMR“-Verfahren entwickelt, bei dem  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektren in An- und Abwesenheit des Bindungspartners miteinander verglichen werden. Hierbei muss das Protein  $^{15}\text{N}$ -markiert vorliegen, da die natürliche Häufigkeit des Isotops nicht ausreichend ist. Die Methode erlaubt außer dem *screening* nach bindenden Molekülen auch die Beschreibungen des Bindungs epitops, was allerdings eine Zuordnung der Proteinsignale im  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC voraussetzt, wodurch die Größe der verwendbaren Proteine auf ca. 30 kDa beschränkt wird.<sup>131;132</sup>

Diese Grenze lässt sich jedoch verschieben, wenn die Proteine selektiv an verschiedenen Aminosäuren  $^{13}\text{C}$ -gelabelt, perdeuteriert vorliegen oder das TROSY-Verfahren genutzt wird, da dadurch die Komplexität der Spektren verringert wird.<sup>133;134</sup>

### 2.3.3 Das DOSY-Experiment

Die Diffusionsgeschwindigkeit ist abhängig vom Radius des beobachteten Teilchens. Beim so genannten *Diffusion-Ordered Spectroscopy* (DOSY)-Experiment werden mit Hilfe von gepulsten Feldgradienten die verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeiten von Nichtbindern, Liganden und Proteinen zur Bindungsdetektion eingesetzt.<sup>135</sup> Diese Methode kann auch mit zweidimensionalen Experimenten wie dem HMQC-Experiment kombiniert werden.<sup>136</sup>

### 2.3.4 Veränderungen der Relaxationszeiten

Die Bindung eines Liganden an ein Protein bietet den Liganden die Möglichkeit, zusätzlich über das Protein zu relaxieren. Dadurch verkürzen sich seine  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten, was wiederum zu Linienverbreiterungen führt, die im Referenzspektrum ohne Protein nicht zu detektieren sind. Über das *inversion recovery*- bzw. das Carr-Purcell-Meibomm-Gill-Spin-Echo (CPMG)-Experiment können die Relaxationszeiten bestimmt werden.<sup>137;138</sup>

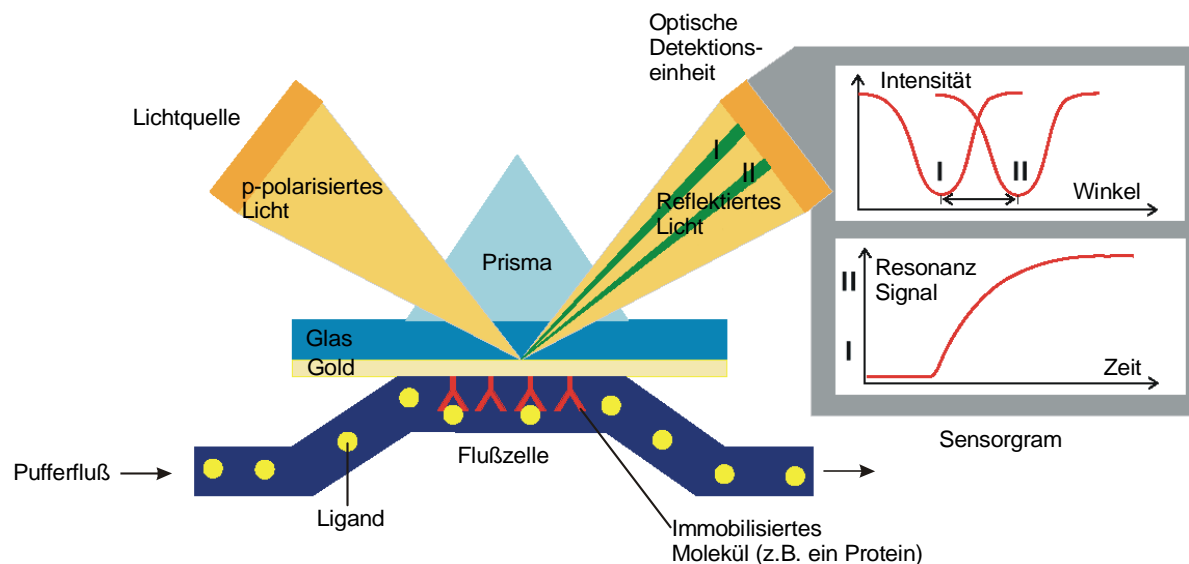
## 2.4 Oberflächenplasmonenresonanz - SPR

1990 wurde das erste kommerzielle Gerät auf den Markt gebracht, das die Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance* - SPR) als optische Methode zur Verfolgung von Bindungsereignissen ermöglicht.<sup>139</sup> Die Interaktion von totalreflektiertem Licht mit Oberflächenplasmonen eines reflektierenden Metallfilms wurde 1959 von Turbadar beschrieben.<sup>140</sup> Sie wurde maßgeblich von Otto, Kretschmann und Raether weiterentwickelt.<sup>141;142</sup>

Die Methode beruht auf der Totalreflexion von linear polarisiertem Licht an einer reflektierenden Schicht. Jenseits dieser Schicht entsteht durch die Totalreflexion eine evaneszierende Welle. Durch Wechselwirkung mit einem Metallfilm kommt es zur Feldverstärkung und zur Resonanz mit den Oberflächenplasmonen des Metallfilms. Diese Wechselwirkung ist abhängig vom Reflexionswinkel, der vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängt. Die Resonanz führt zu einer Intensitätsverringerung des reflektierten Lichts.<sup>143</sup>

Die Messungen finden in einer Messzelle statt, deren eine Wand aus dem Messchip besteht (s. Abbildung 2-5). An diesem Chip ist einer der Bindungspartner immobilisiert, während der andere in Lösung vorbeigeleitet wird. Kommt es in der Messzelle zur Komplexbildung, reichert sich der gelöste Bindungspartner an, was zu einer Massenzunahme führt. Die Massenzunahme führt zur Änderung des Brechungsindex der Lösung an der Oberfläche und damit zur Wechselwirkung mit der evaneszierenden Welle. Dies führt zu einer Intensitätsabschwächung des Lichts bei einem bestimmten Winkel. Die Intensitätsabschwächung wird in Form von *resonance units* (RU) detektiert.





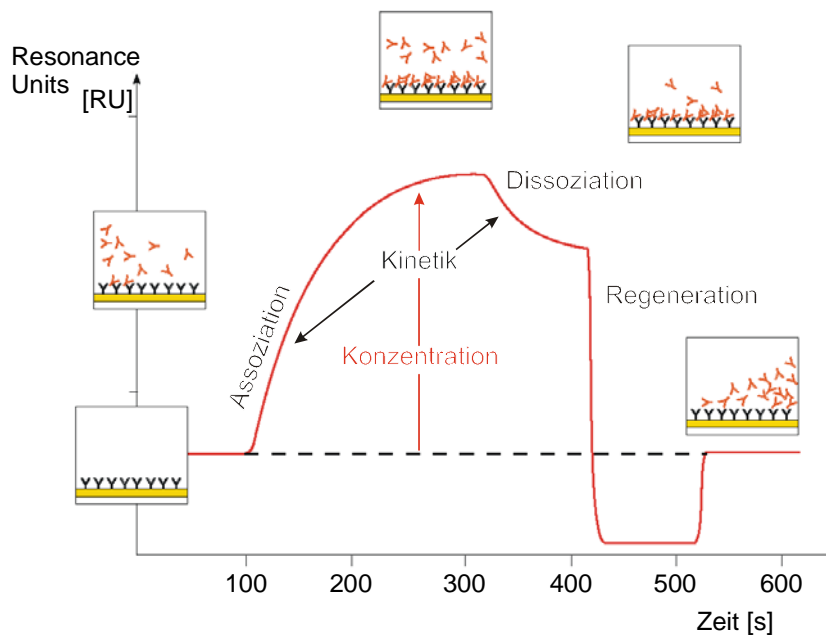
**Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des SPR-Experiments.**

Die Methode ist sehr empfindlich und liefert die Möglichkeit, Massenänderungen von wenigen Pikogramm (1 pg entspricht ca. 1 RU) zu detektieren. Das entspricht Winkeländerungen von ca.  $0.0001^\circ$ . Niedermolekulare Verbindungen mit Molmassen unter 1000 Da können an immobilisierten Proteinen selbst bei Dissoziationskonstanten im mM-Bereich untersucht werden. Es können aber auch Wechselwirkungen zu größeren Systemen wie Bakterien, Viren und Zellen untersucht werden.<sup>144-146</sup>

Je nach gewünschter Anwendung stehen unterschiedliche Verfahren zur Immobilisierung zur Verfügung.<sup>143</sup> Der am häufigsten genutzte CM5-Messchip besteht aus einer Glasschicht mit aufgedampfter Goldschicht. Auf der Goldschicht befindet sich eine über Linker fixierte carboxymethylierte Dextranschicht. Die Carboxylfunktionen der Dextranschicht werden durch Zugabe von NHS und EDC in Aktivester überführt, an die der zu immobilisierende Bindungspartner kovalent über eine Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung gebunden wird. Alle nicht belegten aber aktivierten Carboxylfunktionen werden mit Ethanolamin umgesetzt und damit inaktiviert.

Abbildung 2-6 zeigt ein idealisiertes SPR-Experiment. Die Darstellung zeigt die drei verschiedenen Phasen des Experiments: Assoziation, Dissoziation und Regeneration. In der ersten Phase beginnt die Komplexbildung durch die Zugabe des Bindungspartners in den Laufpuffer. Durch den beschriebenen Effekt der Massenzunahme kommt es zur Erhöhung des SPR-Resonanzsignals, die jedoch nach einer gewissen Zeit abflacht und einen Maximalwert erreicht, da fast alle Bindungsstellen auf der Oberfläche des Chips mit dem Liganden besetzt sind. Dieser Gleichgewichtszustand der Sättigung wird auch als *steady state* bezeichnet. Ist im Laufpuffer kein Ligand mehr vorhanden, weil die Injektion abgeschlossen ist, beginnt die Dissoziation des Komplexes, was wieder ein Absinken der Masse und damit des SPR-Resonanzsignals zur Folge hat. Bei zu langsamer Kinetik bzw. zu starker Bindung kann eine Dissoziation zu lange dauern, so dass die Chipoberfläche wieder durch eine

Regenerationsmethode für die nächste Messung von Liganden befreit werden muss. Dies kann man zum Beispiel durch Veränderungen des pH-Werts oder Zugabe von Detergentien erreichen. Die vollständige Befreiung der Oberfläche von gebundenen Liganden vor einer erneuten Messung ist von hoher Bedeutsamkeit, da man sonst mit jeder Messung die Oberfläche beladen würde. Dies würde einen hohen Intensitätsverlust für die folgende Messung mit sich ziehen.



**Abbildung 2-6: Schematische und idealisierte Darstellung eines SPR-Experiments.**<sup>147</sup>

Unter bestimmten Umständen können die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation  $k_{on}$  und der Dissoziation  $k_{off}$  durch Anpassen der Langmuir-Funktion an die Sensorgramme ermittelt werden.<sup>148</sup> Hierbei ist zu berücksichtigen, dass im Falle zu schneller Assoziation die Datenrate von 10 Hz nicht ausreichen kann und im Falle von äußerst langsamer Kinetik die Dissoziation nicht beschrieben werden kann. Ist dies nicht der Fall, lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_D$  auf diese Art als Quotient der beiden Geschwindigkeitskonstanten ermitteln (s. Gleichung 4).

Im Falle von spezifischen Wechselwirkungen, die sich durch das *one site binding*-Modell beschreiben lassen, erreicht das Sensorgramm mit der Zeit einen Sättigungswert. Führt man Messungen bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen  $[L]$  durch, kann man die Sättigungswerte  $[R]$  gegen die Konzentrationen auftragen. Die Daten lassen sich durch Gleichung 5 beschreiben. Die Funktion liefert bei  $R_{max}/2$  die Dissoziationskonstante der Interaktion  $K_D$ .

$$R = \frac{R_{max} \times [L]}{K_D + [L]}$$

**Gleichung 5**

### 3 Problemstellung

Die Aggregation des Tau-Proteins zu gepaart helikalen Filamenten ist der erste Schritt zur Bildung von intrazellulären pathogenen Neurofibrillenbündeln. Diese Neurofibrillenbündel scheinen der Hauptgrund für den in der Alzheimer Krankheit bekannten neuronalen Abbau zu sein, da sie sich sehr gut mit den Regionen des verstärkten Abbaus in Deckung bringen lassen. Die Therapiemöglichkeiten sind momentan auf die kurzfristige Verlangsamung des Fortschritts der Alzheimer Krankheit beschränkt. Mehr Verständnis über den Aggregationsmechanismus des Tau-Proteins auf molekularer Ebene und seine Inhibition gehören zu den ersten Schritten auf dem Weg zu potentiellen Alzheimer-Medikamenten.

Im Rahmen dieser Dissertation soll der Aggregationsmechanismus auf molekularer Ebene untersucht werden. In vorhergehenden Studien wurden zwei Minimalmotive aus den *repeat*-Regionen der Proteinsequenz identifiziert, die zu einer Aggregation fähig sind. Die Interaktion eines dieser Minimalmotive (G272-K281) mit der Bezeichnung **t3a** mit dem Proteinkonstrukt **K18** bestehend aus den vier *repeat*-Regionen des Tau-Proteins ist Mittelpunkt der durchgeführten Studien. Die aus den Vorarbeiten bewiesene langsame Bindungskinetik soll durch Zugabe von Heparin, das auch in der natürlichen Umgebung vorhanden ist, beschleunigt werden. Der Einfluss des Heparins auf die Struktur des Peptids soll mittels trNOE NMR-Studien im trimolekularen Komplex mit Heparin und Proteinkonstrukt bestimmt werden.

Durch die Beschleunigung der Kinetik soll eine Untersuchung des Systems mittels STD NMR ermöglicht werden, was zur Beschreibung eines Bindungsepitops auf Seiten des Minimalmotivpeptids **t3a** <sup>272</sup>GGKVQIINKK<sup>281</sup> führen soll. Neben der Synthese des Peptids **t3a** schafft die Synthese des vollständig <sup>15</sup>N-markierten Analogons eine weitere Möglichkeit, um die an der Aggregation am stärksten beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Hierzu sollen die Veränderungen der chemischen Verschiebungen im <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Experiment bewertet werden. Dies soll zur Erweiterung des via STD NMR beschriebenen Bindungsepitops führen. Für die Synthese des kommerziell nicht erhältlichen Fmoc-Lys<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(Boc)-OH-Bausteins bedarf es der Aufstellung einer Synthesestrategie und der Durchführung.

Um thermodynamische und kinetische Daten des Komplexes aus Minimalmotiv und dem Proteinkonstrukt zu bestimmen, soll die Interaktion zusätzlich durch SPR-Experimente untersucht werden.

Aus einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Mandelkow und Prof. Dr. Eva-Maria Mandelkow (Max-Planck-Institut für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg) stehen drei niedermolekulare, organische Verbindungen zur Verfügung, die bei *in vitro*-Experimenten nicht nur die Bildung von Neurofibrillenbündel zu verhindern vermögen, sondern diese sogar auflösen können und darüber hinaus eine sehr geringe

Zelltoxizität aufweisen. Diese drei Verbindungen sollen unter Anwendung von SPR- und STD NMR-Experimenten auf ihre Bindungsfähigkeit an **K18** untersucht werden. Die Bindungsereignisse sollen durch Bestimmung der Dissoziationskonstante und kinetischer Parameter charakterisiert werden. Nach Möglichkeit soll jeweils ein Bindungsepitop der Inhibitoren beschrieben werden, um dadurch verbesserte Liganden entwickeln zu können.

Zuletzt soll unter Zuhilfenahme des markierten Peptids beschrieben werden, ob die Inhibitoren aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Mandelkow und Prof. Dr. Eva-Maria Mandelkow die Aggregation tatsächlich an der vermuteten Region (G272-K281) verhindern. Im positiven Fall sollen durch Evaluation der Veränderung der chemischen Verschiebungen im  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Experiment die beteiligten Aminosäuren identifiziert werden.

## 4 Vorarbeiten

Bei der Durchführung von STD NMR-Vorversuchen wurde gezeigt, dass bei Verschiebung der Einstrahlpunkte von 0 bis -1 ppm bei einer Sättigungszeit von 1 s eine abnehmende Sättigung des Proteinkonstrukts **K18** zu erkennen ist. Die Sättigungseffizienz beträgt zwischen 32 % bei einer Einstrahlung bei 0 ppm und 14 % bei -1 ppm. Da eine ausreichende Sättigungseffizienz gewährleistet war, wurde die Wahl der Sättigungsparameter hauptsächlich von der Artefaktgröße der Liganden abhängig gemacht.<sup>149</sup>

Die Artefaktgröße eines Liganden ist abhängig vom Einstrahlpunkt. Die Vorarbeiten haben gezeigt, dass eine Einstrahlung bei -1 ppm beim Minimalmotiv **t3a** zu Artefakten von unter 0.2 % führte und damit als Einstrahlpunkt geeignet erscheint.<sup>149</sup>

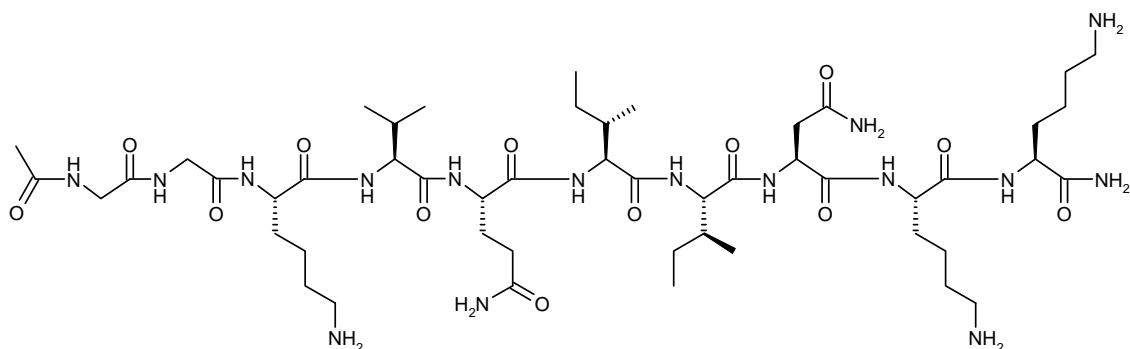
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Übersicht der verwendeten Peptide, Proteinkonstrukte und Inhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen dreier Inhibitoren und zweier Peptide mit einem Tau-Proteinkonstrukt untersucht. Die Inhibitoren und das Proteinkonstrukt wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Mandelkow (Max-Planck-Institut für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg) hergestellt und standen für die durchgeführten Experimente zur Verfügung. Die abgebildeten Peptide wurden synthetisiert, wobei vorangehend Lysin-<sup>15</sup>N<sub>2</sub> mit den für die Peptidsynthese benötigten Schutzgruppen versehen wurde. Es soll auf den folgenden Seiten kurz die Nomenklatur aller Verbindungen erläutert werden.

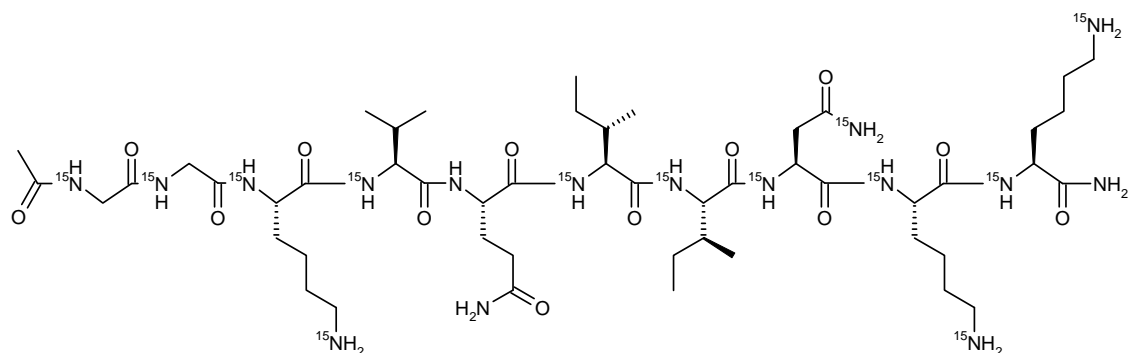
Peptide:

- **t3a:**  $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$  ( $M_W = 1125.39 \text{ g/mol}$ ).



- **t3a15N:**  $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$  ( $M_W = 1138.30 \text{ g/mol}$ );

Alle Stickstoffatome außer den Glutaminstickstoffatomen und das C-terminale Amid sind  $^{15}\text{N}$ -markiert.



Verwendetes Tau-Proteinkonstrukt:

- **K18:** ( $^{244}\text{QTAPV...PGGGN}^{368}$ ):

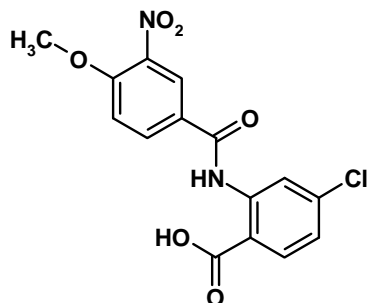
Proteinkonstrukt aus allen vier *repeat*-Regionen des Tau-Proteins ( $M_W = 13.2 \text{ kDa}$ ).

	1	2	3	4	
244					368
244	QTAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK				274
275	VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS				305
306	VQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHPGGGQ				336
337	VEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN				368

*Inhibitoren:*

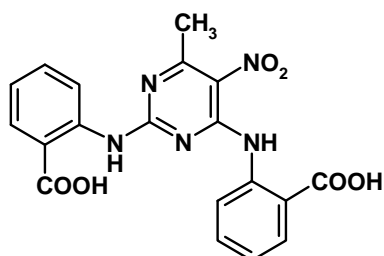
**B4D3:**

4-Chloro-2-(4-methoxy-3-nitrobenzamido)benzoesäure ( $M_W = 350.72 \text{ g/mol}$ ).



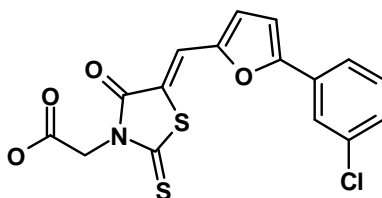
**B4A1:**

2,2'-(6-Methyl-5-nitropyrimidine-2,4-diyl)bis(azanediyl)dibenzoesäure ( $M_W = 409.36 \text{ g/mol}$ ).



**bb-5:**

(Z)-2-(5-((5-(3-Chlorophenyl)furan-2-yl)methylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)ethansäure ( $M_W = 379.84 \text{ g/mol}$ ).



## 5.2 Bindungsstudien von Peptid **t3a** an das Tau-Proteinkonstrukt **K18**

### 5.2.1 Synthese und Charakterisierung des Peptids **t3a**

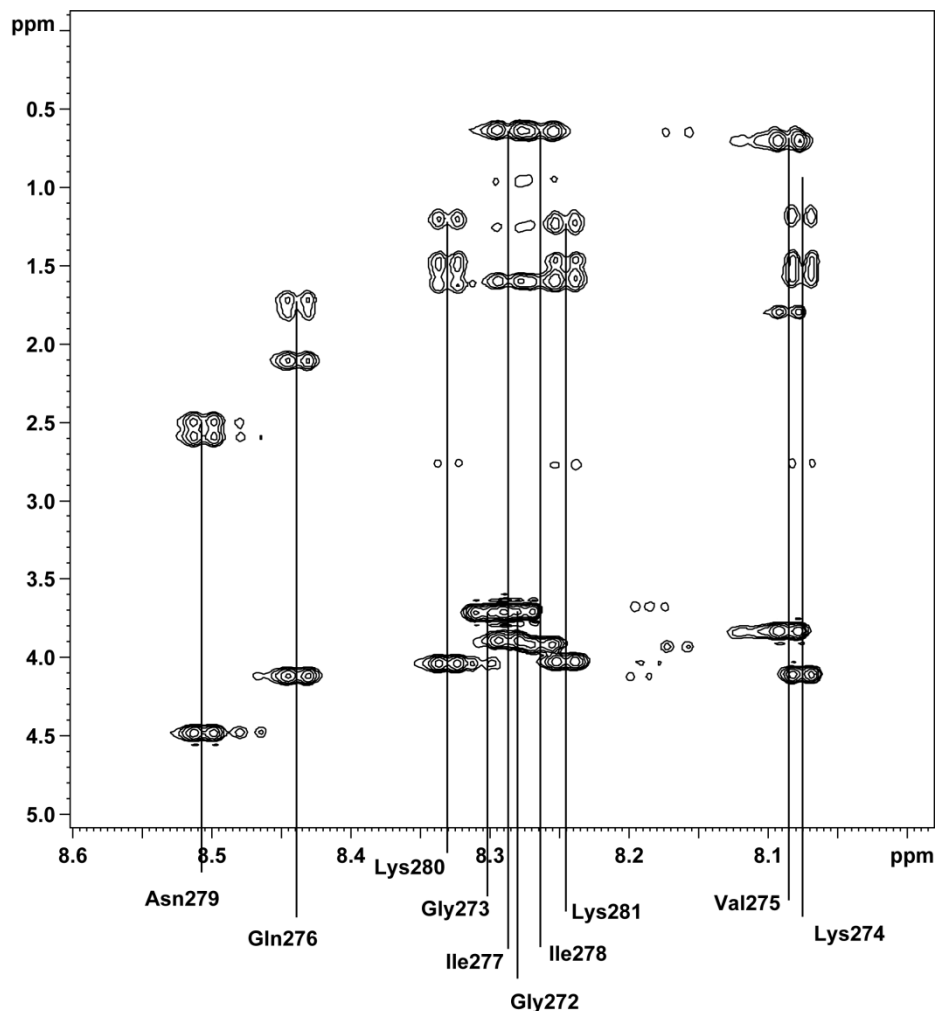
Die Synthese des Peptids **t3a** wurde manuell an der festen Phase durchgeführt. Als feste Phase diente ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz (Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz), das einen 5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valeriansäure (PAL)-Linker trägt, der an der Aminofunktion Fmoc-geschützt vorlag. Bei den eingesetzten Aminosäuren handelte es sich um seitenkettengeschützte Fmoc-Aminosäuren.

Jeder Kupplungsschritt wurde mindestens sechs Stunden bei 10 %igem Überschuss der jeweiligen Aminosäuren in Bezug auf freie Aminofunktionen durchgeführt. Durch die Wahl der gleichen Bedingungen, bei denen später auch das <sup>15</sup>N-markierte Peptid synthetisiert wurde (s. Kapitel 5.2.5), sollten auch potentielle Probleme bei der Synthese des isotope markierten Peptids minimiert werden. Als Aktivator wurde der Aminosäure TBTU und DIPEA als Base in jeweils fünffachem Überschuss zugesetzt.

Nicht umgesetzte Aminogruppen wurden nach jedem Kupplungsschritt mittels 10 %igem Acetanhydrid in DMF acetyliert, um das Entstehen von Deletionsstellen des Peptids zu verhindern. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe lieferte nach jedem Kupplungsschritt durch das photometrisch bestimmbare Methylenfluoren Aussagen über die Kupplungsausbeute. Die terminale Aminogruppe wurde am Ende der Synthese mittels 10 %igem Acetanhydrid in DMF acetyliert, um die Löslichkeit des Peptids zu erhöhen. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte durch zweimaliges Schütteln in einem Gemisch aus TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (90:5:5). Die Reinigung des abgespaltenen Rohproduktgemisches erfolgte per RP-HPLC, die unter Verwendung von Standardbedingungen problemlos durchzuführen war.



Anschließend wurde das Peptid mittels MALDI-TOF MS auf das richtige Molekulargewicht und mittels TOCSY- und NOESY-Experimenten auf sequenziellen Zusammenhang überprüft. Abbildung 5-1 zeigt den NH-Bereich des TOCSY-Spektrums mit Zuordnung der einzelnen Spuren.



**Abbildung 5-1:** Ausschnitt eines  $^1\text{H},^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrums des Peptids **t3a** ( $c = 1.1 \text{ mM}$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} 9:1$ ,  $\text{pH } 4$ ,  $T = 280 \text{ K}$ ).

### 5.2.2 Einfluss des Heparins auf die Geschwindigkeit der Komplexbildung

Das Tau-Protein befindet sich in seiner natürlichen Umgebung in der Nähe von stark polyanionischen Bindungspartnern, wie dem Tubulin. Vorversuche haben gezeigt, dass Heparin die Kinetik des Bindungsereignisses stark beschleunigt. Das Peptid **t3a** wurde als Feststoff, das Proteinkonstrukt aus einer 3 mM-Stammlösung in deuteriertem PBS-Puffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Proteinstammlösung enthielt zudem perdeuteriertes DTT im achtfachen Überschuss, um die Dimerisierung des Proteins zu verhindern. Bei der Herstellung einer Probe, die zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Peptids im trimolekularen Komplex mit Heparin und dem Proteinkonstrukt **K18**

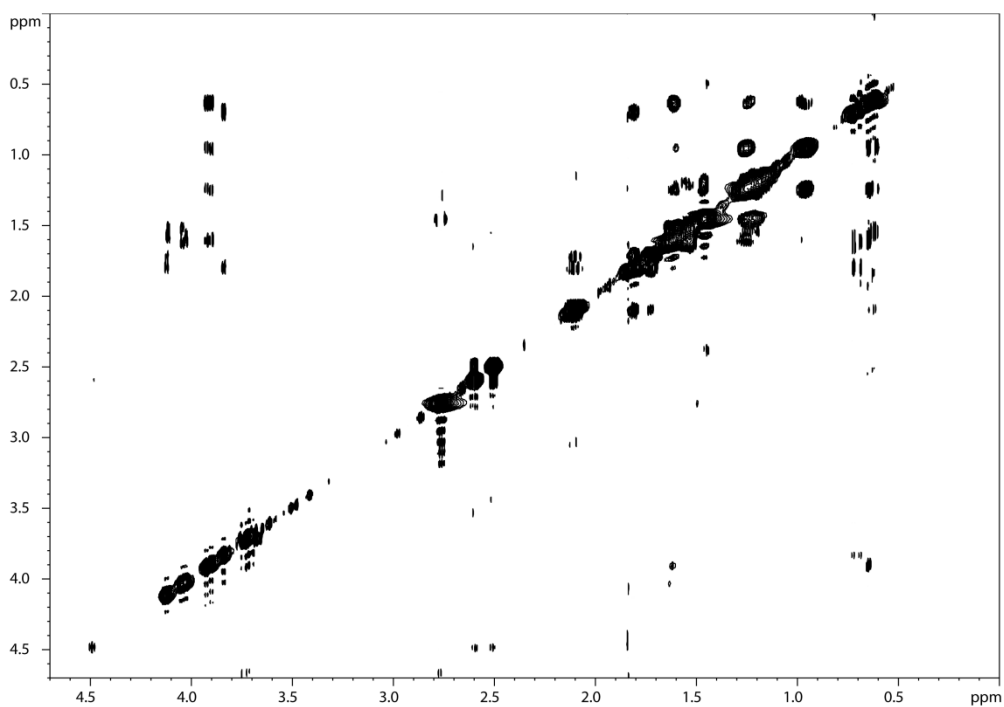
angesetzt wurde, kam es zur sofortigen Aggregation ( $c_{t3a} = 500 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{Heparin}} = 200 \mu\text{M}$ ). Die Zugabe des Heparins zu der im PBS-Puffer bei pH 7.2 gelösten Peptidprobe führte noch vor Zugabe des Proteinkonstrukts zur Bildung eines milchig trüben Niederschlags im Probenröhrchen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Peptid durch die anionische Umgebung eine andere Konformation annimmt und dadurch die Aggregation beschleunigt wird. Hierbei spielte die Reihenfolge der Probenpräparation eine entscheidende Rolle, denn die Zugabe von Heparin zu einer Probe aus Protein und Peptid führte nicht zu dem beschriebenen Niederschlag. Offensichtlich beschleunigte das Heparin die Aggregation des Peptids so stark, dass die ansonsten langsamer verlaufende Aggregation viel schneller stattfand.

### 5.2.3 trNOE Messungen

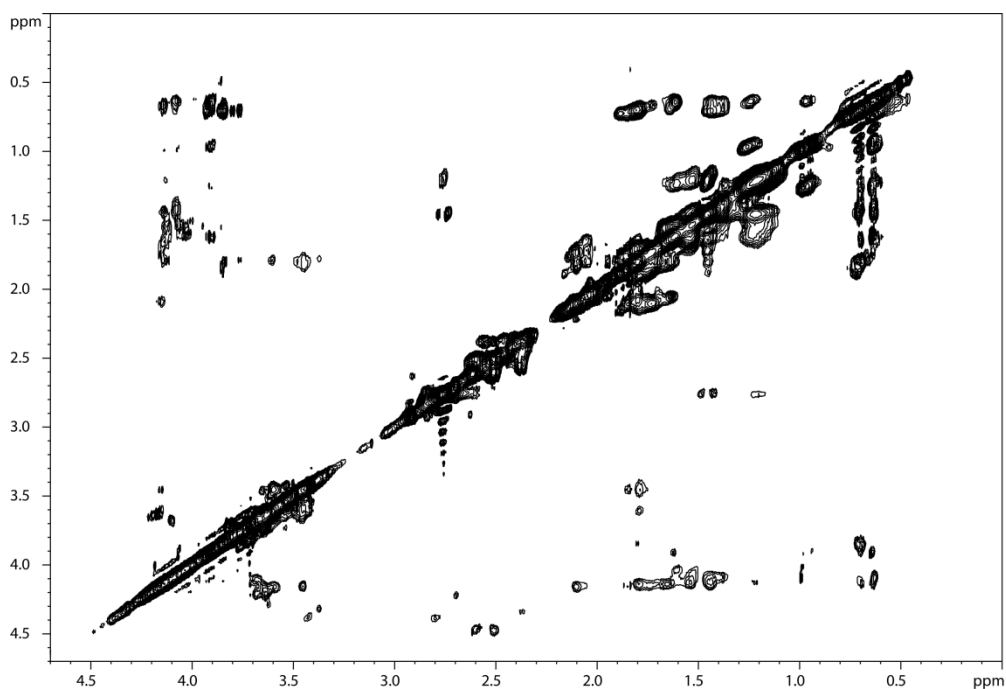
Nach Etablierung einer erfolgreichen Probenpräparation wurde ein NOESY-Spektrum bei aufgenommen, um im Vergleich mit einer Referenzprobe, in der sich nur das Peptid befand, Veränderungen zu beschreiben. Die Messungen fanden bei 285 K statt, um eine Aggregation zu verhindern. Die Proteinstammlösung enthielt zudem perdeuteriertes DTT im achtfachen Überschuss, um die Dimerisierung des Proteins zu verhindern. Der Vergleich der Signalvolumina einiger exemplarisch ausgesuchter Signale zeigte, dass es zu starken Veränderungen in der Struktur des Peptids kam, die nur durch ein Bindungsereignis zu erklären sind (Tabelle 5.1). Das größte Signalvolumen des jeweiligen Spektrums wurde auf 100 % normalisiert.

**Tabelle 5.1: Auswahl von relativen Signalvolumina der Referenzprobe ( $c_{t3a} = 500 \mu\text{M}$  in PBS/D<sub>2</sub>O-Puffer) und der Probe des trimolekularen Komplexes ( $c_{t3a} = 500 \mu\text{M}$ ,  $c_{K18} = 200 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{Heparin}} = 200 \mu\text{M}$  in PBS/D<sub>2</sub>O-Puffer, NOESY-Mischzeit = 300 ms).**

Kreuzsignal	Relatives Signalvolumen t3a	Relatives Signalvolumen t3a + K18 + Heparin
H $\alpha$ zu H $\gamma$ Gln276	3%	10 %
H $\alpha$ zu H $\delta$ Ile278	24 %	38 %
H $\gamma$ zu H $\alpha$ Gln276	3 %	15 %
H $\beta$ zu H $\delta$ Ile278	100 %	51 %
H $\gamma$ zu H $\delta$ Ile278	49 %	31 %
H $\gamma$ zu H $\delta$ Lys274/280/281	66 %	55 %
H $\gamma'$ zu H $\alpha$ Val275	34 %	100 %
H $\delta$ zu H $\alpha$ Ile277/278	71 %	98 %
H $\delta$ zu H $\gamma$ Ile277/278	52 %	54 %



**Abbildung 5-2:** Ausschnitt des NOESY-Spektrums der Referenzprobe aus Peptid t3a in PBS/D<sub>2</sub>O im Bereich von 4.7-0 ppm in F2 und F1.



**Abbildung 5-3:** Ausschnitt des NOESY-Spektrums der Probe des trimolekularen Komplexes aus Peptid t3a, Proteinkonstrukt K18 und Heparin in PBS/D<sub>2</sub>O im Bereich von 4.7-0 ppm in F2 und F1.

Leider konnten keine sequenziellen oder noch weiter reichende *long range* NOE-Kontakte beobachtet werden. Dies lag v.a. an den stark überlagerten Signalen im aliphatischen Bereich des Spektrums. Eine Bestimmung der Struktur ausschließlich mit Kontakten innerhalb einer Aminosäure ist höchst fragwürdig und wurde deshalb nicht durchgeführt. Der Versuch, durch Senkung des pH-Werts die Kinetik des NH-Austausches zu beeinflussen, schlug fehl, da es wieder zum weißlich trüben Niederschlag durch Aggregation in der Probe kam. Hierdurch blieben die Analyse der sequenziellen Kontakte im NH-Bereich und dadurch die Bestimmung zuverlässiger, strukturbestimmender Abstände verwehrt.

### 5.2.4 STD NMR-Experimente mit Peptid **t3a** und dem Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Die Beschleunigung der Aggregation durch die polyanionische Verbindung Heparin ermöglichte die Durchführung von STD NMR-Experimenten. Die Experimente wurden bei 295 K an einem 700 MHz-Spektrometer mit cryogenem Probenkopf aufgenommen. Das Peptid **t3a** wurde als Feststoff zu der 3 mM-Stammlösung des Proteinkonstrukts mit achtfachem Überschuss an DTT-d<sub>10</sub> in deuteriertem PBS-Puffer bei pH 7.2 zugegeben. Zusätzlich wurde der Probe äquimolar Heparin zugesetzt. Als Einstrahlpunkt wurde -1 ppm gewählt, während die Sättigungszeit bei 4 s und die Abschwächung bei 45 dB belassen wurden, um das Bindungsepitop zu bestimmen.

Zur Bestimmung des Bindungsepitops wurde ein STD-Spektrum einer Probe mit 1.1fachen Ligandenüberschuss verwendet. Zur Probenzusammensetzung ist zu sagen, dass in den Vorarbeiten kein STD-Effekt beobachtet werden konnte, da durch die langsame Kinetik nicht genügend gesättigtes, im freien Zustand detektierbares Peptid in der Probe vorhanden war. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde die hohe Proteinkonzentration gewählt. Der Wahl des Überschusses an Peptid wirkte jedoch seine geringe Löslichkeit entgegen, sodass ein geringer Überschuss von nur 10 % gewählt werden konnte. Um die natürliche Umgebung des Tau-Proteins zu simulieren, wurde der Probe äquimolar Heparin zugefügt.

Das mit dieser Probe anschließend durchgeführte STD NMR-Experiment zeigte geringe aber deutlich differenzierte STD-Signale für einzelne Protonen von 1.16 bis 0.54 %. Die Artefakte lagen bei 0.27 %, was mit den Vorarbeiten und den dort bestimmten Signalen durch direkte Sättigung des Peptids übereinstimmt. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen den Vergleich zweier Bereiche (9.0 bis 6.0 ppm und 5.0 bis 0 ppm) des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums mit dem STD NMR-Spektrum.

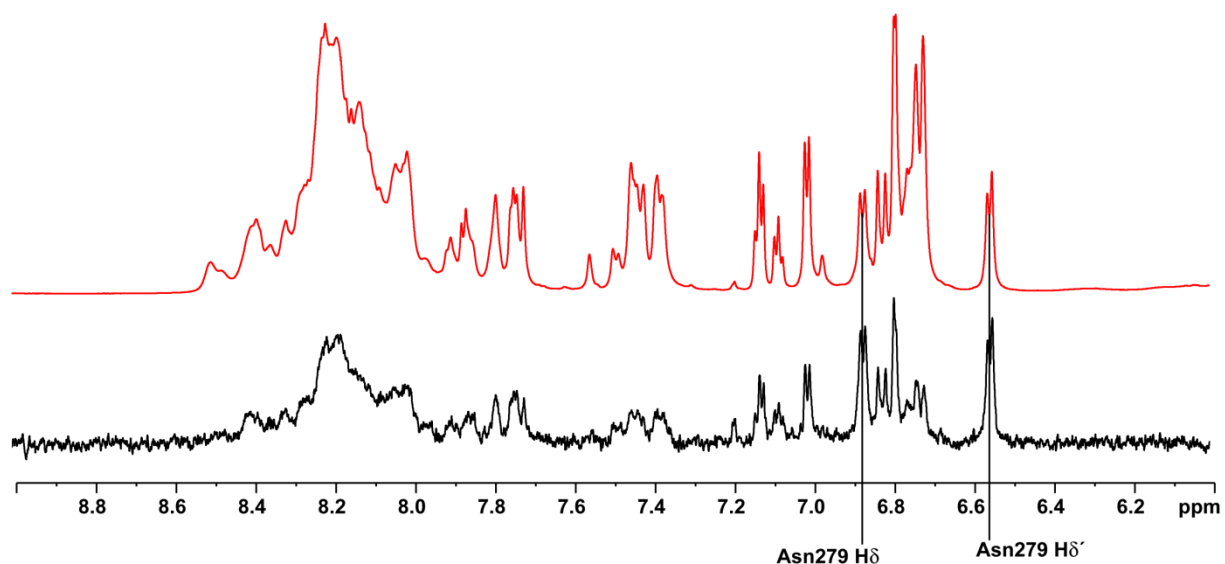


Abbildung 5-4: Vergleich des  $^1\text{H}$ -Spektrums von *t3a* mit dem Proteinkonstrukt K18 (off resonance, rot, 100fach verkleinert) mit dem dazugehörigen STD NMR-Spektrum (schwarz) im Bereich von 9.0-6.0 ppm.

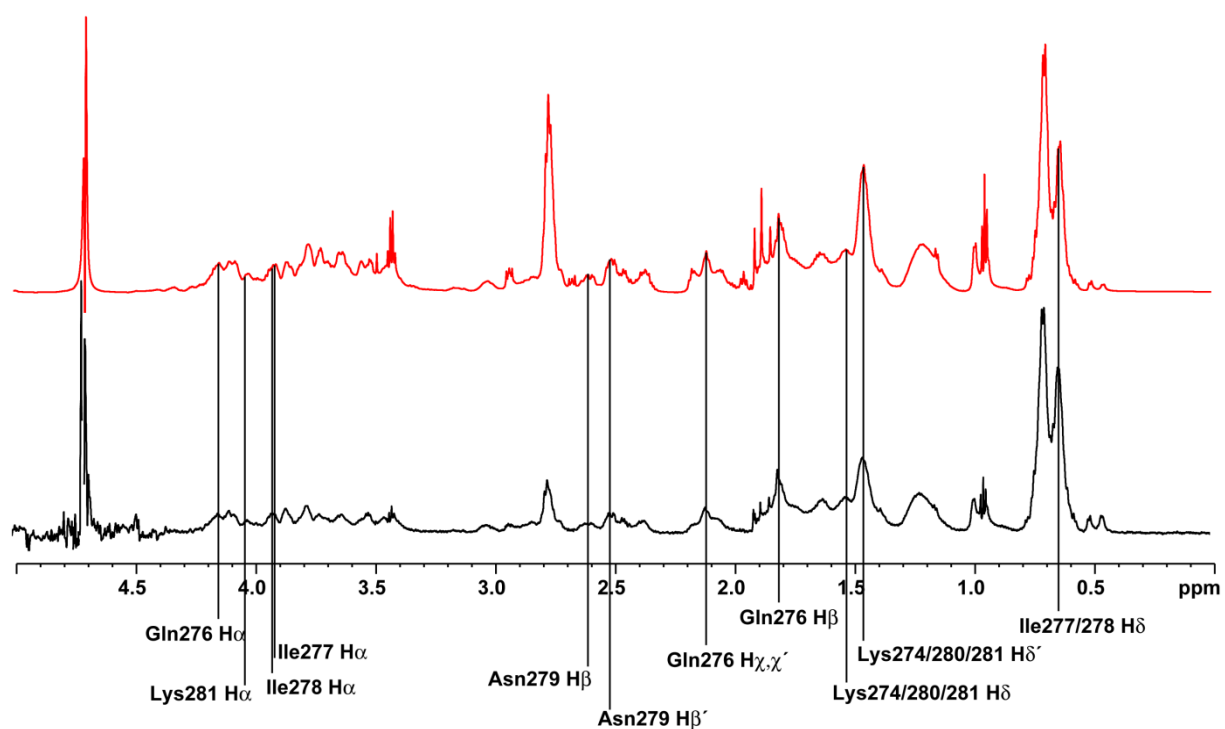


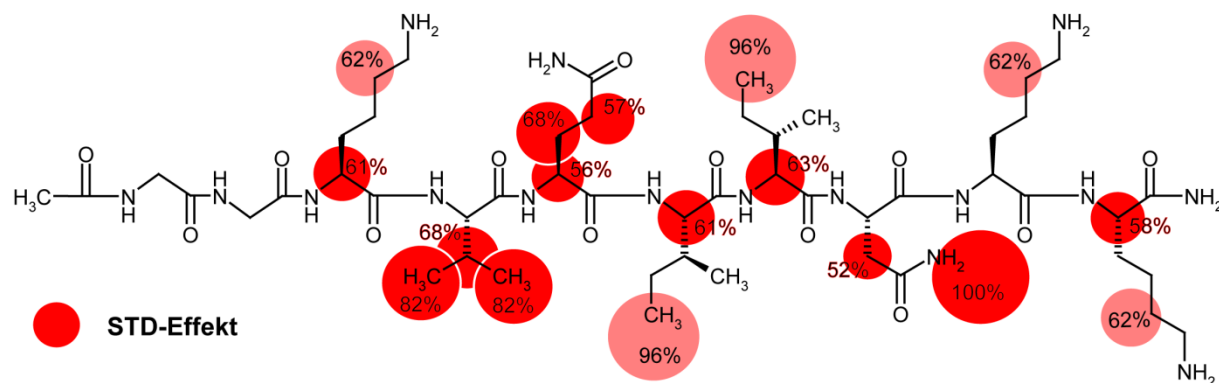
Abbildung 5-5: Vergleich des  $^1\text{H}$ -Spektrums von *t3a* mit dem Proteinkonstrukt K18 (off resonance, rot, 100fach verkleinert) mit dem dazugehörigen STD NMR-Spektrum (schwarz) im Bereich von 5.0-0 ppm.

Die STD-Effekte wurden auf das größte Signal (Asn279 H $\delta$ ) auf 100 % normiert. Die folgende Tabelle 5.2 zeigt die STD-Effekte aller beteiligten Protonen.

**Tabelle 5.2: Tabelle der an der Bindung beteiligten Protonen, der STD-Effektgröße und der Normierung.**

Proton	STD-Effekt	Relativer STD-Effekt
Asn279 H $\delta$	1.157 %	100 %
Ile277/278 H $\delta$	1.113 %	96 %
Asn279 H $\delta'$	1.039 %	90 %
Val275 H $\gamma, \gamma'$	0.952 %	82 %
Gln276 H $\beta$	0.791 %	68 %
Val275 H $\beta$	0.783 %	68 %
Ile278 H $\alpha$	0.724 %	63 %
Lys274/280/281 H $\delta$	0.717 %	62 %
Lys274 H $\alpha$	0.717 %	62 %
Ile277 H $\alpha$	0.703 %	61 %
Lys281 H $\alpha$	0.676 %	58 %
Gln276 H $\gamma, \gamma'$	0.657 %	57 %
Gln276 H $\alpha$	0.651 %	56 %
Asn279 H $\beta, \beta'$	0.596 %	52 %
Lys274/280/281 H $\delta'$	0.567 %	49 %
Gln276 H $\epsilon$	0.573 %	49 %
Gln276 H $\epsilon'$	0.540 %	47 %

Die grafische Darstellung der im STD NMR-Experiment bestimmten beteiligten Protonen in Abbildung 5-6 lieferte anschauliche Einblicke in das Bindungsepitop des Peptids.



**Abbildung 5-6:** Grafische Darstellung der an der Bindung am K18 beteiligten Protonen des Peptids t3a. Die Größe der Kreise ist proportional zur Stärke des beobachteten STD-Effekts, die zusätzlich mit den normierten Prozentangaben versehen sind. Da die  $\text{H}\delta$ -Protonen der drei Lysine und der beiden Isoleucine jeweils nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, ist ihre Deckkraft in der Abbildung verringert dargestellt.

### 5.2.5 Synthese und Charakterisierung des $^{15}\text{N}$ -markierten t3a15N

Zur Herstellung des  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptids wurden markierte Aminosäuren benötigt, die entsprechend der zu nutzenden Festphasenpeptidsynthese mit säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen und der baselabilen Fmoc-Schutzgruppe versehen sein mussten. Während die meisten Aminosäurebausteine erworben werden konnten, musste der Fmoc-Lys $^{15}\text{N}_2$ (Boc)-OH-Baustein ausgehend von Lysin hergestellt werden. Das Problem der Synthese ist die selektive Schützung der beiden Aminogruppen mit unterschiedlichen Schutzgruppen. Dazu wurden die  $\text{N}\alpha$ -Position und die Säurefunktion zweier Lysinmoleküle unter Ausbildung eines quadratisch planaren Komplexes mit einem Kupfer(II)Ion geschützt. Dadurch konnte die Seitenkettenaminogruppe selektiv mit der Boc-Gruppe geschützt werden. Nach Entfernung des Metallions mittels Ionentauscher konnte die  $\text{N}\alpha$ -Position mit der Fmoc-Gruppe versehen werden. Die Gesamtausbeute der Reaktion betrug 55 %. Die folgende Abbildung 5-7 zeigt den Mechanismus der Reaktion.

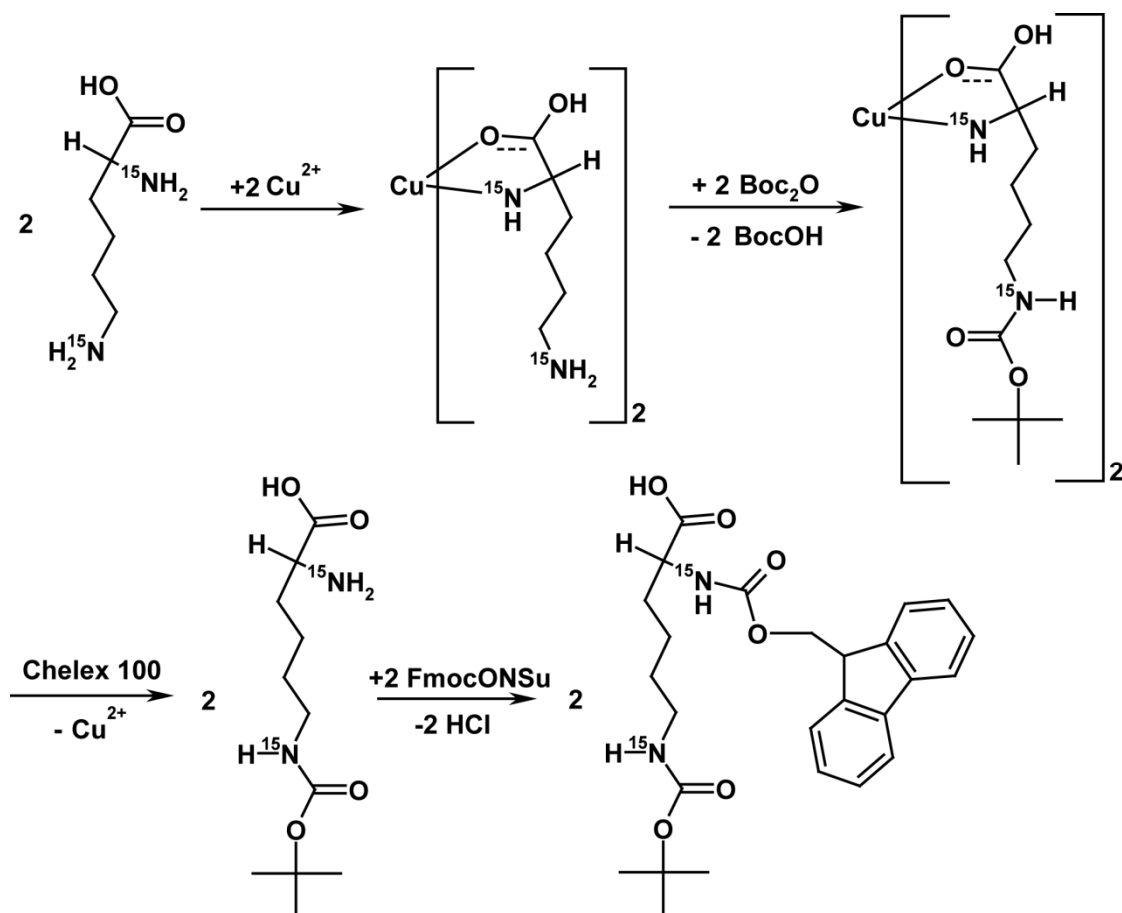
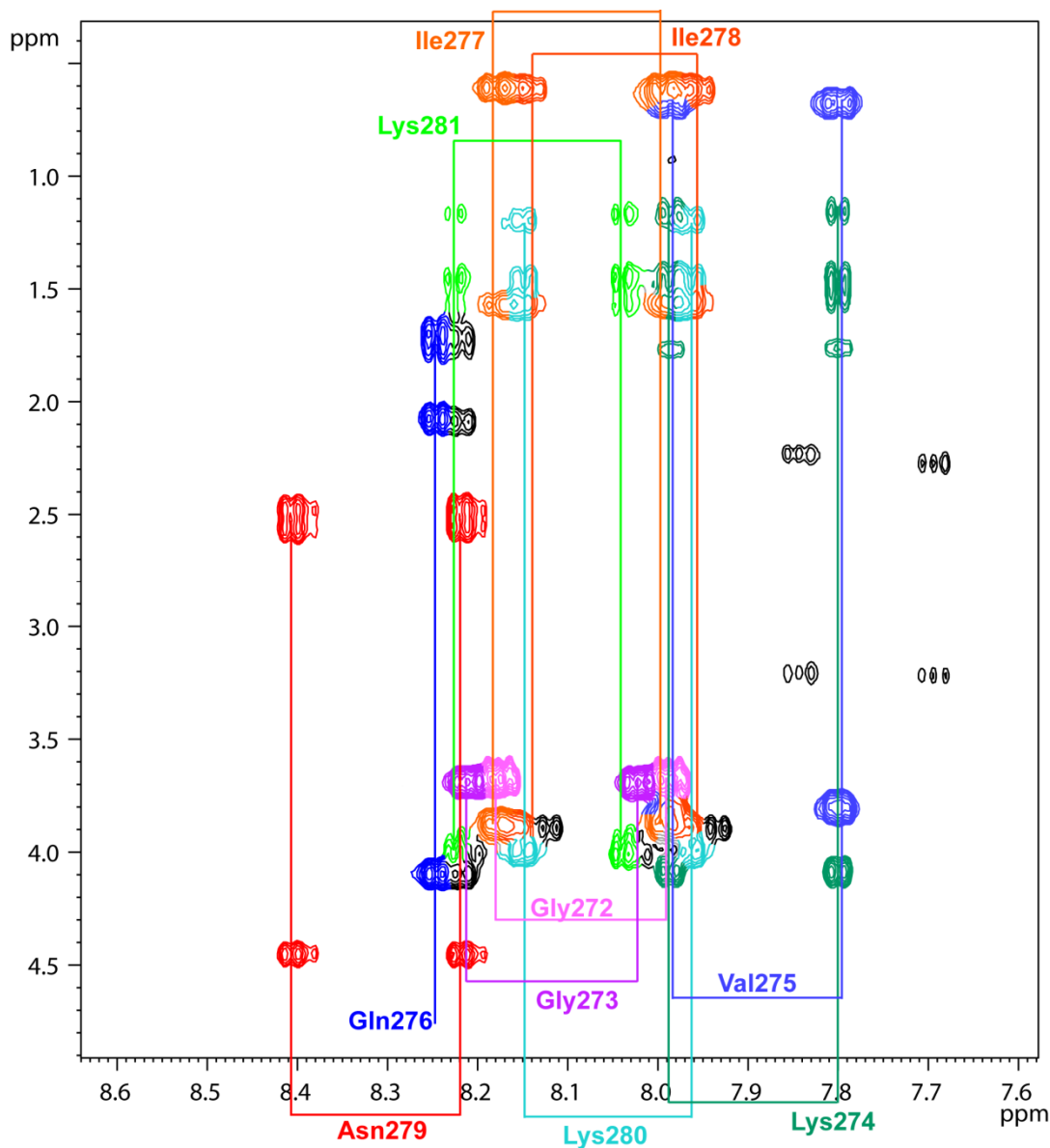


Abbildung 5-7: Mechanismus zur Synthese von  $Fmoc-Lys^{15}N_2(Boc)-OH$  unter selektiver Schützung von Lysin.

Die Synthese des  $^{15}N$ -markierten Peptids wurde vollkommen identisch zu der Synthese des unmarkierten Peptids in Kapitel 5.2.1 durchgeführt. Hierzu wurden allerdings, bis auf eine Ausnahme, nur  $^{15}N$ -markierte, seitenkettengeschützte Fmoc-Aminosäurebausteine verwendet. Die Aminosäure Gln konnte an Position 276 nicht  $^{15}N$ -markiert eingesetzt werden, da sie markiert nicht kommerziell erhältlich war.

Zur Charakterisierung wurde das Produkt vor und nach der auf Aufreinigung mittels MALDI-TOF MS identifiziert. Anschließend wurde das Peptid in  $H_2O/D_2O$  auf Vollständigkeit und Sequenzfolge mittels TOCSY- und NOESY-Experimenten charakterisiert. Die folgende Abbildung 5-8 zeigt den NH-Ausschnitt des TOCSY-Spektrums.





**Abbildung 5-8:** Ausschnitt eines  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrums des Peptids  $t3a15\text{N}(c = 1.1 \text{ mM})$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} 9:1$ ,  $\text{pH } 7$ ,  $T = 285 \text{ K}$ . Aminosäuren, deren Stickstoffatome  $^{15}\text{N}$ -markiert vorliegen, liefern zwei Spuren. Die Spuren einer Aminosäure sind farblich gleich gekennzeichnet und miteinander verbunden.

Anschließend wurde ein  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum des Peptids aufgenommen, um auch  $^{15}\text{N}$ -Signalzuordnungen vorzunehmen. Die Zuordnung erfolgte unter Zuhilfenahme der chemischen Verschiebungen und aus dem  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum. Die folgende Abbildung 5-9 zeigt den Ausschnitt aus dem  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum mit der Zuordnung der Signale. Hierbei fallen Unterschiede in den Linienbreiten der einzelnen Signale auf. Grund dafür ist der an den Stickstoffatomen mit verschiedener Geschwindigkeit stattfindende Austausch der NH-Protonen.

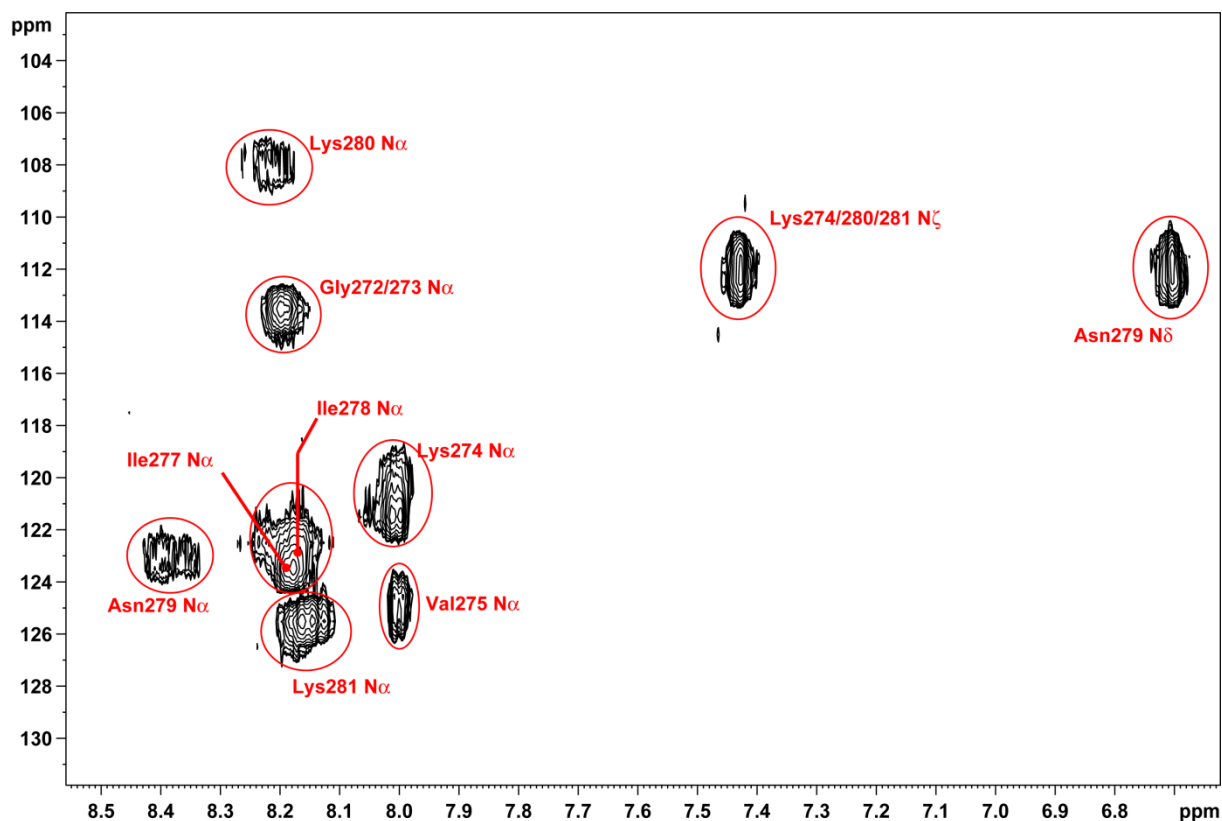
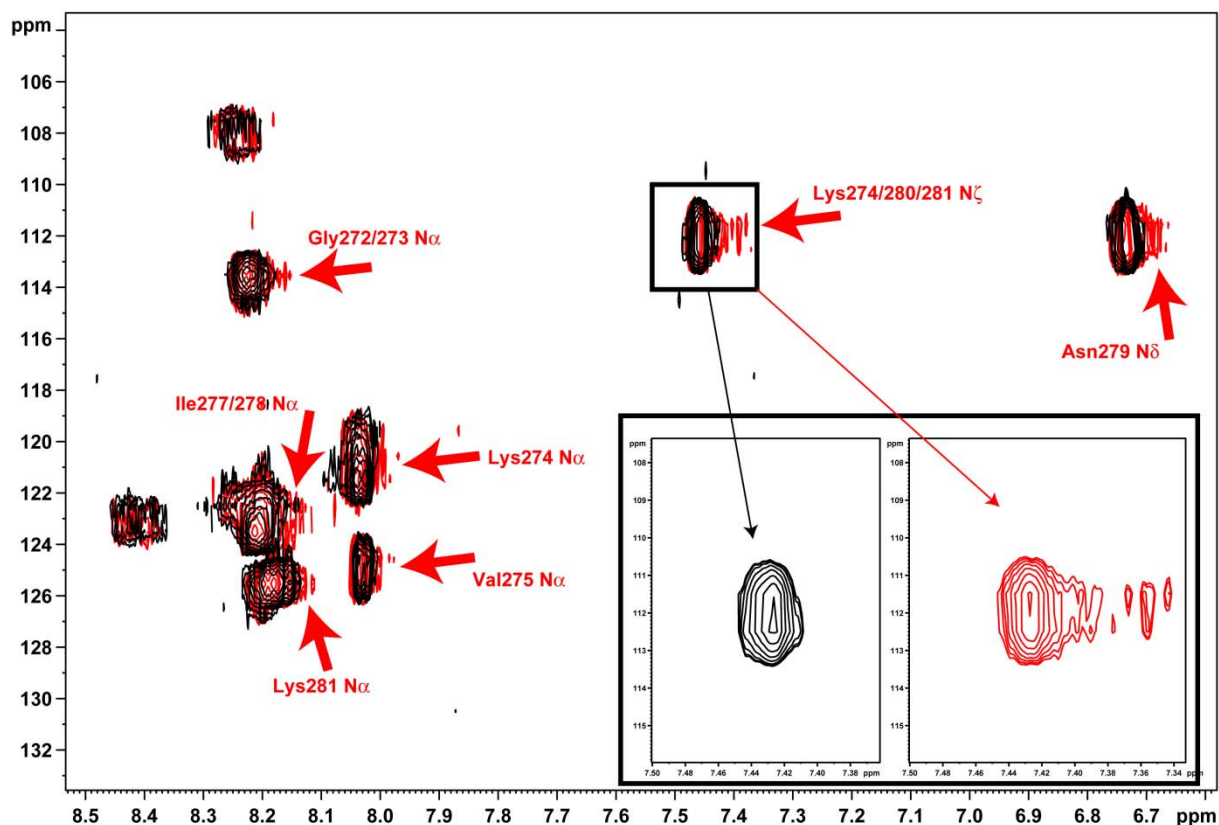


Abbildung 5-9:  $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum des Peptids **t3a** ( $c = 1.1 \text{ mM}$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}$  7,  $T = 285 \text{ K}$ ).

### 5.2.6 $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Experiment zur Interaktionsanalyse des Peptids **t3a** mit dem Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Im Falle einer Wechselwirkung zwischen dem markierten Peptid und dem Proteinkonstrukt verändern die Signale der beteiligten Aminosäuren im  $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum ihre Lage.

Die Experimente wurden bei 285 K an einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen. Das Proteinkonstrukt wurde aus einer 3 mM-Stammlösung mit achtfachem Überschuss an DTT- $\text{d}_{10}$  in PBS-Puffer ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 9:1$ ) bei  $\text{pH}$  7.2 auf die Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  eingestellt. Das  $^{15}\text{N}$ -markierte Peptid wurde äquimolar als Feststoff zugegeben. Die in der folgenden Abbildung 5-10 überlagerten Spektren zeigen die Änderungen der chemischen Verschiebungen im Vergleich zu der Probe ohne Protein und den beteiligten Stickstoffatomen. Die stärksten Veränderungen sind an den Stickstoffatomen der Seitenketten von Asn279 und den drei Lysinen (Lys274/280/281) sichtbar. Außerdem sieht man leichte Veränderungen an den Stickstoffatomen des Peptidrückgrats bei den Aminosäuren Gly272/273, Lys274, Val275, Ile277/278 und Lys281. Die Veränderungen im Spektrum fielen allerdings geringer als zunächst erwartet wurde (s. Abbildung 5-10). Um die Veränderungen zu verdeutlichen, ist in der Abbildung das Lys274/280/281  $\text{N}\zeta$ -Signal exemplarisch vergrößert dargestellt.



**Abbildung 5-10:** Darstellung der  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektren der reinen Peptidprobe (schwarz,  $c_{13a15N} = 200 \mu\text{M}$ , PBS-Puffer in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 9:1$ , pH 7.2,  $T = 285 \text{ K}$ ) und nach Zugabe des Proteinkonstrukts (rot,  $c_{K18} = 200 \mu\text{M}$ , PBS-Puffer in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 9:1$ , pH 7.2,  $T = 285 \text{ K}$ ); die roten Pfeile markieren die Veränderungen im zweiten Spektrum mit Benennung der beteiligten Stickstoffatome.

Die grafische Darstellung der an der Bindung beteiligten Stickstoffatome in Abbildung 5-11 lieferte die ersten Aussagen über das Bindungsepitop der Peptidsequenz. Dabei wurde die Unterscheidung in starken und geringen Effekt in der grafischen Darstellung beibehalten.

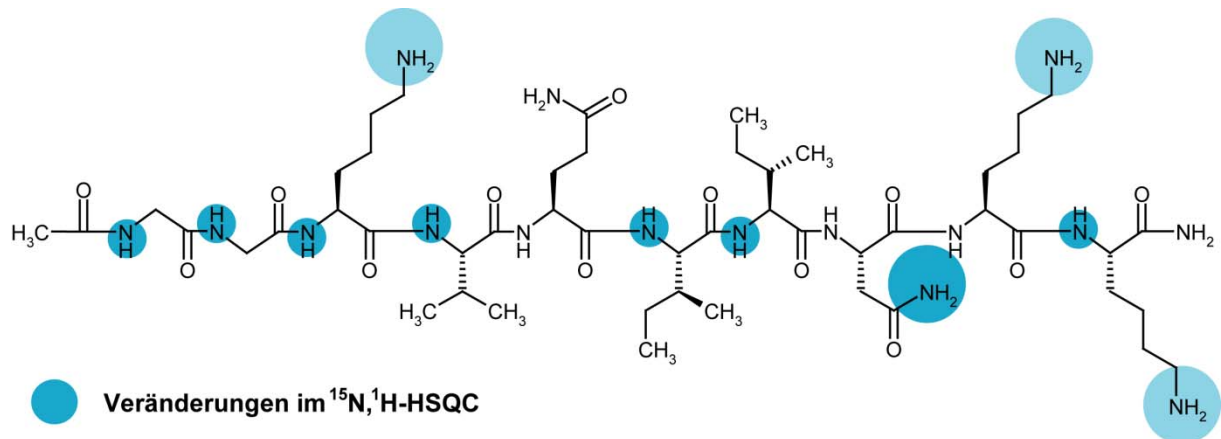


Abbildung 5-11: Grafische Darstellung der an der Bindung am K18 beteiligten Stickstoffatome. Die Größe der Kreise spiegelt die Einteilung der Effekte in geringe und starke Effekte wieder. Da die  $N\zeta$ -Atome der drei Lysine nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, ist die Deckkraft in der Abbildung verringert dargestellt.

### 5.2.7 $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC- und $^1\text{H}$ -STD NMR-basiertes Bindungsepitop von **t3a**

Setzt man die Erkenntnisse über die an dem Bindungsereignis beteiligten Stickstoffatome und Protonen aus den Kapiteln 5.2.6 und 5.2.4 zusammen, ergibt sich ein detailliertes Bild über das Bindungsepitop. Abbildung 5-12 liefert die grafische Darstellung des zusammengesetzten Bindungsepitops der Sequenz  $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$  an den *repeat*-Regionen des Tau-Proteins, dem **K18** Proteinkonstrukt.

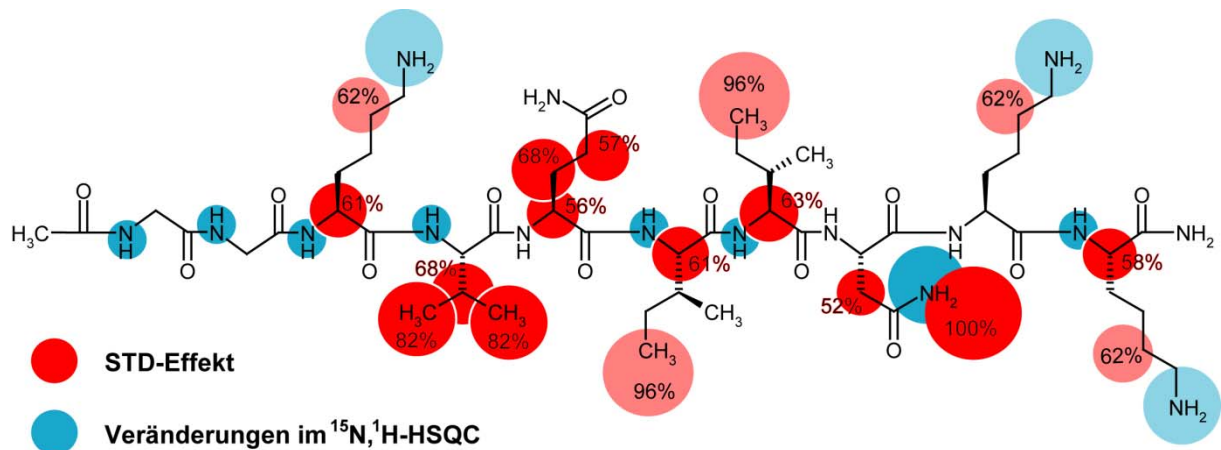


Abbildung 5-12: Grafische Darstellung des aus STD NMR und  $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC zusammengesetzten Bindungsepitops. Die Größe der Kreise ist proportional zur Stärke des beobachteten Effekts. Die STD-Effekte sind zusätzlich mit den normierten Prozentangaben versehen. Nicht eindeutig zugeordnete Signale sind mit verringerter Deckkraft dargestellt.

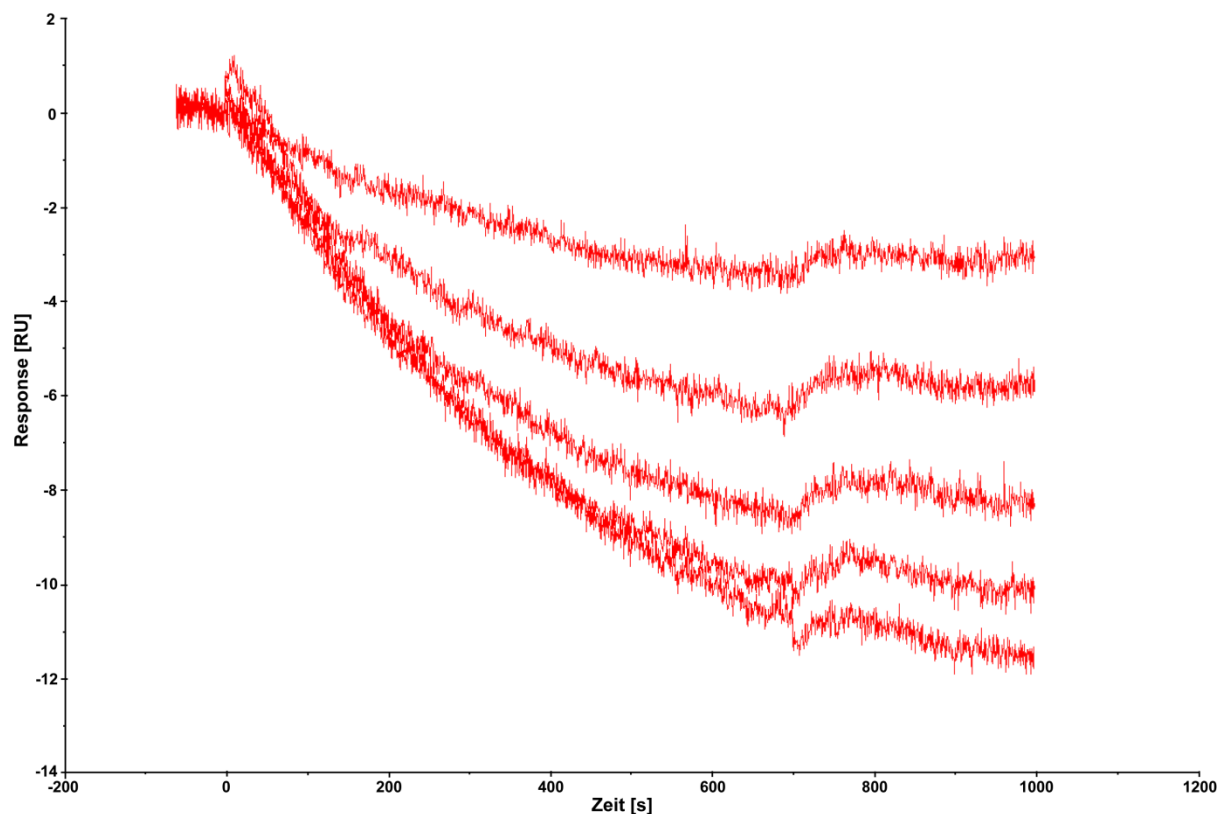
Bei der Interaktion scheint die Seitenkette des hydrophilen Asn279 eine tragende Rolle zu spielen, da hier sowohl der stärkste STD-Effekt als auch die größte Veränderung im  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum zu beobachten war. Das hydrophobe Val275 liefert einen starken Beitrag zur Bindung an das **K18**, wie auch Ile278 und Ile279. Das hydrophile Gln276 scheint laut STD-Experiment einen wichtigen Anteil an der Bindung zu haben. Die relativ großen STD-Effekte an der Seitenkette lassen vermuten, dass die Säureamidgruppe am Ende von Gln276 eine starke Wechselwirkung eingeht. Da die Aminosäure Gln276 allerdings nicht  $^{15}\text{N}$ -markiert vorlag, kann der Einfluss der Säureamidgruppe nicht genauer charakterisiert werden. Der große Einfluss der Lysinseitenketten kann ebenfalls nicht genauer beschrieben werden, da die eindeutige Zuordnung weder im STD NMR-Experiment noch im  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC möglich war.

### 5.2.8 SPR-Experimente von Peptid **t3a** an das Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Die Interaktion zwischen **t3a** und **K18** wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanz untersucht. Dafür wurde ein CM5-Chip benutzt, der mit 325 fmol **K18** über Aminkupplung auf der zweiten Messzelle belegt war. Die erste Messzelle wurde als Referenzzelle genutzt. Als Puffer wurde steril filtrierter PBS-Puffer (pH 7.2) benutzt. Die Vorversuche zeigten negative Kurvenverläufe. Hierbei handelt es sich um einen selten auftretenden Effekt, der mit den Veränderungen im Brechungsindex der Probenlösung durch z.B. Solvathüllen und Gegenionen zusammenhängt. In diesem Fall müssen zur Auswertung die Beträge der Messantworten genutzt werden. Die Vorversuche zeigten außerdem, dass Assoziation und vor allem die Dissoziation des Komplexes langsam verlaufen. Entsprechend wurden lange Zeiträume für die Interaktionen gewählt. Die maximal mögliche Dissoziationszeit von 300 s war nicht ausreichend, um die Chipoberfläche wieder vollkommen zu regenerieren. Versuche zur Wahl der Regenerationsmethode zeigten, dass eine 20 s lange Injektion von 50 mM Salzsäure und einer anschließenden 60 s langen Stabilisierungsperiode geeignet waren, um die Chipoberfläche vollständig zu regenerieren, ohne dass dies zur Inaktivierung des Proteins führte.

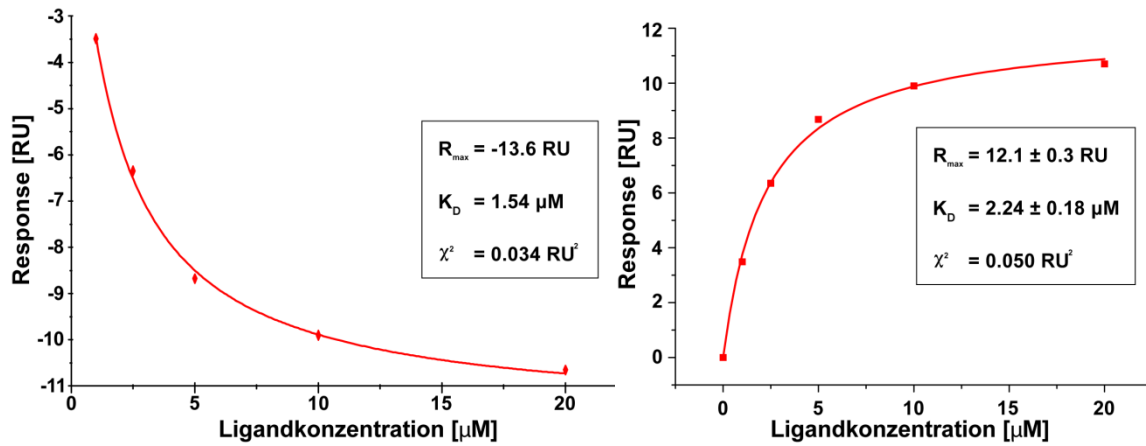
#### Bestimmung der Dissoziationskonstante von **t3a** über die Sättigungswerte

Abbildung 5-13 zeigt den konzentrationsabhängigen Verlauf einiger Sensorgramme. Da es durch den oben beschriebenen Effekt zu negativen Kurvenverläufen kam, war es nicht möglich, die Kinetik mit der Evaluationssoftware zu bewerten. Der Vergleich mit den Sensorgrammen aus Kapitel 5.3.3 und 5.5.2 zeigt, dass die Assoziation und vor allem die Dissoziation sehr langsam verlaufen. So scheint die Assoziationszeit von 700 s gerade auszureichen, um noch keine Sättigung bei der höchsten Konzentration von 20.0  $\mu\text{M}$  zu erreichen.



**Abbildung 5-13: Darstellung der negativ verlaufenden Sensorgramme für verschiedene Konzentrationen an *t3a* (von oben: 1.0  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 5.0  $\mu\text{M}$ , 10.0  $\mu\text{M}$  und 20.0  $\mu\text{M}$ ).**

Da der Verlauf der Sensorgramme eindeutig konzentrationsabhängig war, konnte eine Bestimmung der Dissoziationskonstante unter Verwendung des *one site binding* Modells durchgeführt werden. Während die Biacore T100 Evaluation Software den Ursprung nicht mitbenutzte und die negativen Antworten gegen die Konzentration an Peptid auftrug, wurde mit Origin der Ursprung dazugerechnet und es erfolgte eine Auftragung der Beträge der Antworten gegen die Konzentration (s. Abbildung 5-14). Bei Nichtbeachtung des Ursprungs ist das Ergebnis für die Dissoziationskonstante 1.54  $\mu\text{M}$ , bei Beachtung des Ursprungs 2.24  $\mu\text{M}$ . Der Mittelwert beträgt 1.89  $\mu\text{M}$ . Ähnlich geringe Unterschiede sind bei der maximalen Antwort des Systems  $R_{\text{max}}$  zu beobachten (-13.6 und -12.1 RU, Mittelwert: -12.9 RU). Auch der Streuungswert verändert sich kaum (0.034  $\text{RU}^2$  und 0.050  $\text{RU}^2$ , Mittelwert: 0.042  $\text{RU}^2$ ).



**Abbildung 5-14:** Darstellung der Sättigungswerte verschiedener Konzentration an t3a und der Angleichung des one site binding-Modells unter Nichtberücksichtigung (links) bzw. Berücksichtigung (rechts) des Ursprungs als Datenpunkt und den daraus resultierenden Werten für  $R_{max}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

### SPR-Studien zur Kinetik der Komplexbildung aus t3a und K18

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation wurde eine Temperatur von 298 K sowie eine Prozedur gewählt, die nach Equilibrierung des Gerätes automatisch die Messreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchführte. Es wurden Konzentrationen von 1 µM bis 20 µM vermessen. Außerdem wurden zwei Messungen ohne Peptid durchgeführt. Die Antwort dieser reinen Pufferinjektion wurde bei der Auswertung der Messungen mit Ligand automatisch abgezogen.

Die Evaluationssoftware lieferte wegen des negativen Verlaufs der Sensorgramme nicht die Möglichkeit, die Langmuir-Funktion direkt an den Verlauf der Sensorgramme für Assoziation und Dissoziation anzugleichen. Stattdessen wurden die Sensorgramme exportiert und mittels Origin 6.1 durch Angleichung des Langmuir-Modells ausgewertet. Hierdurch erhielt man die maximal mögliche Antwort  $RU_{max}$  und die empirische Konstante  $k_{obs}$ , die nach Gleichung 6 definiert ist als:

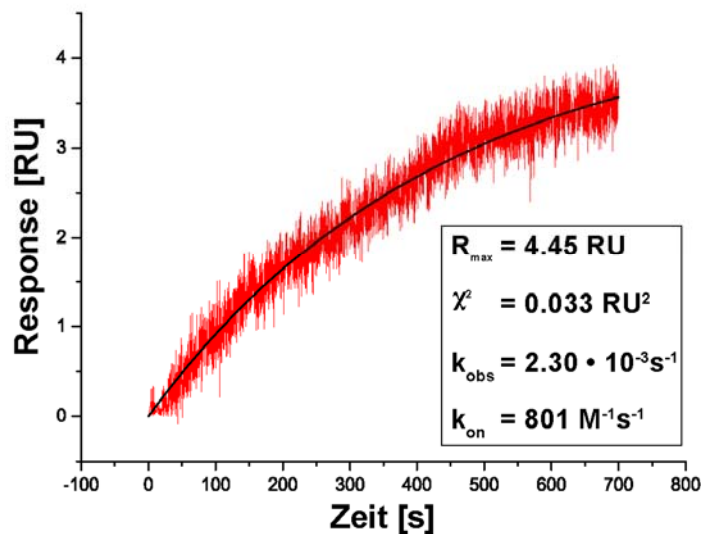
$$k_{obs} = k_{on} \times c + k_{off}$$

**Gleichung 6**

Durch Vorgabe der mittels der Sättigungswerte bestimmten Dissoziationskonstanten  $K_D = 1.89 \text{ µM}$  entsteht mit Gleichung 4 folgender Zusammenhang zur Bestimmung von  $k_{on}$ :

$$k_{on} = \frac{k_{obs}}{c + K_D}$$

**Gleichung 7**



**Abbildung 5-15:** Darstellung der Angleichung des Langmuir-Modells an den Betrag des Sensorgramms der Konzentration  $c = 1 \mu\text{M}$  und der daraus resultierenden Werte.

Hieraus ergaben sich für die Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  bis  $20 \mu\text{M}$  Werte für die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{on}}$  zwischen  $801 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $69 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Somit handelt es sich um eine sehr langsame Assoziation von ca.  $10^2$  bis  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , die um etwa fünf bis sechs Größenordnungen unter der kleiner Moleküle in ihrer Interaktion mit großen Rezeptoren liegt.

### 5.2.9 Diskussion der Bindungsstudien von Peptid t3a an das Tau-Proteinkonstrukt K18

Die durchgeführten NMR-Experimente haben wertvolle Erkenntnisse zu dem vor der Aggregation stattfindenden Nukleationsprozess geliefert.

Die durchgeführte Identifizierung der an der Aggregation beteiligten Protonen des Peptids **t3a** mittels STD NMR-Experiment lieferte hierbei erste Informationen. Dabei wurde der größte Effekt an der Seitenkette der Aminosäure Asn279 beobachtet. Gleichzeitig wurden starke hydrophobe Wechselwirkungen an Ile277/278 und Val275 aufgezeigt. Auch die Seitenketten der Lysine (Lys274/280/281) und der Aminosäure Gln276 sind beteiligt (s. Kapitel 5.2.4).

Die Veränderungen in den chemischen Verschiebungen im  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum haben komplementäre Informationen der an der Interaktion maßgeblich beteiligten Aminosäuren aufgezeigt. Obwohl die Veränderungen geringer ausgefallen sind als erwartet wurde, konnten eindeutig beteiligte Stickstoffatome identifiziert werden. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um die Seitenketten der Aminosäuren Asn279 und der drei Lysine (Lys274/280/281). Ferner sind leichte *shifts* an den Stickstoffatomen des Peptidrückgrats bei den Aminosäuren Gly272/273, Lys274, Val275, Ile277/278 und Lys281 zu detektieren (s. Kapitel 5.2.6). Die Beteiligung der Aminosäure Gln276 konnte leider im



$^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum nicht gezeigt werden, da es sich um die einzige Aminosäure handelte, die nicht  $^{15}\text{N}$ -markiert vorlag.

Beide Experimente unterschieden sich hinsichtlich der Zugabe von Heparin. Erst durch die Zugabe von Heparin wurden die STD NMR-Experimente ermöglicht, da sich die Kinetik der Reaktion dadurch beschleunigte. Die Betrachtung des aus beiden Experimenten zusammengesetzten Bindungsepitops zeigt jedoch durch die Deckungsgleichheit der beteiligten Aminosäuren, dass es hierdurch zu keiner Veränderung des Bindungsepitops kam. Dieses steht im Einklang mit den in Kapitel 5.2.7 präsentierten Ergebnissen.

Das von von Bergen *et al.* bestimmte, kleinste bindende Motiv  $^{275}\text{VQIINK}^{280}$  konnte bestätigt werden.<sup>71</sup> Zusätzlich sind allerdings auch die Aminosäuren Lys274 und Lys281 an der Wechselwirkung beteiligt. Außerdem wurde der Einfluss der einzelnen Aminosäuren quantifiziert.

Die Durchführung von SPR-Experimenten führte außerdem trotz negativen Kurvenverlaufs zu einer Dissoziationskonstante des Komplexes aus **t3a** und immobilisiertem **K18** von  $1.89 \mu\text{M}$  (s. Tabelle 5.3).

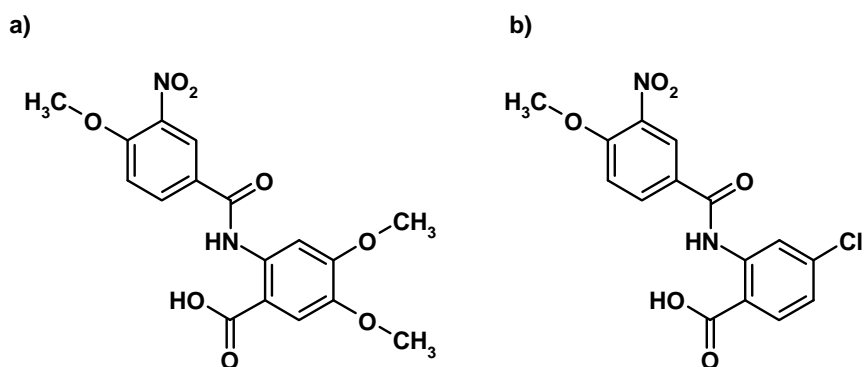
**Tabelle 5.3: Durch SPR-Experimente bestimmte Dissoziationskonstante des Komplexes aus t3a und K18.**

Methode	$K_D$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]	Streuungswert $\chi^2$
SPR	1.89	0.042 RU <sup>2</sup>

### 5.3 Bindungsstudien von B4D3 an das Tau-Proteinkonstrukt K18

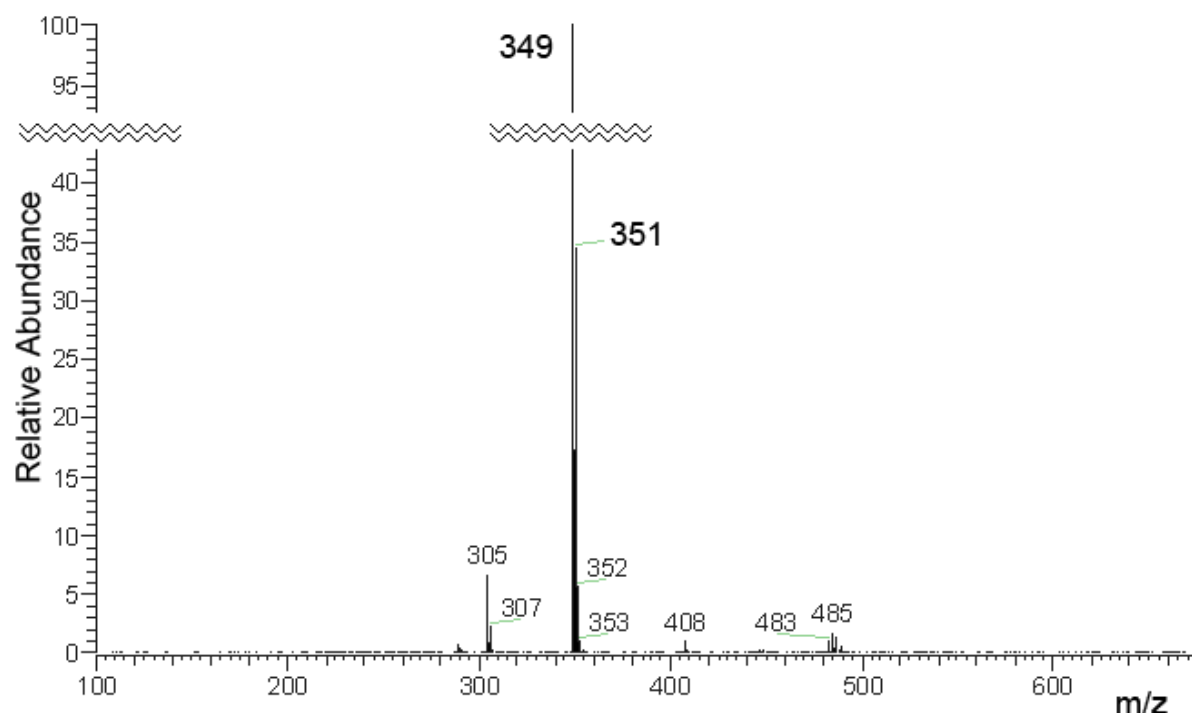
#### 5.3.1 Identifizierung von B4D3

Bei den NMR-Versuchen mit der Substanz **B4D3** stellte sich heraus, dass die angegebene Strukturformel (Abbildung 5-16a) nicht korrekt war. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte anstelle von fünf aromatischen Protonensignalen sechs Signale und nur Signale einer Methoxygruppe.



**Abbildung 5-16: a) Falsche und b) bestimmte Strukturformel von B4D3.**

Nach Aufnahme und Auswertung von 2D-NMR-Spektren ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC und  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HMBC) konnten zwei aromatische Spinsysteme mit je drei aromatischen Protonen zugeordnet werden. Bei beiden Spinsystemen handelte es sich um ABX-Spinsysteme. Ferner war nur eine einzelne Methoxygruppe vorhanden. Das Massenspektrum zeigte nicht nur eine Molmasse von  $351 \text{ g/mol}$  statt  $376 \text{ g/mol}$ , sondern auch das für ein Chloratom charakteristische Isotopenverhältnis zweier um zwei Masseneinheiten verschiedener Molekülpeaks im Verhältnis von 3:1 (Abbildung 5-17). Nach Auswertung aller Spektren wurde auf die Strukturformel in Abbildung 5-16b geschlossen.



**Abbildung 5-17:** ESI-Massenspektrum der Verbindung **B4D3** und ihre ermittelte Strukturformel.

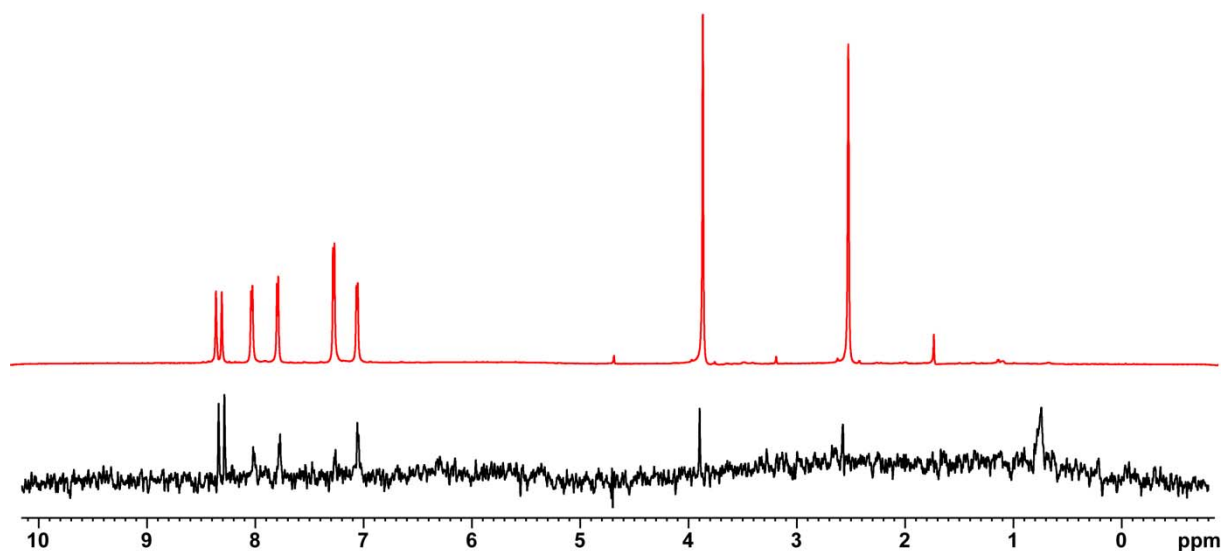
### 5.3.2 STD NMR-Experimente mit **B4D3** und dem Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Die STD NMR-Experimente wurden bei 295 K an einem 700 MHz-Spektrometer mit cryogenem Probenkopf aufgenommen. Dabei wurde der Ligand aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO- $d_6$  und das Proteinkonstrukt aus einer 3 mM-Stammlösung in deuteriertem PBS-Puffer mit achtfachem Überschuss an DTT- $d_{10}$  auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Lösungsmittel der Proben war deuterierter PBS-Puffer bei pH 7,2, um nahe an physiologischen Bedingungen zu messen. Nach Wahl der geeigneten Sättigungsparameter wurde zunächst das Bindungsepitop des Liganden bei einer einzelnen Messung bestimmt. Anschließend wurde entsprechend der bei der Bestimmung des Bindungsepitops erhaltenen STD-Effekte eine Titration mit steigendem Ligandenüberschuss

durchgeführt, um dadurch die thermodynamische Dissoziationskonstante des entstehenden Komplexes zu bestimmen.

### Artefaktbestimmung des Liganden **B4D3**

Um zu gewährleisten, dass bei den STD NMR-Experimenten der Ligand nicht direkt gesättigt wird, müssen die Sättigungsparameter und deren Einfluss auf Artefaktgröße bei einer reinen Ligandprobe eruiert werden. Dies sind Sättigungszeit, Sättigungsstärke und Einstrahlfrequenz der Sättigung. Die Sättigungszeit wurde zwischen 3 und 4 Sekunden, die Abschwächung der Sättigungsstärke zwischen 45 und 50 dB und die Einstrahlfrequenz von -1 bis 1 ppm variiert. Da das **K18**-Proteinkonstrukt bei 0.77 ppm Signale und der Ligand mit seinen Methoxyprotonen erst bei 3.9 ppm die ersten hochfeldigen Signale liefert, wurde entschieden die STD-Experimente bei 0.77 ppm, einer Sättigungszeit von 4 Sekunden und der geringsten Abschwächung von 45 dB durchzuführen. Die Artefaktgröße lag bei der größtmöglichen Ligandenkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  zwischen 0.2 und 2.0 % (Abbildung 5-18).



**Abbildung 5-18:** Vergleich eines  $^1\text{H}$ -Spektrums (off resonance, rot, 50fach verkleinert) mit dem STD NMR-Spektrum (schwarz) einer Probe mit **B4D3** ( $c = 250 \mu\text{M}$ , PBS in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.2, 2.5 %  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $T = 295 \text{ K}$ ).

### Bestimmung des Bindungsepitops von **B4D3**

Zur Bestimmung des Bindungsepitops wurde ein STD-Spektrum einer Probe bestehend aus Proteinkonstrukt und **B4D3** bei 50fachem Ligandenüberschuss verwendet. Das STD-Spektrum zeigte starke STD-Effekte für alle Protonen von 22 bis 8 % (Abbildung 5-19).

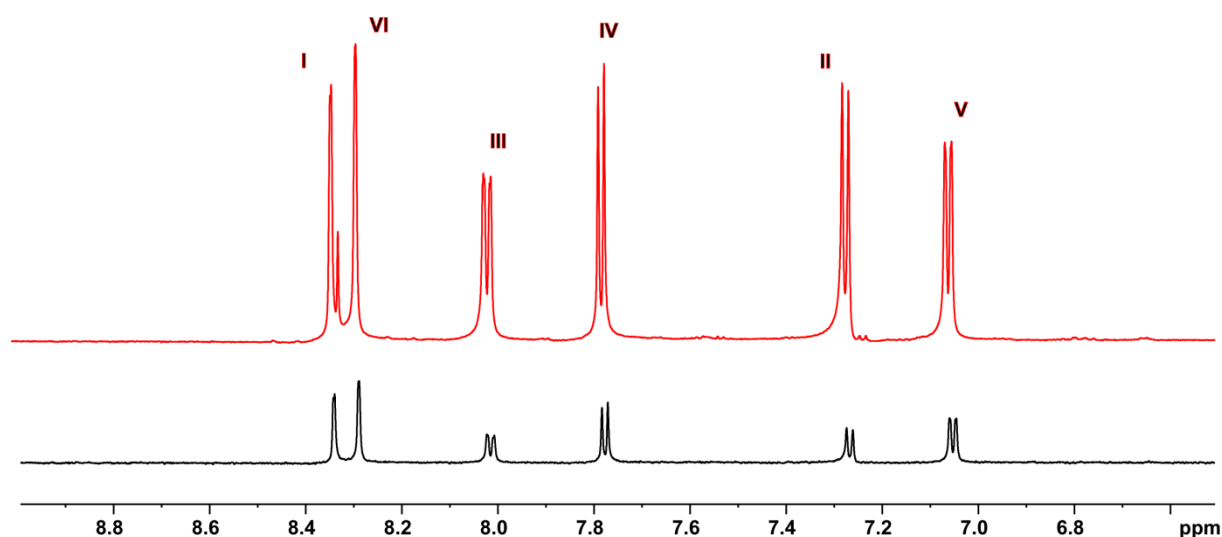


Abbildung 5-19: Vergleich eines  $^1\text{H}$ -Spektrums (off resonance, rot) mit dem STD NMR-Spektrum (schwarz) einer Probe mit B4D3 und Protein K18 ( $c_{\text{B4D3}} = 250 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{K18}} = 5 \mu\text{M}$ , PBS in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.2, 2.5 %  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $T = 295 \text{ K}$ ). Zuordnung der Signale s. Abbildung 5-20.

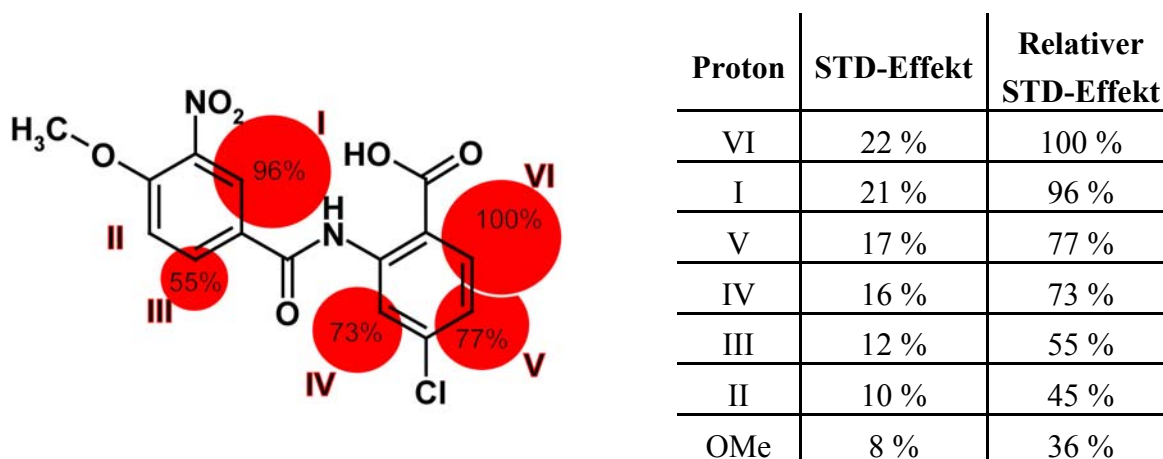
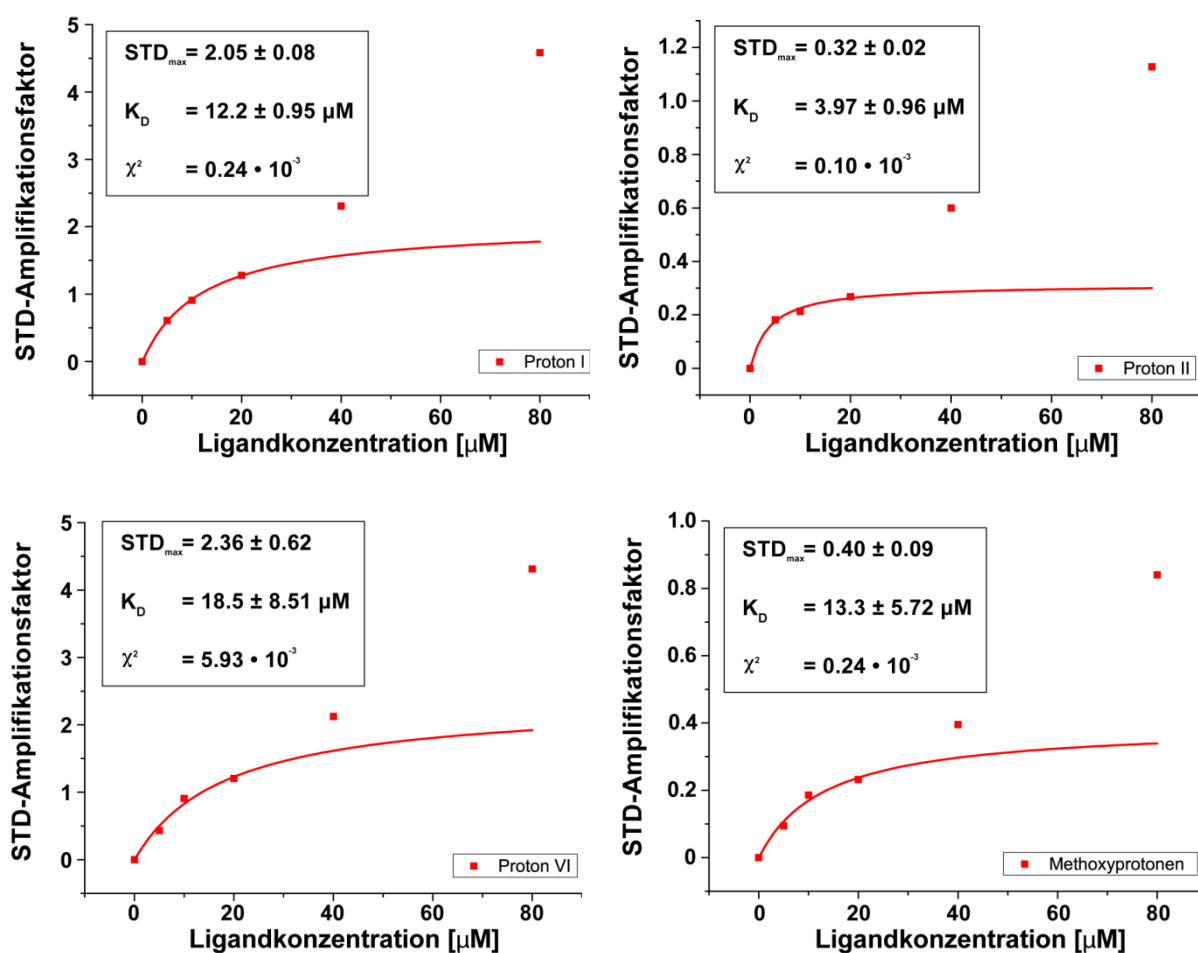


Abbildung 5-20 und Tabelle 5.4: Darstellung des Bindungsepitops von B4D3 mit allen beteiligten Protonen, die mindestens 50 % des maximalen STD-Effekts zeigten (Größe der Kreise proportional zum STD-Effekt).

Die STD-Effekte wurden auf das größte Signal (Proton VI) auf 100 % normiert. Die grafische Darstellung der an der Bindung beteiligten Protonen mit den zugehörigen, ermittelten STD-Effekten ergibt das in Abbildung 5-20 dargestellte Bindungsepitop. Tabelle 5.4 zeigt die STD-Effekte und die relativen STD-Effekte aller Protonen. Hierbei wurden Proton II und die Methoxyprotonen nicht berücksichtigt, da für die grafische Darstellung des Epitops nur Protonen gewählt wurden, deren STD-Effekte mindestens 50 % des maximalen STD-Effekts betragen.

Bestimmung der Dissoziationskonstante von **B4D3**

Um die Dissoziationskonstante des Komplexes aus **B4D3** und **K18** zu bestimmen, wurden anschließend mehrere STD NMR-Spektren mit steigender Ligandenkonzentration aufgenommen. Ausgehend von einer Probe mit 1  $\mu\text{M}$  Protein wurde der Überschuss an Ligand von fünffach bis 80fach sukzessive erhöht. Die Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren der einzelnen Protonen gegen die Ligandenkonzentration ergibt eine Kurve, die sich im Falle einer spezifischen Bindung nach dem *one site binding*-Modell beschreiben lässt. Die Datenpunkte liegen bis einschließlich 20  $\mu\text{M}$  auf der charakteristischen Krümmung eines durch spezifische Wechselwirkungen beschriebenen Systems. Die Dissoziationskonstanten für die einzelnen Protonen liegen zwischen 4.0 und 18.5  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 5-21:** Darstellung der Datenpunkte von vier Protonen, der daran angeglichenen Funktionen unter Berücksichtigung der Konzentrationen bis 20.0  $\mu\text{M}$  und den resultierenden Werten für  $STD_{\max}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

Im Falle der weitergeführten Titration fällt auf, dass sich die Datenpunkte oberhalb einer Ligandenkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  nicht mehr eindeutig durch die Funktion beschreiben lassen, was auch an dem großen Wert für die Streuung  $\chi^2$  sichtbar ist. Dies liegt daran, dass ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  der STD-Amplifikationsfaktor nahezu linear ansteigt. So

führt eine Angleichung der Funktionsgleichung unter Berücksichtigung der höheren Konzentrationen zu deutlich höheren maximalen STD-Amplifikationsfaktoren, Dissoziationskonstanten und vor allem zu einem 100- bis 1000fach höheren Streuungswert  $\chi^2$  (Abbildung 5-21). Die Erhöhung des Streuungswerts zeigt, dass die Vernachlässigung der höheren Konzentrationen gerechtfertigt ist und eine bessere Beschreibung des Bindungsereignisses liefert. Es ist davon auszugehen, dass der lineare Anstieg auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist, die bei der Betrachtung des Komplexes nicht von Interesse sind.

Die Erkenntnis, dass es bei Ligandenüberschüssen über 20fach zu unspezifischen Wechselwirkungen kommt, führte zu Zweifeln an der Richtigkeit der Bestimmungen des Bindungssepitops, da hier der Überschuss des Liganden 50fach betrug. Der Vergleich mit einer Probe mit geringerem Überschuss zeigte jedoch, dass es keine Veränderungen des Bindungssepitops gab. Da bei der größeren Konzentration jedoch das Signal zu Rauschverhältnis günstiger und damit eine genauere Auswertung möglich war, gilt das in Abbildung 5-20 dargestellte Bindungssepitop.

### 5.3.3 SPR-Experimente von **B4D3** an **K18**

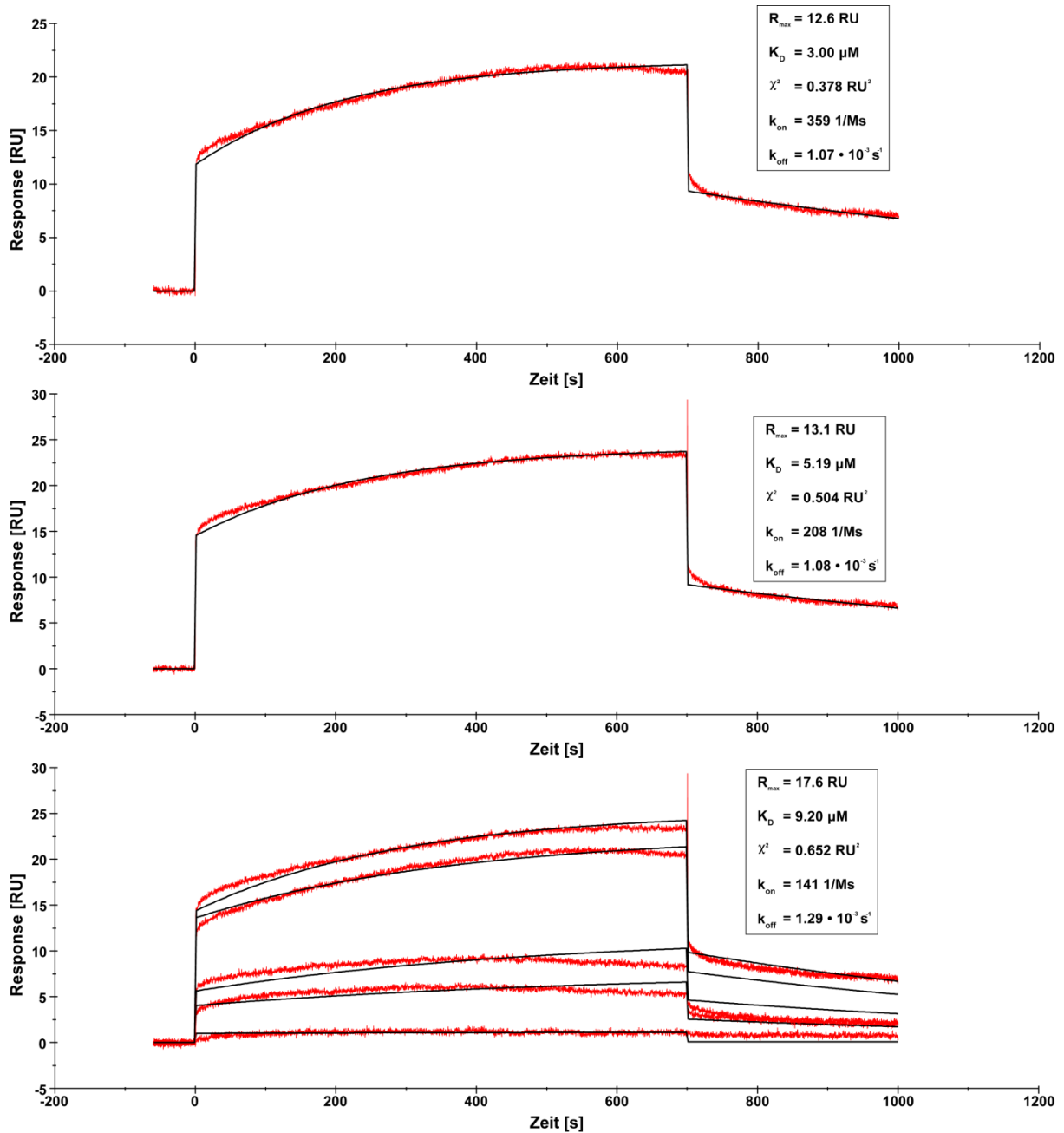
Als zweite Methode zur Untersuchung der Interaktion zwischen **B4D3** und **K18** wurde die Oberflächenplasmonenresonanz gewählt. Das Proteinkonstrukt **K18** wurde über die freien Aminogruppen unter Aktivierung durch EDC und NHS auf einem CM5-Chip immobilisiert. Die Belegung des Chips wurde über die sich bei der Belegung ergebene Antwort von 4293 RU (325 fmol) bestimmt. Eine weitere Messzelle wurde als Referenz ebenfalls mittels EDC und NHS aktiviert, jedoch nicht mit **K18** belegt. Als Puffer wurde steril filtrierter PBS-Puffer (pH 7.2) mit 1.0 % DMSO benutzt. Die Zugabe von DMSO zum Puffersystem war erforderlich, da zur Lösung des Liganden ebenfalls 1.0 % DMSO benötigt wurden. Durch die Zugabe von 1 % DMSO zum Puffer wurde verhindert, dass es durch die unterschiedlichen Brechungsindizes zu Messfehlern kam. Nach der Durchführung einiger Vorversuche stellte sich heraus, dass sowohl Assoziation als auch Dissoziation der Bindungsreaktion mit langsamer Kinetik verliefen, sodass lange Zeiträume für die Interaktionsphasen gewählt werden mussten. Die gewählte Dissoziationszeit von 300s war nicht ausreichend, um die Chipoberfläche wieder vollkommen zu regenerieren. Nach einigen Versuchen zur Wahl der Regenerationsmethode wurde eine 20 s lange Injektion mit 50 mM Salzsäure gewählt, welche die Chipoberfläche vollständig regenerierte und gleichzeitig keine Inaktivierung zur Folge hatte. Zur Stabilisierung wurde nach der Regenerationsinjektion 60 s PBS-Puffer über die Messzellen geleitet.

### SPR-Studien zur Kinetik der Komplexbildung aus **B4D3** und **K18**

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation wurden eine Temperatur von 298 K sowie eine Prozedur gewählt, die nach Equilibrierung des Gerätes automatisch die Messreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchführte. Es wurden Konzentrationen von 0.1  $\mu\text{M}$  bis 30  $\mu\text{M}$  vermessen. Außerdem wurden zwei Messungen ohne Ligand durchgeführt. Die Antwort dieser reinen Pufferinjektion wurde bei der Auswertung der Messungen mit Ligand automatisch abgezogen.

Die Betrachtung der Sensorgramme zeigte, dass es bei Konzentrationen über 15  $\mu\text{M}$  zu unspezifischen Wechselwirkungen kam. Ähnliches wurde schon bei den STD NMR-Experimenten der Probe beobachtet. Deshalb wurden für die Auswertung nur die Konzentrationen bis 15  $\mu\text{M}$  herangezogen.

Die Evaluationssoftware lieferte die Möglichkeit, die Langmuir-Funktion an den Verlauf der Sensorgramme für Assoziation und Dissoziation anzugleichen. Daraus ergaben sich die maximal mögliche Antwort  $R_{\text{max}}$ , die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Assoziation  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$ , die Dissoziationskonstante  $K_D$  als Quotient beider Geschwindigkeitskonstanten und der Streuungswert  $\chi^2$  als Maß der Güte der Angleichung. Hierbei bietet die Software nicht nur die Möglichkeit einzelne Sensorgramme zu bewerten, sondern auch die Möglichkeit die Parameter mehrerer Konzentrationen global zu berechnen. Die folgende Abbildung 5-22 zeigt die Analysen zweier einzelner Sensorgramme sowie einer globalen Angleichung unter Berücksichtigung aller Konzentrationen bis 15.0  $\mu\text{M}$ . Bei der Darstellung der Sensorgramme sieht man, dass die Assoziationskurve nach fünf bis zehn Minuten ihren Sättigungswert erreicht. Nach 5 Minuten der Dissoziation erreichen die geringeren Konzentrationen wieder die Basislinie während die hohen Konzentrationen auf ca. die Hälfte des Sättigungswertes zurückfallen und erst durch die Regeneration mit 50 mM Salzsäure vollkommen auf die Basislinie zurückkehren. Die berechnete Geschwindigkeitskonstante der Assoziation liegt bei 250  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  während die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation auf  $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurde. Daraus ergab sich die Dissoziationskonstante von 6.1  $\mu\text{M}$ . Die maximal mögliche Antwort des Systems wurde mit 15.1 RU angegeben, wobei der Streuungswert  $\chi^2$  mit 0.52  $\text{RU}^2$  zufrieden stellend war.



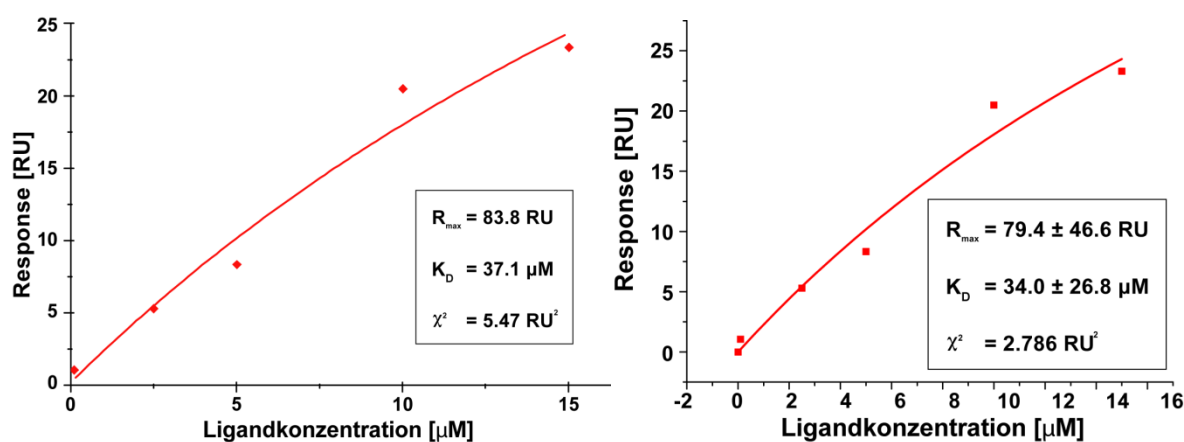
**Abbildung 5-22:** Darstellung der Sensorgramme für die Konzentration an B4D3 (von oben: 10.0  $\mu\text{M}$ , 15.0  $\mu\text{M}$  und 0.1 bis 15.0  $\mu\text{M}$ ), der fits der Langmuir-Funktion und der sich daraus ergebenden Werte für  $R_{\text{max}}$ ,  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

### Bestimmung der Dissoziationskonstante von B4D3 über die Sättigungswerte

Die zweite Möglichkeit, Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmonenresonanz zu bestimmen, ist die Auftragung der Sättigungswerte gegen die jeweilige Konzentration. Hierzu wird eine Angleichung des *one site binding*-Modells an die Datenpunkte durchgeführt. Die Evaluationssoftware erlaubt die Auswertung, wobei nicht die Möglichkeit gegeben ist, den Ursprung als Datenpunkt hinzuzufügen. Deshalb wurden die Datenpunkte zusätzlich mit Origin bewertet, wobei der Datenpunkt des Ursprungs hinzugefügt wurde. Bei beiden



Verfahren wurden nur die Konzentrationen bis 15  $\mu\text{M}$  betrachtet, um den Bereich von unspezifischen Wechselwirkungen nicht einzubeziehen. Die folgende Abbildung 5-23 zeigt den Vergleich beider Auswertemethoden, deren Ergebnisse nur wenig voneinander abwichen. Bei Nichtbeachtung des Ursprungs ist das Ergebnis für die Dissoziationskonstante 37.1  $\mu\text{M}$ , bei Beachtung des Ursprungs 34.0  $\mu\text{M}$ . Ähnlich geringe Unterschiede sind bei der maximalen Antwort des Systems  $R_{\text{max}}$  zu beobachten (83.8 und 79.4 RU), wobei sich der Streuungswert bei Beachtung des Ursprungs von 5.47  $\text{RU}^2$  auf 2.79  $\text{RU}^2$  fast halbiert. Die Verringerung des Fehlers auf fast die Hälfte zeigt, dass die Beachtung des Ursprungs legitim ist. Andererseits zeigt die nur geringe Abweichung der anderen Werte, dass in diesem Fall eine sinnvolle Auswertung auch ohne Beachtung des Ursprungs möglich ist.



**Abbildung 5-23:** Darstellung der Sättigungswerte verschiedener Konzentration an B4D3 und der Angleichung des one site binding-Modells unter Nichtberücksichtigung (links) bzw. Berücksichtigung (rechts) des Ursprungs als Datenpunkt und den daraus resultierenden Werten für  $R_{\text{max}}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

#### 5.3.4 Vergleich der Dissoziationskonstanten und Diskussion der Bindungsstudien von **B4D3** an das Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Tabelle 5.5 fasst die in den vorherigen Kapiteln bestimmten  $K_D$ -Werte noch einmal zusammen. Hier ist zu sagen, dass die Streuungswerte nur innerhalb einer Methode, STD NMR oder SPR, miteinander zu vergleichen sind.

Die Verbesserung der Angleichungen bei der Nutzung der STD NMR durch Reduktion der Datenpunkte auf geringe Konzentrationen, bei denen nur eine spezifische Wechselwirkung zu beobachten war, lieferte für die unterschiedlichen Protonen Dissoziationskonstanten von 3.97 bis 18.5  $\mu\text{M}$ . Hierbei ist eigentlich zu erwarten, dass das Proton mit dem größten STD-Effekt auch die geringste Dissoziationskonstante liefern sollte. Dies ist nicht der Fall. Die Dissoziationskonstante von 3.97  $\mu\text{M}$  ergab sich für Proton II, welches bei der Bestimmung des Bindungsepitops nur 45 % des normierten STD-Effekts lieferte und damit

bei der Beschreibung des Bindungsepitops nicht einbezogen genutzt wurde. Proton VI, welches den stärksten STD-Effekt zeigte, lieferte die Dissoziationskonstante von 18.5  $\mu\text{M}$ . Bei den durch die SPR erhaltenen Dissoziationskonstanten ist bei Betrachtung des Streuungswertes  $\chi^2$  davon auszugehen, dass die Auswertung der kinetischen Daten und der daraus resultierenden Dissoziationskonstante die besseren Werte zwischen 3.0 und 9.2  $\mu\text{M}$  liefert.

**Tabelle 5.5: Zusammenfassung der berechneten Dissoziationskonstanten des Komplexes aus K18 und B4D3.**

Methode	$K_D$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]	Streuungswert $\chi^2$
STD NMR - Sättigung	11.2	$3.0 \cdot 10^{-3}$
SPR - Kinetik	6.1	0.52 RU <sup>2</sup>
SPR - Sättigung	35.6	4.13 RU <sup>2</sup>

Die Dissoziationskonstanten, die durch STD NMR und SPR erhalten wurden, lassen sich sehr gut miteinander in Einklang bringen, vor allem wenn man bedenkt, dass es sich um zwei verschiedene Verfahren handelt. So ist die Dissoziationskonstante des Komplexes aus **K18** und **B4D3** mit 8.7  $\mu\text{M}$  anzugeben. Dieser Wert harmoniert mit den in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Mandelkow ermittelten  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{DC}_{50}$ -Werten (Inhibitions- bzw. Depolymerisationsvermögen;  $\text{IC}_{50} = 14.1 \mu\text{M}$ ;  $\text{DC}_{50} = 10.5 \mu\text{M}$ ). Hierbei muss natürlich bedacht werden, dass die Werte nicht mit der Dissoziationskonstante gleichzusetzen sind. Bei den  $\text{IC}_{50}$ - bzw.  $\text{DC}_{50}$ -Werten handelt es sich um die Konzentration, die zugegeben werden muss, um die Aggregation zur Hälfte zu stoppen bzw. die Hälfte der Aggregate zu depolymerisieren. Die Dissoziationskonstante ist hingegen eine Größe, welche den Gleichgewichtszustand beschreibt (s. Gleichung 4). Erfahrungsgemäß liegen die Werte in einem System jedoch häufig in der gleichen Größenordnung, was hier ebenfalls gegeben ist.

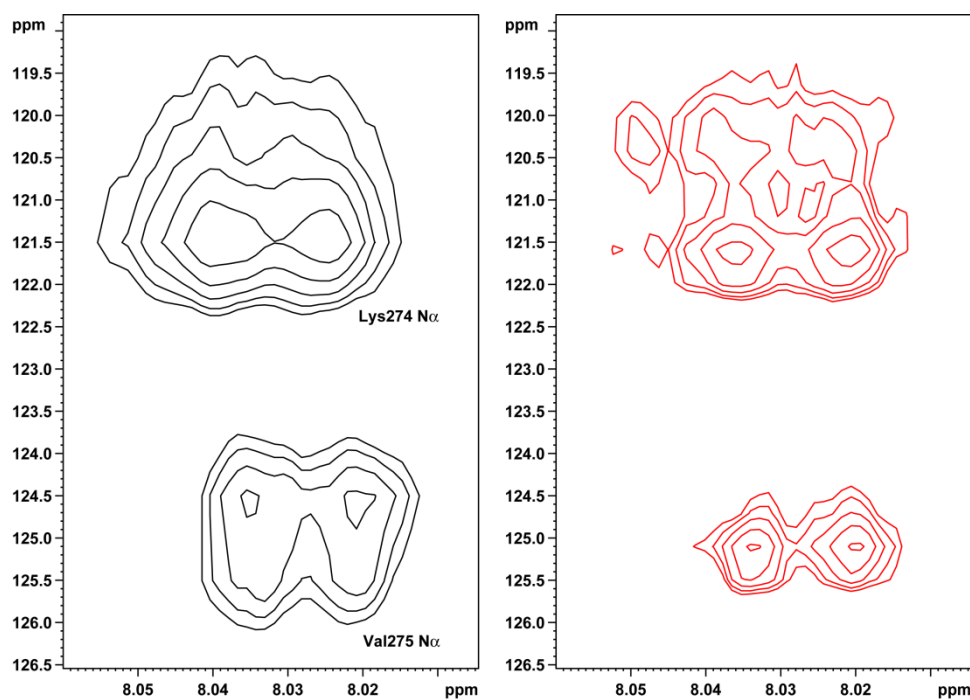
## 5.4 Bindungsstudien von B4D3 an t3a15N

Um zu untersuchen, ob die Substanz **B4D3** die Aggregation durch Interaktion am Bindungsmotiv <sup>272</sup>GGKVQIINKK<sup>281</sup> verhindert, wurde der Einfluss der Zugabe dieser Substanz auf das <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Spektrum des Peptids **t3a15N** untersucht.

### 5.4.1 <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Experiment zur Interaktionsanalyse des Inhibitors **B4D3** mit dem Peptid **t3a15N**

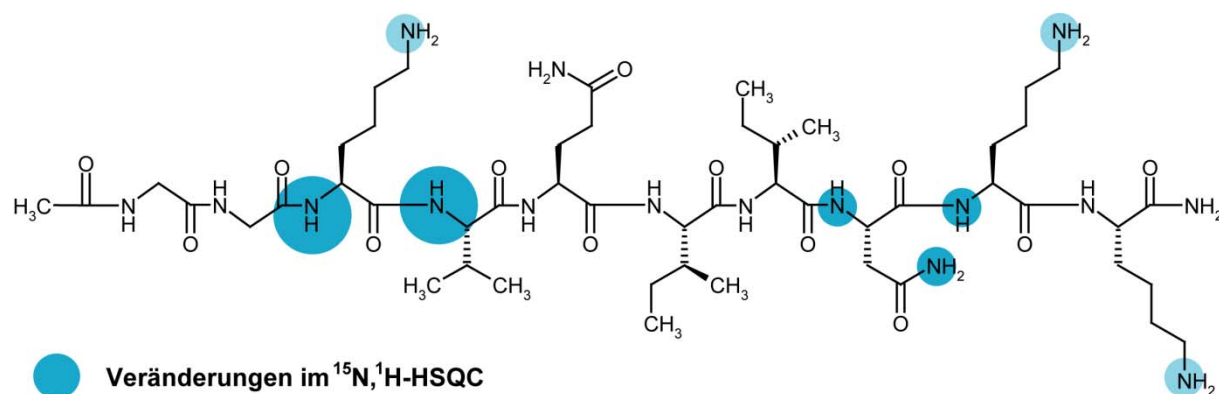
Die Experimente wurden bei 285 K an einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Probe wurde in PBS-Puffer (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O = 9:1) bei pH 7.2 angesetzt. Der Ligand **B4D3** wurde aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO-d<sub>6</sub> auf die Konzentration von 90  $\mu\text{M}$  eingestellt,

während das Peptid äquimolar als Feststoff zugegeben wurde. Als Referenzspektrum diente eine Probe, die ohne **B4D3** vermessen wurde. Die Veränderungen im Spektrum fielen geringer aus als die Veränderungen bei der Interaktion von Peptid mit Protein (s. Kapitel 5.2.6). Abbildung 5-24 zeigt den Ausschnitt des  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektrums, in dem die größten Veränderungen zu verzeichnen waren. Während direkt über dem Signal von Lys274  $\text{N}\alpha$  nach Zugabe des Inhibitors ein weiteres Signal erschien und sich das ursprüngliche Signalvolumen verringerte, kam es beim Val275  $\text{N}\alpha$  zu einer Verringerung der Linienbreiten und damit bei gleich bleibendem Volumen zur Erhöhung der Intensität. Die Veränderung der Linienbreiten war ebenfalls in sehr geringem Maße bei den Stickstoffatomen Lys280  $\text{N}\alpha$ , Asn279  $\text{N}\alpha$  und den entsprechenden Stickstoffatomen der Seitenketten zu sehen. Eine Erklärungsmöglichkeit dieses Verhaltens könnte z.B. eine Veränderung der Kinetik des NH-Austausches durch stattfindende Interaktion am betroffenen Stickstoffatom sein.



**Abbildung 5-24:** Darstellung eines Ausschnitts aus einem  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum des Peptids *t3a15N* vor (schwarz) und nach Zugabe der Substanz **B4D3** (rot,  $c_{t3a15N} = 90 \mu\text{M}$ ,  $c_{B4D3} = 90 \mu\text{M}$ , PBS-Puffer in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 9:1$ , pH 7,2,  $T = 285 \text{ K}$ ).

Wählt man die bereits aus den vorherigen Kapiteln bekannte Darstellung des Bindungsepitops, erhält man die folgende Abbildung 5-25.



*Abbildung 5-25: Grafische Darstellung der an der Bindung am B4D3 beteiligten Stickstoffatome des Peptids t3a15N. Die Größe der Kreise spiegelt die Einteilung der Effekte in geringen und starken Effekt wieder. Da die N $\zeta$ -Atome der drei Lysine nicht eindeutig zugeordnet wurden, ist die Deckkraft in der Abbildung verringert dargestellt.*

Bei Betrachtung der betroffenen Aminosäuren fällt auf, dass die Interaktion von Lys274 und Val275 auf der einen Seite und Asn279 und Lys280 auf der anderen Seite aus sterischen Gründen nicht von einem Molekül **B4D3** bewerkstelligt werden kann. Vielmehr ist davon auszugehen, dass zwei Moleküle **B4D3** die Aggregation verhindern oder, was noch wahrscheinlicher erscheint, die Wechselwirkung eines Moleküls mit Lys274 und Val275 zur Veränderung der Struktur und damit der chemischen Verschiebungen der anderen Aminosäuren am C-Terminus hervorrufen. Hierbei wäre z.B. vorstellbar, dass es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Seitenkette des Val275 und einem der aromatischen Ringe von **B4D3** und einer Wechselwirkung zwischen der Seitenkette des Lys274 und der Säurefunktion des **B4D3** kommt.

Der Vergleich der durch die Zugabe der Substanz **B4D3** bewirkten Veränderungen im  $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum des Peptids t3a15N mit den Veränderungen nach der Zugabe des Proteinkonstrukts zeigt, dass die Aggregation durch Wechselwirkungen am Bindungsmotiv inhibiert wird. Die im mittels STD NMR bestimmten Bindungsepitop wichtige hydrophobe Wechselwirkung der Aminosäure Val275 wird vermutlich durch **B4D3** gestört. Außerdem kommt es zur Veränderung der chemischen Umgebung in der Nähe der Aminosäure Lys274 und auch zu geringen Veränderungen an der Aminosäure Asn279, die im STD NMR-Experiment den stärksten Effekt zeigte.

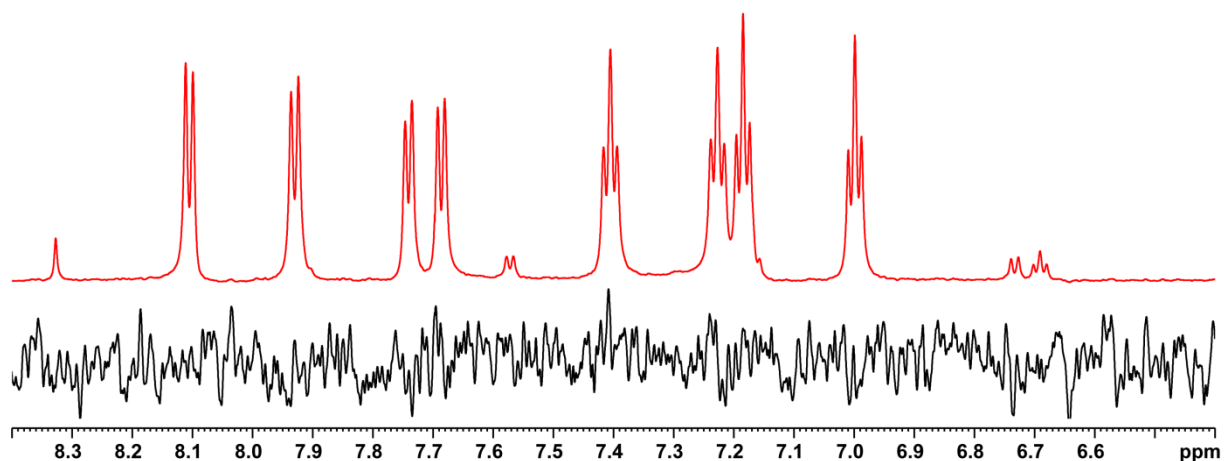
## 5.5 Bindungsstudien von B4A1 an das Tau-Proteinkonstrukt K18

### 5.5.1 STD NMR-Experimente mit B4A1 und dem Tau-Proteinkonstrukt K18

Die Experimente wurden bei 295 K an einem 700 MHz-Spektrometer mit cryogenem Probenkopf aufgenommen. Der Ligand wurde aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO- $d_6$  und das Proteinkonstrukt aus einer 3 mM-Stammlösung mit achtfachem Überschuss an DTT- $d_{10}$  in deuteriertem PBS-Puffer bei pH 7.2 auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Nach Wahl der Sättigungsparameter wurde zunächst das Bindungsepitop ermittelt und anschließend eine Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Komplexes durchgeführt.

#### Artefaktbestimmung des Liganden B4A1

Die STD NMR-Experimente der reinen Ligandprobe B4A1 zeigten keine bzw. nur sehr geringe Artefakte. Bei Wahl der gleichen Parameter wie in Kapitel 0 (Einstrahlpunkt 0.77 ppm, Sättigungszeit 4 s, Abschwächung 45 dB) waren bei der größtmöglichen Ligandenkonzentration von 250  $\mu$ M keine Signale des Liganden durch direkte Sättigung sichtbar. Die folgende Abbildung 5-26 zeigt den Vergleich von  $^1$ H-NMR-Spektrum und dem STD NMR-Spektrum des Liganden.



*Abbildung 5-26: Vergleich des aromatischen Bereichs eines  $^1$ H-Spektrums (off resonance, rot, 50fach verkleinert) mit dem STD NMR-Spektrum (schwarz) einer Probe mit B4A1 ( $c = 250 \mu$ M, PBS in  $D_2O$ , pH 7.2, 2.5 % DMSO- $d_6$ ,  $T = 295$  K).*

#### Bestimmung des Bindungsepitops von B4A1

Zur Bestimmung des Bindungsepitops wurde ein STD-Spektrum einer Probe bestehend aus 5  $\mu$ M Proteinkonstrukt und 250  $\mu$ M B4A1 verwendet (50facher Ligandenüberschuss). Das

STD-Spektrum zeigte deutliche STD-Effekte für alle Protonen von 3.01 bis 1.63 %, die in der folgenden Abbildung 5-27 im Vergleich zum  $^1\text{H}$ -Spektrum dargestellt sind.

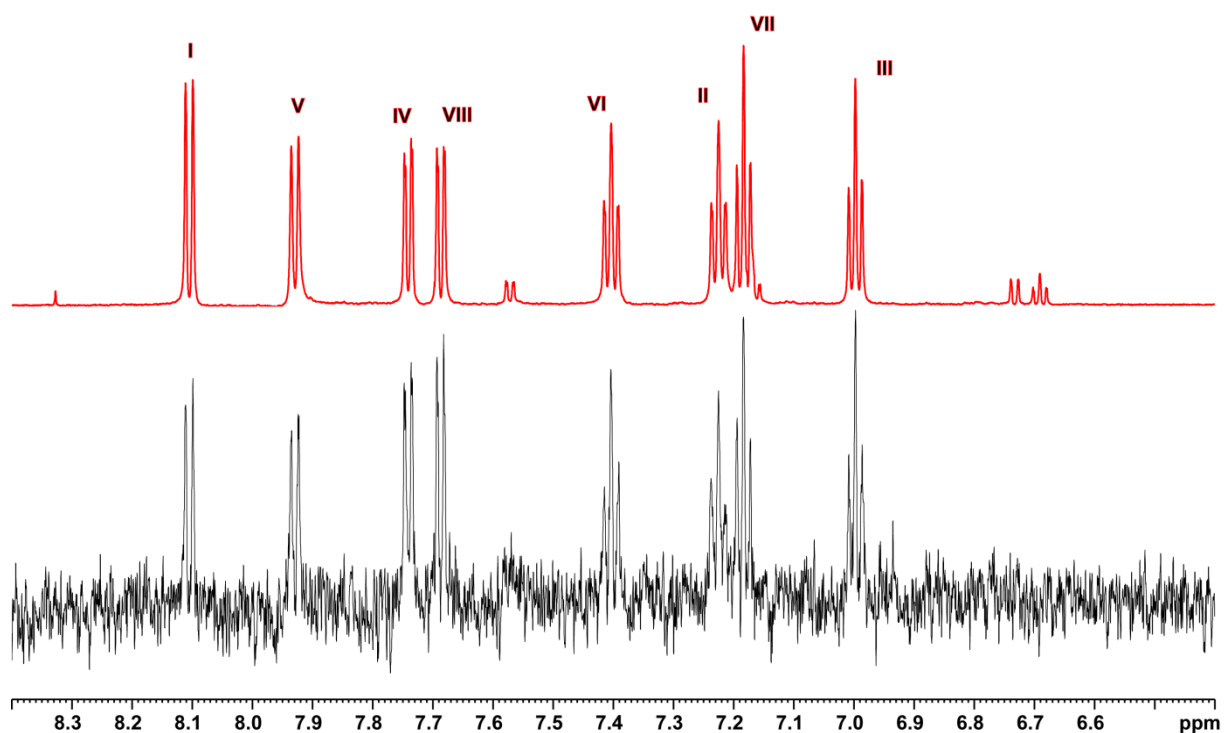


Abbildung 5-27: Vergleich eines  $^1\text{H}$ -Spektrums (off resonance, rot, 50fach verkleinert) mit dem STD NMR-Spektrum (schwarz) einer Probe mit B4A1 und Protein K18 ( $c_{\text{B4A1}} = 250 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{K18}} = 5 \mu\text{M}$ , PBS in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.2, 2.5 %  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $T = 295 \text{ K}$ ). Zuordnung der Signale s. Abbildung 5-28.

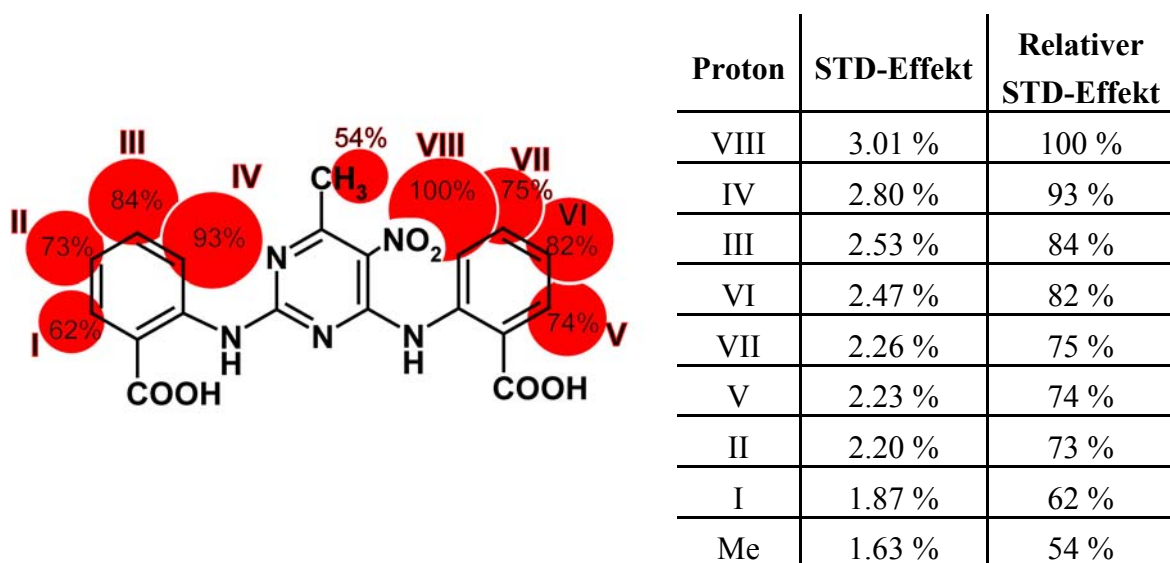


Abbildung 5-28 und Tabelle 5.6: Darstellung des Bindungssepitops von B4A1 mit allen beteiligten Protonen (Größe der Kreise proportional zum STD-Effekt).

Die STD-Effekte wurden auf das größte Signal (Proton VIII) auf 100 % normiert. Die grafische Darstellung der an der Bindung beteiligten Protonen mit den zugehörigen, ermittelten STD-Effekten ergibt das in Abbildung 5-28 dargestellte Bindungssepitop.

### Bestimmung der Dissoziationskonstante von **B4A1**

Um die Dissoziationskonstante des Komplexes aus **B4A1** und **K18** zu bestimmen, wurden anschließend wieder STD NMR-Spektren mit steigender Ligandenkonzentration aufgenommen. Ausgehend von einer Probe mit 2  $\mu\text{M}$  Protein wurde der Überschuss an Ligand von fünffach bis 50fach sukzessive erhöht. Die Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors der einzelnen Protonen gegen die gewählte Ligandenkonzentration ergab eine Kurve, die sich nach dem *one site binding*-Modell beschreiben lässt. Es ist erkennbar, dass die Datenpunkte auf der charakteristischen Krümmung eines durch spezifische Wechselwirkungen beschriebenen Systems liegen. Die auf der folgenden Seite in Abbildung 5-29 dargestellten Angleichungen liefern für die einzelnen Protonen Dissoziationskonstanten zwischen 7.49 und 96.8  $\mu\text{M}$ .

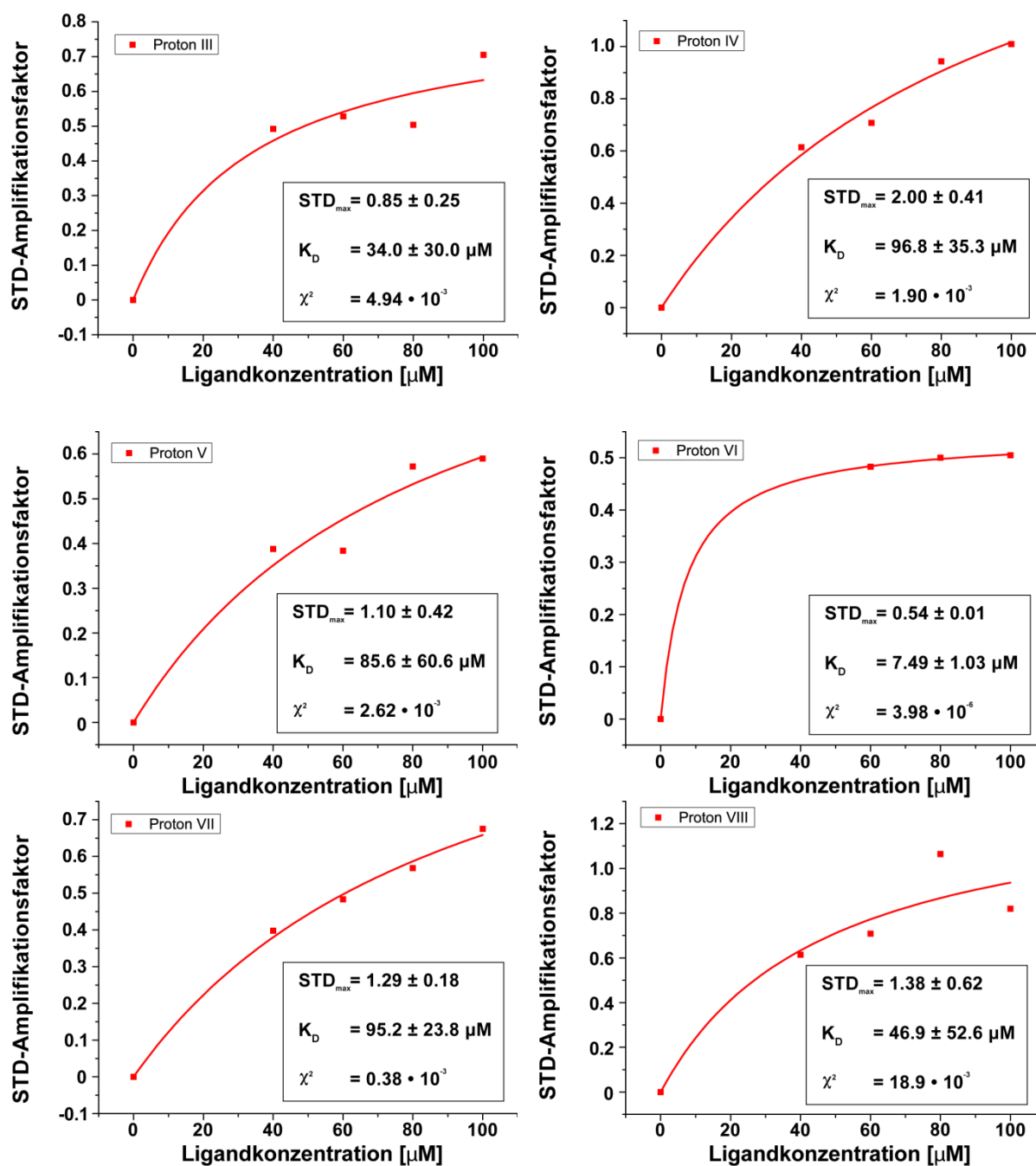


Abbildung 5-29: Darstellung der Datenpunkte von sechs Protonen, den daran angelegten Funktionen und den resultierenden Werten für  $STD_{\max}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

### 5.5.2 SPR-Experimente von **B4A1** an das Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Die Interaktion von **B4A1** an **K18** wurde ebenfalls mittels Oberflächenplasmonenresonanz untersucht. Dafür wurden der gleiche mit **K18** belegte CM5-Chip und die gleichen Mess- und Pufferbedingungen aus Kapitel 5.3.3 genutzt. Die Vorversuche zeigten, dass Assoziation und Dissoziation des Komplexes ebenfalls langsam verlaufen. Entsprechend wurden lange Zeiträume für die Interaktionen gewählt. Versuche zur Wahl der Regenerationsmethode zeigten, dass zwei 20 s lange Injektionen mit 50 mM Salzsäure und einer anschließenden 60 s

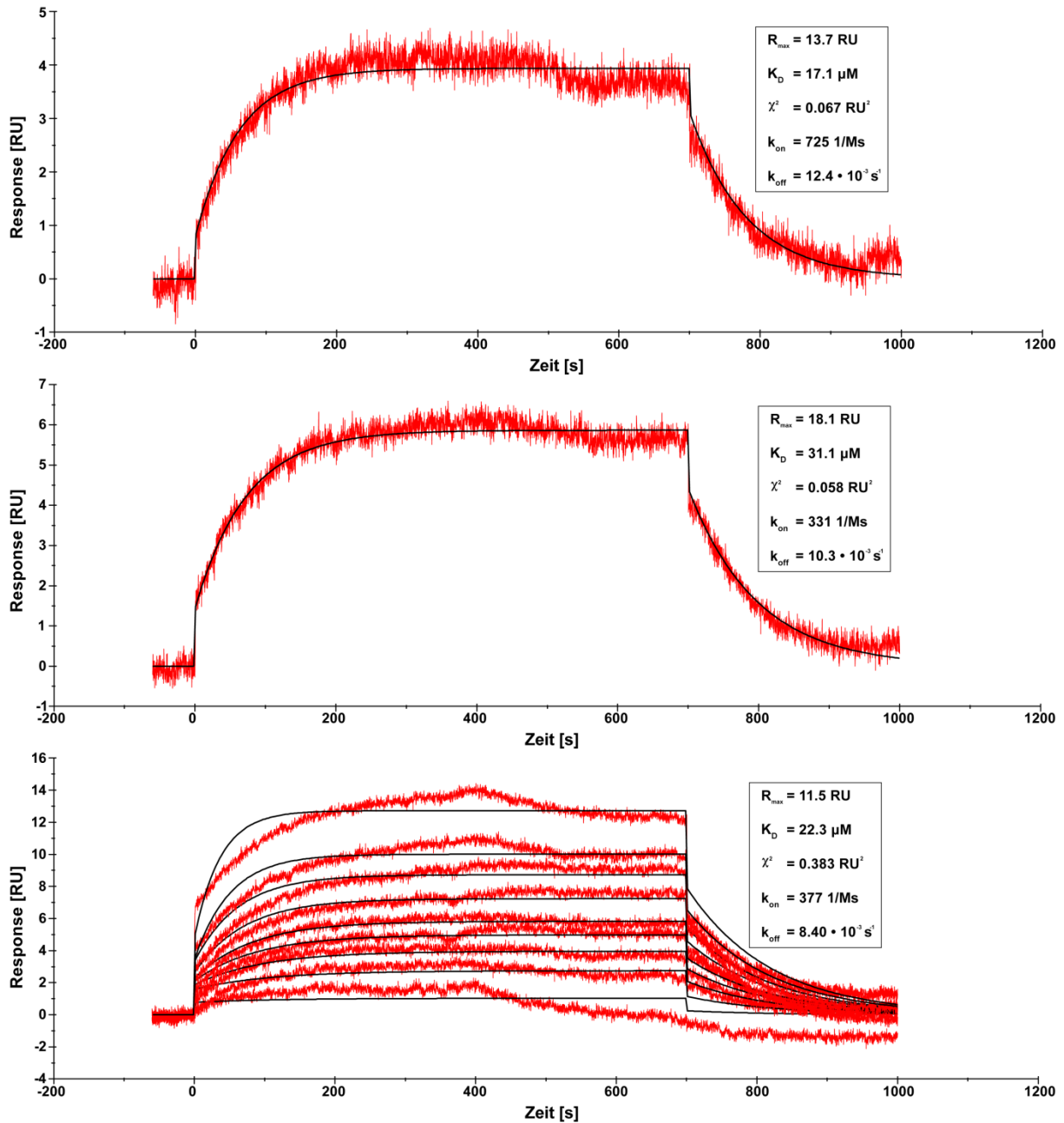


langen Stabilisierungsperiode geeignet waren, um die Chipoberfläche vollständig zu regenerieren, ohne dass dies zur Inaktivierung des Proteins führte.

### SPR-Studien zur Kinetik der Komplexbildung aus **B4A1** und **K18**

Die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation wurden bei 298 K mit unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 0.5  $\mu\text{M}$  bis 50.0  $\mu\text{M}$  vermessen. Außerdem wurden zwei Messungen ohne Ligand durchgeführt, um die reinen Pufferinjektionen bei der Auswertung der Messungen mit Ligand zu berücksichtigen.

Die Betrachtung der Sensorgramme zeigte spezifische Wechselwirkungen für den gesamten Konzentrationsbereich. Die auf der folgenden Seite gezeigte Abbildung 5-30 zeigt die mit der Evaluationssoftware durchgeführten Angleichungen der Langmuir-Funktion an die Sensorgramme exemplarisch für zwei einzelne Konzentrationen und als globale Angleichung an alle gemessenen Konzentrationen. Die Sensorgramme zeigten, dass die Assoziationskurve nach zwei bis drei Minuten ihren Sättigungswert erreicht. Die Dissoziationskurven der höheren Konzentrationen erreichten in der angegebenen Zeit die Basislinie nicht. Dies wurde erst durch die Regeneration mittels 50 mM Salzsäure erreicht. Die berechnete Geschwindigkeitskonstante der Assoziation lag bei 444  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  während die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation mit  $9.57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurde. Daraus ergab sich eine Dissoziationskonstante von 29.3  $\mu\text{M}$ . Die maximal mögliche Antwort des Systems wurde mit 16.7 RU angegeben, wobei die Streuungswerte  $\chi^2$  mit 0.058  $\text{RU}^2$  bei der Angleichung der Messung bei 10  $\mu\text{M}$  und 0.383  $\text{RU}^2$  bei der globalen Angleichung zufrieden stellend war.

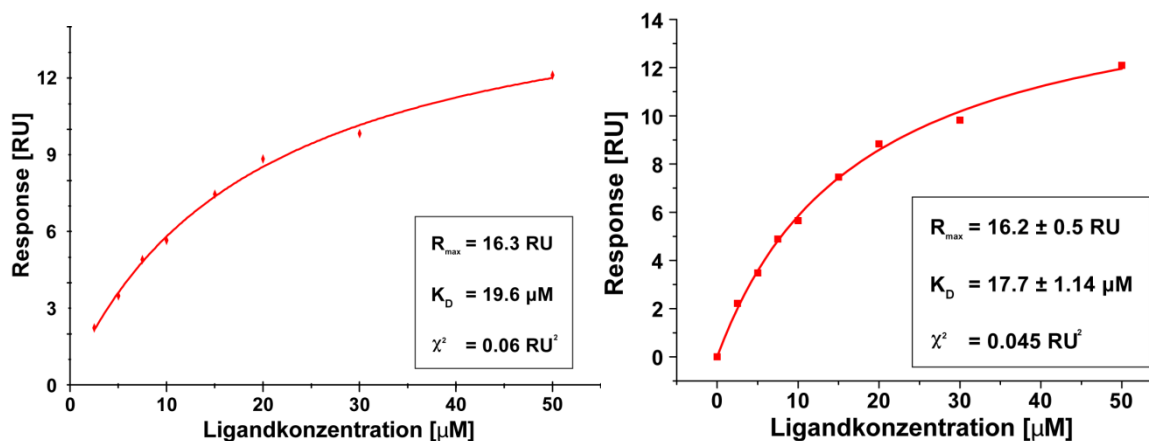


**Abbildung 5-30:** Darstellung der Sensorgramme für die Konzentration an B4A1 (von oben: 5.0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 0.5 bis 50.0  $\mu\text{M}$ ), der fits der Langmuir-Funktion und der sich daraus ergebenden Werte für  $R_{max}$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

### Bestimmung der Dissoziationskonstante von B4A1 über die Sättigungswerte

Auch für die Substanz B4A1 wurde die Dissoziationskonstanten mittels Auftragung der Sättigungswerte gegen die jeweilige Konzentration und Angleichung des *one site binding*-Modells an die Datenpunkte bestimmt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit und ohne Berücksichtigung des Ursprungs als Datenpunkt. Die folgende Abbildung 5-31 zeigt den Vergleich beider Auswertungen, deren Ergebnisse nur wenig voneinander abweichen. Bei Nichtbeachtung des Ursprungs ist das Ergebnis für die Dissoziationskonstante 19.6  $\mu\text{M}$ , bei

Beachtung des Ursprungs 17.7  $\mu\text{M}$ . Bei der maximalen Antwort des Systems  $R_{\text{max}}$  ist der Unterschied mit 16.3 bzw. 16.2 RU sogar noch geringer. Der Streuungswert variiert zwischen 0.055  $\text{RU}^2$  und 0.045  $\text{RU}^2$ . Die sehr geringe Abweichung beider Methoden zeigt wieder, dass eine Beachtung des Ursprungs als Datenpunkt legitim aber nicht zwingend notwendig ist.



**Abbildung 5-31:** Darstellung der Sättigungswerte verschiedener Konzentrationen an B4A1 und der Angleichung des one site binding-Modells unter Nichtberücksichtigung (links) bzw. Berücksichtigung (rechts) des Ursprungs als Datenpunkt und den daraus resultierenden Werten für  $R_{\text{max}}$ ,  $K_D$  und  $\chi^2$ .

### 5.5.3 Vergleich der Dissoziationskonstanten und Diskussion der Bindungsstudien von **B4A1** an das Tau-Proteinkonstrukt **K18**

Die folgende Tabelle 5.7 fasst die in den vorherigen Kapiteln bestimmten  $K_D$ -Werte des Komplexes aus **K18** und **B4A1** noch einmal zusammen. Es sind wieder nur die Streuungswerte innerhalb einer Methode, STD NMR oder SPR, miteinander zu vergleichen.

Die Angleichung des one site binding-Modells an die Datenpunkte bestehend aus „STD-Amplifikationsfaktor“ gegen „Konzentration an Ligand“ ergab für die unterschiedlichen Protonen Dissoziationskonstanten von 7.49 und 96.8  $\mu\text{M}$ . Hierbei lieferte, wieder unerwartet, das Proton mit dem größten STD-Effekt nicht die geringste Dissoziationskonstante von 7.49  $\mu\text{M}$ . Die geringste Dissoziationskonstante stammt von Proton VI, das 82 % des normierten STD-Effekts zeigt. Proton VIII mit dem größten STD-Effekt liefert 46.9  $\mu\text{M}$ . Hierbei ist aber festzustellen, dass die höheren Dissoziationskonstanten mit größeren Fehlerraten behaftet sind und die geringere Dissoziationskonstante zutreffender ist. Dies passt auch zu dem mittels SPR bestimmten Wert, der bei 29.3  $\mu\text{M}$  liegt. Die Streuung zeigt, dass die Berechnung mittels Angleichung des one site binding-Modells an die Sättigungswerte bessere Werte liefert als die Analyse der Kinetik.

**Tabelle 5.7: Zusammenfassung der berechneten Dissoziationskonstanten des Komplexes aus K18 und B4A1.**

Methode	K <sub>D</sub> -Wert [μM]	Streuungswert $\chi^2$
STD NMR - Sättigung	7.49	$4.0 \cdot 10^{-6}$
SPR - Kinetik	29.3	0.22 RU <sup>2</sup>
SPR - Sättigung	18.7	0.05 RU <sup>2</sup>

Die durch STD NMR und SPR erhaltenen Dissoziationskonstanten lassen sich wieder sehr gut in Deckung bringen. So ist die Dissoziationskonstante des Komplexes aus **K18** und **B4A1** mit 18.5 μM anzugeben. Dieser Werte passt gut zu den in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Mandelkow ermittelten IC<sub>50</sub>- und DC<sub>50</sub>-Werten (IC<sub>50</sub> = 9.73 μM; DC<sub>50</sub> = 4.61 μM).

## 5.6 Bindungsstudien von B4A1 an t3a15N

Auch für den Inhibitor **B4A1** wurde untersucht, ob er die Aggregation durch Interaktion am Bindungsmotiv <sup>272</sup>GGKVQIINKK<sup>281</sup> verhindert. Dazu wurde der Einfluss auf das <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Spektrum des Peptids **t3a15N** bewertet.

### 5.6.1 <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Experiment zur Interaktionsanalyse des Inhibitors **B4A1** mit dem Peptid **t3a15N**

Die Experimente erfolgten bei 285 K an einem 500 MHz-Spektrometer. Die Probe wurde in PBS-Puffer (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O = 9:1) bei pH 7.2 angesetzt. Der Ligand **B4A1** wurde aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO-d<sub>6</sub> auf die gewünschte Konzentration von 90 μM eingestellt während das Peptid äquimolar als Feststoff zugegeben wurde. Als Referenzspektrum diente eine Probe die ohne **B4D3** vermessen wurde. Auch hier waren die Veränderungen im Spektrum sehr gering. Abbildung 5-32 zeigt den Ausschnitt des <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Spektrums, in dem die größten Veränderungen zu verzeichnen waren. Es sind ähnliche Veränderungen wie bei der Zugabe des anderen Inhibitors **B4D3** sichtbar (siehe Kapitel 5.4.1). Es erscheint ein weiteres Signal über dem Lys274 Nα-Signal bei Verringerung des ursprünglichen Signalvolumens und Verringerung der Linienbreite bei Val275 Nα. In geringem Maße ist diese Veränderungen auch am Stickstoffatom Asn279 Nα und den Stickstoffatomen der Seitenketten zu sehen.

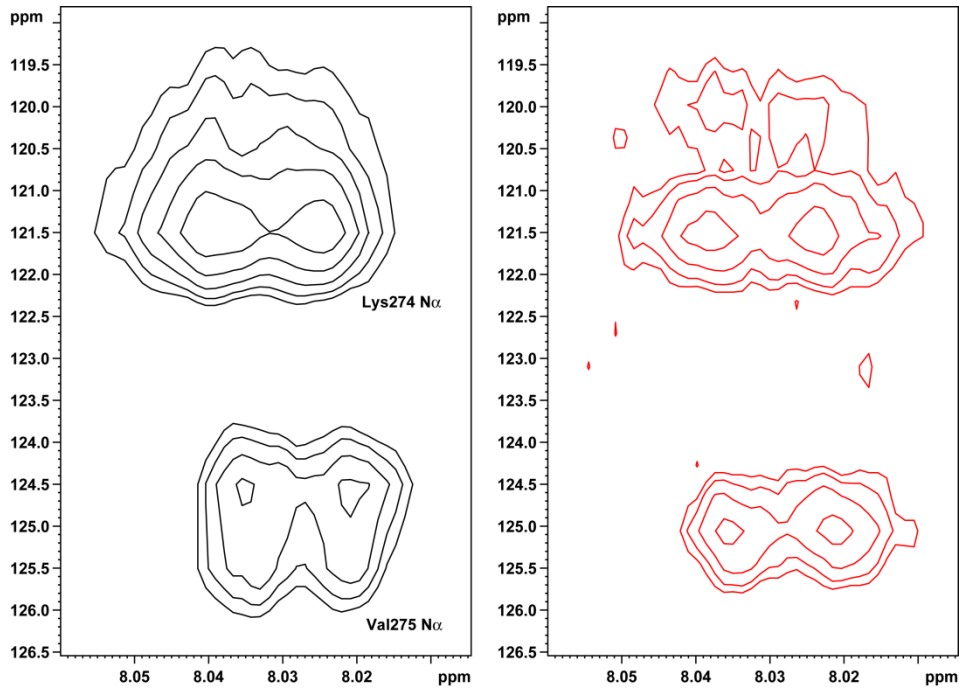


Abbildung 5-32: Darstellung eines Ausschnitts aus einem  $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum des Peptids  $t3a15\text{N}$  vor (schwarz) und nach Zugabe der Substanz **B4A1** (rot,  $c_{t3a15\text{N}} = 90 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{B4A1}} = 90 \mu\text{M}$ , PBS-Puffer in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 9:1$ , pH 7.2,  $T = 285 \text{ K}$ ).

Auch in diesem Fall konnte ein Bindungsepitop dargestellt werden (Abbildung 5-33). Die Hemmung der Aggregation durch **B4A1** scheint ähnlich zu verlaufen wie bei der Substanz **B4D3** (s. Kapitel 5.4.1).

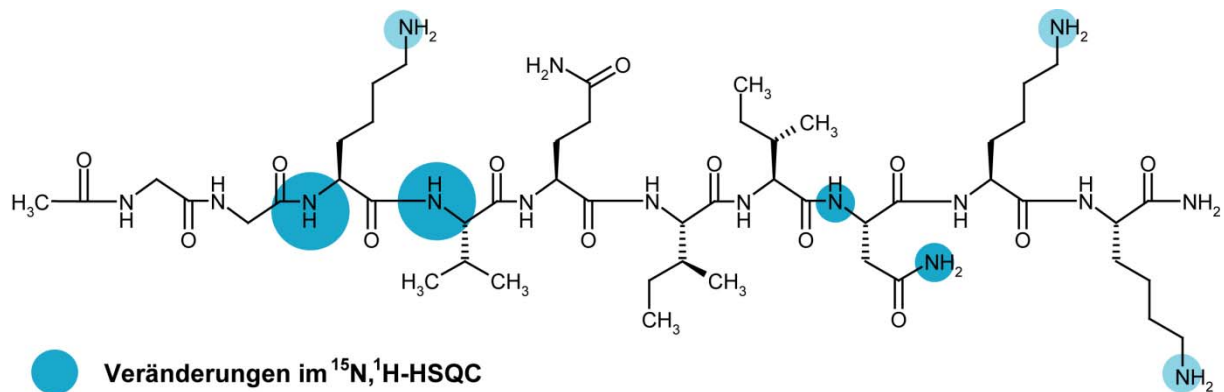


Abbildung 5-33: Grafische Darstellung der an der Bindung am **B4A1** beteiligten Stickstoffatome des Peptids  $t3a15\text{N}$ . Die Größe der Kreise spiegelt die Einteilung der Effekte in geringen und starken Effekt wieder. Da die  $\text{N}\zeta$ -Atome der drei Lysine nicht eindeutig zugeordnet wurden, ist die Deckkraft in der Abbildung verringert dargestellt.

Auch hier scheint die direkte Interaktion mit dem Bindungsmotiv zur Aggregationshemmung zu führen. Hierbei wird ebenfalls die wichtige hydrophobe Wechselwirkung der Aminosäure Val275 beeinflusst. Es kommt auch zu geringen Veränderungen in der Nähe der Aminosäure

Lys274 und an der Aminosäure Asn279, die im STD NMR-Experiment den stärksten Effekt zeigte. Der Unterschied ist, dass keine Veränderung am Lys280  $N\alpha$  zu detektieren ist. Die Veränderungen an Lys274 und Val275 mit den geringer ausfallenden Veränderungen am C-Terminus lassen einen ähnlichen Bindungsmodus vermuten, bei dem ebenfalls die hydrophoben Wechselwirkungen zum Val275 und die ionischen Wechselwirkungen zum Lys274 wichtig zu sein scheinen.

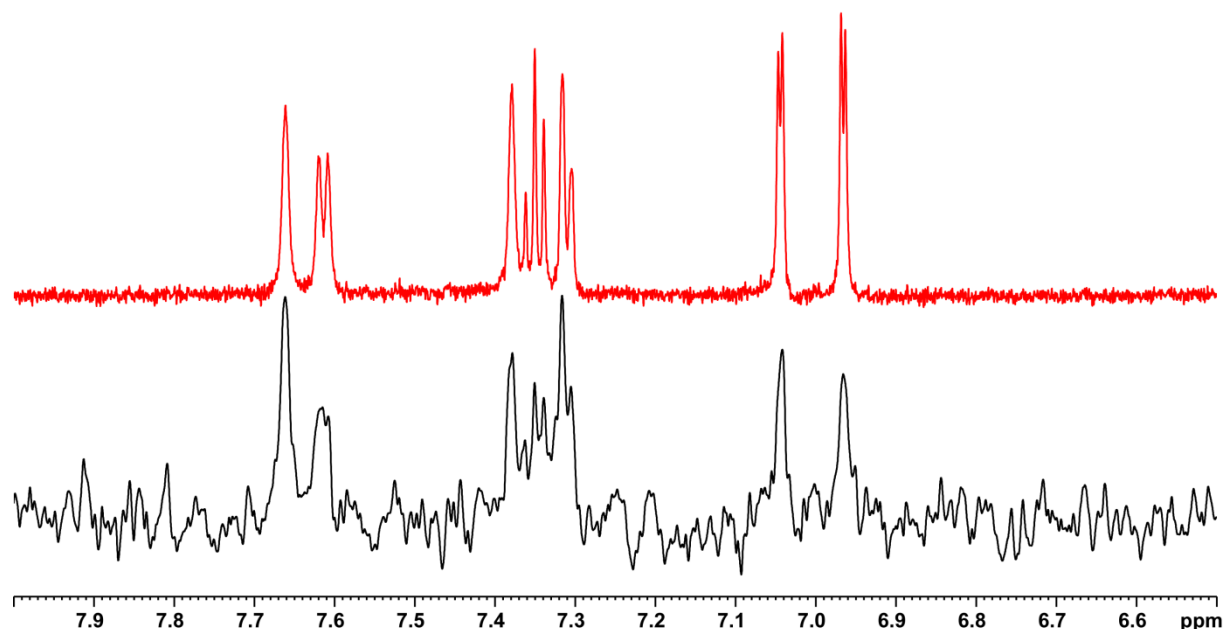
## 5.7 Bindungsstudien von **bb-5** an das Tau-Proteinkonstrukt **K18**

### 5.7.1 STD NMR-Experimente von **bb-5** an **K18**

Die Experimente wurden bei 295 K an einem 700 MHz-Spektrometer mit cryogenem Probenkopf aufgenommen. Der Ligand wurde aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO- $d_6$  und das Proteinkonstrukt aus einer 3 mM-Stammlösung mit achtfachem Überschuss an DTT- $d_{10}$  in deuteriertem PBS-Puffer bei pH 7.2 auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Nach Wahl der Sättigungsparameter sollte zunächst das Bindungs epitop ermittelt und anschließend eine Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Komplexes durchgeführt werden.

#### Artefaktbestimmung des Liganden **bb-5**

Die STD NMR-Experimente der reinen Ligandprobe **bb-5** zeigten relativ starke Artefakte.



**Abbildung 5-34:** Vergleich des aromatischen Bereichs eines  $^1H$ -Spektrums (off resonance, rot, 25fach verkleinert) mit dem STD NMR-Spektrum (schwarz) einer Probe mit **bb5** ( $c = 100 \mu M$ , PBS in  $D_2O$ , pH 7.2, 1.0 % DMSO- $d_6$ ,  $T = 295 K$ ).

Bei Wahl der Parameter Einstrahlpunkt 0.77 ppm, Sättigungszeit 4 s und Abschwächung 45 dB waren bei der größtmöglichen Ligandenkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  z.B. 4 % Artefaktsignal sichtbar (Abbildung 5-34).

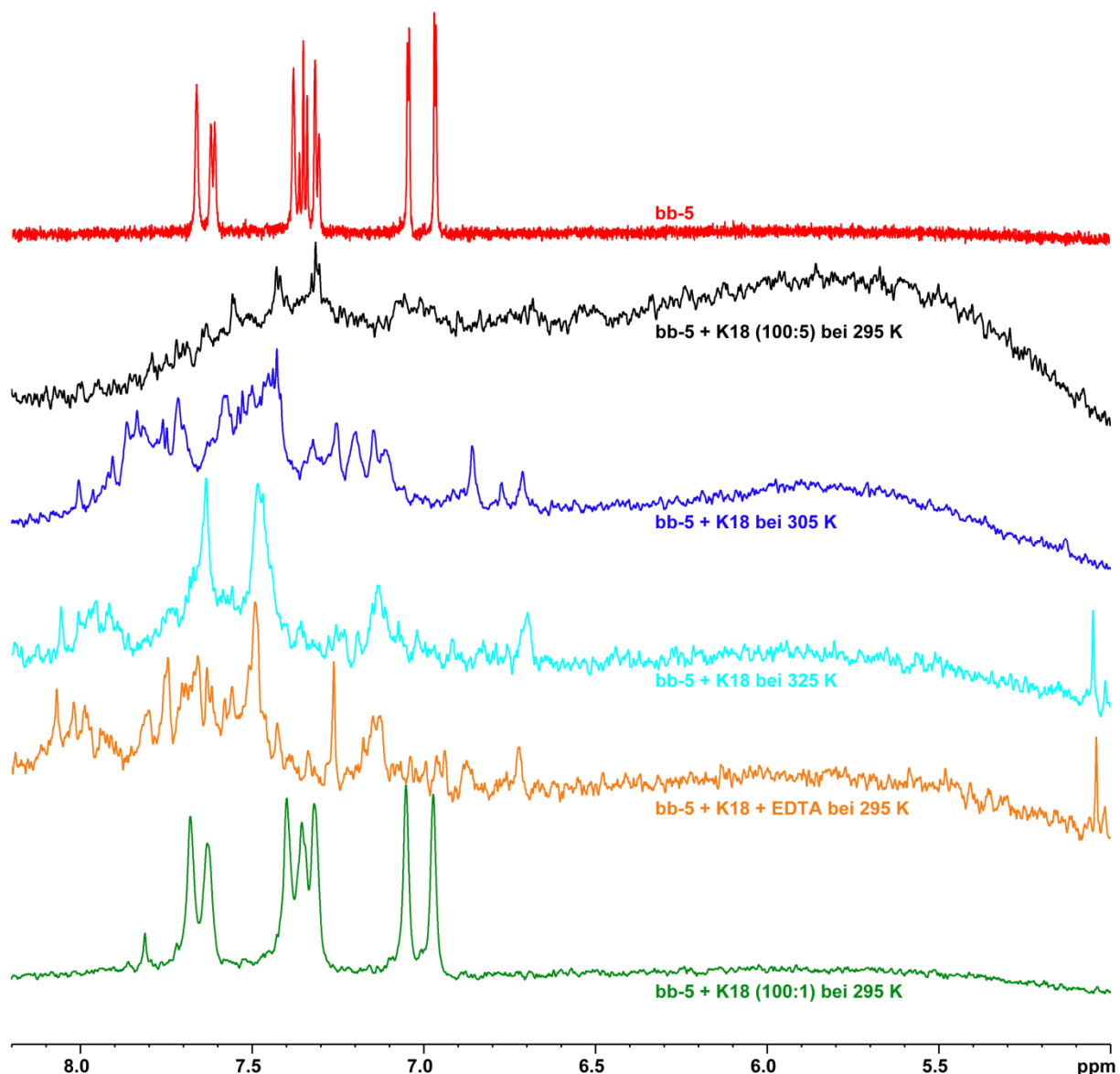
### Versuch der Bestimmung eines Bindungsepitops von **bb-5**

Die anschließenden STD NMR-Experimente konnten nicht wie geplant durchgeführt werden. Zwar waren Sättigungseffekte zu beobachten, doch durch die Zugabe des Proteinkonstruktes kam es auch im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu so starker Linienverbreiterung, dass keine Auswertung durchgeführt werden konnte.

Die erste Vermutung war, dass eine zu langsame Kinetik Grund für die Linienverbreiterung sein könnte. Die Erhöhung der Temperatur auf 305 und 325 K zeigte jedoch keinen ausreichenden Effekt.

Die zweite Vermutung war, dass die Probe mit Metallionen kontaminiert sein könnte, welche mit dem Liganden komplexieren und damit zu einer Linienverbreiterung führen könnten. Die Zugabe von perdeutertem EDTA führte auch zu keiner ausreichenden Verringerung der Linienbreiten.

Der letzte Erklärungsversuch war die Annahme, dass der Ligand nicht äquimolar an das Proteinkonstrukt bindet, so dass der eingestellte Überschuss nicht der Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen entsprechend gewählt wurde. Deshalb wurde bei gleich bleibender Ligandenkonzentration die Proteinkonstruktkonzentration auf 1/5 verringert, was eine Veränderung des Überschusses von 1:20 auf 1:100 bedeutete. Dies führte zur deutlichen Verringerung der Linienbreiten, so dass die Signale der einzelnen Protonen separiert vorlagen. Die folgende Abbildung 5-35 zeigt die Auswahl der durchgeführten Veränderungen, um dem Effekt der Linienverbreiterung nach der Zugabe des Proteins entgegenzuwirken, im Vergleich zu einem Spektrum der reinen Ligandenprobe.

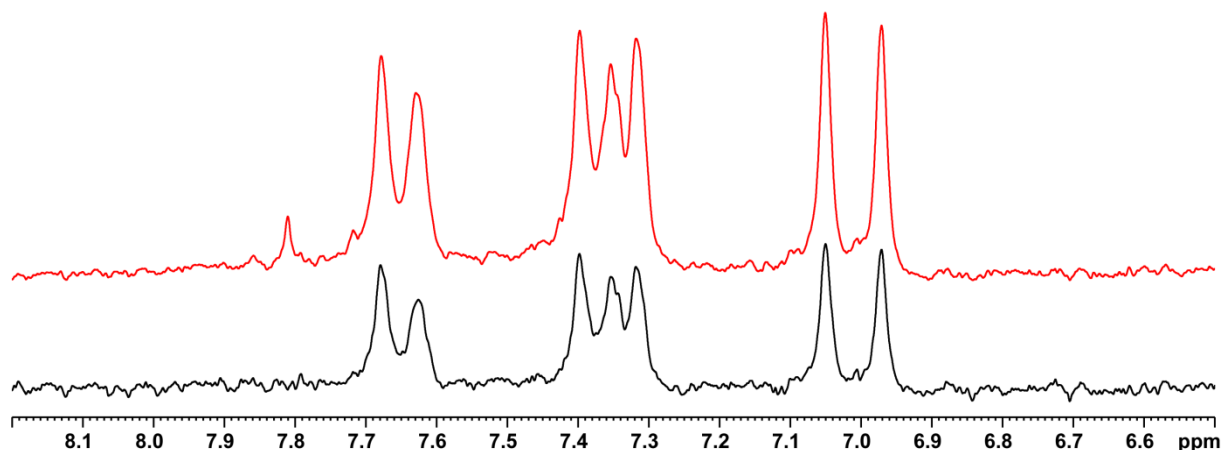


**Abbildung 5-35 (von oben):  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer Probe mit bb-5 (rot,  $c_{\text{bb-5}} = 100 \mu\text{M}$ , PBS in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.2, 1.0 % DMSO- $d_6$ , 295 K), nach Zugabe von K18 (schwarz,  $c_{\text{K18}} = 5 \mu\text{M}$ , 295 K), bei 305 K (blau), bei 325 K (türkis), nach Zugabe von EDTA- $d_{16}$  (orange,  $c_{\text{EDTA}} = 150 \mu\text{M}$ , 295 K) und nach Verringerung der Proteinkonzentration (grün,  $c_{\text{K18}} = 1 \mu\text{M}$ , 295 K).**

Nachdem durch die Verringerung der Proteinkonzentration der Überschuss an Ligand vergrößert und damit das Problem der Linienverbreiterung verringert worden war, konnten die eigentlichen STD NMR-Experimente durchgeführt werden. Abbildung 5-36 zeigt den Vergleich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums mit dem STD NMR-Spektrum. Der STD-Effekt ist zwar mit 57 % sehr groß, jedoch sind alle Signale gleich stark. Dies ist normalerweise bei spezifischen Wechselwirkungen nicht der Fall, da es praktisch unmöglich ist, dass alle Protonen des Liganden die gleiche Sättigung vom Protein erfahren. Dafür müssten alle Protonen in hundertprozentig gleicher chemischer Umgebung in der Bindungstasche in



gleichen Abständen vorliegen. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um unspezifische Wechselwirkungen des Liganden mit der Proteinoberfläche handelt.



**Abbildung 5-36:** Vergleich eines  $^1\text{H}$ -Spektrums (off resonance, rot) mit dem STD NMR-Spektrum (schwarz) einer Probe mit **bb-5** und mit Protein **K18** ( $c_{\text{bb-5}} = 100 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{K18}} = 1 \mu\text{M}$ , PBS in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7.2, 1.0 % DMSO- $d_6$ ,  $T = 295 \text{ K}$ ).

### 5.7.2 Diskussion der Bindungsstudien von **bb-5** an **K18**

Für die Substanz **bb-5** konnte leider mittels STD NMR keine spezifische Wechselwirkung zum Proteinkonstrukt **K18** nachgewiesen werden. Dies ist bedauerlich, da die in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Mandelkow ermittelten  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{DC}_{50}$ -Werte ( $\text{IC}_{50} = 0.90 \mu\text{M}$ ;  $\text{DC}_{50} = 0.11 \mu\text{M}$ ) viel versprechend waren. Somit bleibt offen, ob das Inhibitions- und Depolymerisationsvermögen auf unspezifischen Wechselwirkungen beruht oder die Wechselwirkungen vielleicht doch außerhalb der *repeat*-Regionen stattfinden. Da keine Wechselwirkungen im STD NMR detektierbar waren, wurden keine SPR Experimente durchgeführt.

## 5.8 Ausblick

Außer den schon untersuchten Substanzen stehen noch eine Reihe weiterer Inhibitoren zur Verfügung, die ebenfalls ein starkes Inhibitions- bzw. Depolymerisationsvermögen besitzen.

Die schon erhaltenen Informationen über die Bindungsepitope können genutzt werden, um neue, potentere Inhibitoren zu entwickeln. Besonders der Benzoesäurering erwies sich in den STD NMR-Studien als wichtiges Strukturmerkmal. Das in para-Stellung gelegene Chloratom könnte z.B. substituiert werden und die weiteren Reste gegen andere Ringsysteme ausgetauscht werden.

Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Mandelkow stehen außerdem noch Proteinkonstrukte zur Verfügung, die durch eingeführte Mutationen stärker oder geringer zur Aggregation neigen. Hier ist z.B. die FTDP-17 Mutation zu nennen. Bei ihr kommt es zu einer Substitution des wichtigen Asn279 gegen Lysin. Diese Mutante zeigt ein stark erhöhtes Aggregationspotenzial. Eine Untersuchung mit diesen Proteinkonstrukten kann noch mehr Informationen zum Verständnis der Nukleation und damit der anschließenden Aggregation liefern. Hier kann sowohl die Interaktion mit den Substanzen aber auch zu den minimalen Bindungsmotiven noch weiter untersucht werden.

Die Phosphorylierung des Tau-Proteins an den vier KXGS-Motiven der *repeat*-Regionen durch die MARK-Kinasen trägt eine sehr wichtige Rolle in der Störung des Gleichgewichts zu den Mikrotubuli und der anschließenden Aggregation. Die Untersuchung dieser Phosphorylierungsmotive, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der untersuchten Bindungsmotive befinden, mittels STD NMR-spektroskopischer Experimente und SPR-Untersuchungen könnte weitere wichtige Erkenntnisse liefern.

Der Einfluss der Glycosylierungen am Tau-Protein wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet. Die Untersuchung der Proteinsequenz auf potentielle Glycosylierungsstellen und ihr Einfluss auf das Aggregationsvermögen sind ebenfalls von großem Interesse. Auch hier sind noch weitere Studien nötig.

Die Veränderungen der Kinetik durch polyanionische Verbindungen kann mittels SPR-Experimente genauer untersucht werden. So wäre der Einfluss der Zugabe Heparins zum Puffersystem auf die Kinetik aller untersuchten Interaktionen von großem Interesse, da es vielleicht den physiologischen Systemen näher kommt.

Es könnte auch weiterhin versucht werden, die dreidimensionale Struktur des Peptids im Komplex zu bestimmen. Ausgehend von einer pH-neutralen Probe, die Peptid, Protein und Heparin beinhaltet, kann versucht werden in den sauren Bereich zu gelangen, ohne dass es zum Niederschlag kommt. Hierdurch würden die NH-Spuren und damit die sequenziellen Kontakte zugänglich werden, die durch Auswertung der jeweiligen Aufbauraten der trNOEs zu zuverlässigen Abständen und der daraus resultierenden Struktur führen würden.

All diese Untersuchungen, die das Verständnis für die Aggregation vergrößern, können zu neuen Strategien im Kampf gegen die Alzheimer Krankheit zu führen.

## 6 Zusammenfassung

Ein entscheidender Prozess der Alzheimer Krankheit ist die pathogene Bildung von Neurofibrillenbündel und das dadurch ausgelöste vermehrte Absterben der Nervenzellen im menschlichen Gehirn. Diese Neurofibrillenbündel bestehen aus Aggregaten des Tau-Proteins, das für die Stabilisierung der Mikrotubuli und damit für die intrazelluläre Versorgung der synaptischen Region wichtig ist. Bei der Aggregation des Tau-Proteins spielen zwei Minimalmotive innerhalb der *repeat*-Regionen des Proteins eine bedeutende Rolle.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Interaktion eines dieser Motive, des **t3a** (<sup>272</sup>GGKVQIINKK<sup>281</sup>), zu dem Tau-Proteinkonstrukt **K18**, bestehend aus den vier *repeat*-Regionen und einer Molmasse von 13.2 kDa, untersucht. Zusätzlich wird auch der Einfluss des polyanionischen Heparins auf die Aggregation analysiert.

Die Zugabe von Heparin zu einer Lösung des Peptids **t3a** führt zur sofortigen Aggregation. Durch die Veränderung der Reihenfolge der Probenpräparation, indem zuerst **t3a**, dann das Protein **K18** und erst zum Schluss Heparin hinzugegeben werden, erhält man eine homogene Phase. Die Analyse der NOE Spektren zeigt, dass die Bindung des Peptids im Komplex zu detektierbaren Veränderungen der Signalvolumina in den NOESY Experimenten führt. Da die Signale in den Spektren stark überlagert sind, konnten keine sequenziellen oder weiterreichenden NOE-Kontakte identifiziert werden.

Die Bindung zwischen Protein und Peptid kann durch die Zugabe von Heparin deutlich beschleunigt werden, so dass mittels STD NMR-Methode Bindungsprozesse detektiert und charakterisiert werden können. Das Bindungsepitop zeigte den großen Einfluss der Aminosäuren Asn279, Ile277 oder 278, Val275, Gln276 und Lys274, 280 oder 281.

Nach der erfolgreichen Synthese und Charakterisierung des <sup>15</sup>N-markierten Peptids **t3a15N** konnte das Bindungsepitop durch die gemessenen Veränderungen der chemischen Verschiebungen im <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Experiment nach Zugabe des Proteinkonstrukts **K18** bestätigt und noch erweitert werden. Hier konnte der Einfluss der Seitenkette der Aminosäure Asn279 auf das Bindungsereignis bestätigt werden. Ferner wurde gezeigt, dass die Seitenketten von drei Lysinen Lys274, 280 und 281 ebenfalls an der Bindung beteiligt sind.

Durch die Etablierung eines SPR-Systems zur Untersuchung des Komplexes aus immobilisiertem Protein und Peptid stand eine weitere Methode zur Untersuchung der Komplexbildung zur Verfügung. Die Dissoziationskonstante des Komplexes aus Peptid und Proteinkonstrukt konnte zu  $K_D = 1.9 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Die Sensorgramme zeigten hierbei ein negatives Vorzeichen. Die Dissoziation verlief sehr langsam, so dass keine Auswertung möglich war. Durch Vorgabe der mittels der Sättigungswerte bestimmten Dissoziationskonstanten konnte die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{on}}$  zwischen 801 und 69  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bestimmt werden. Hieraus ergibt sich eine *off-rate* von  $k_{\text{off}} = 10^{-3}$  bis  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , die zu der

Tatsache passt, dass die STD-Effekte nur mit sehr großer Proteinkonzentration zu beobachten waren.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von drei niedermolekularen Substanzen, welche die Aggregation des Tau-Proteins *in vitro* und im Zellsystem effektiv verhindern und sogar in der Lage sind, bereits gebildete Aggregate aufzulösen. Bei **B4D3** stellte sich heraus, dass die angegebenen Summen- und Strukturformeln nicht zutreffend waren. Nach der Bestimmung der korrekten Summen- und Strukturformel wurde die Bindung des **B4D3** an das Proteinkonstrukt **K18** mittels STD NMR-Spektroskopie bewiesen und näher charakterisiert. Hierbei wurde das Bindungsepitop der Substanz beschrieben. Durch Titration der Inhibitorkonzentration konnte die Dissoziationskonstante der Komplexbildung aus **K18** und **B4D3** zu  $K_D = 11.3 \mu\text{M}$  bestimmt werden.

Das Bindungsereignis konnte durch SPR-Experimente bestätigt werden. Die kinetische Auswertung lieferte für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $250 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , während die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation mit  $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurde. Daraus ergab sich eine Dissoziationskonstante von  $6.1 \mu\text{M}$ . Die Auswertung der Sättigungswerte  $\text{RU}_{\text{max}}$  bei verschiedenen **B4D3**-Konzentrationen lieferte eine Dissoziationskonstante von  $36 \mu\text{M}$ , was jedoch mit einem deutlich höheren Streuungswert  $\chi^2$  verbunden war, so dass die beiden ersteren Methoden wohl die präziseren Aussagen liefern.

Abschließend wurde untersucht, ob der Inhibitor **B4D3** die Aggregation direkt am Minimalmotiv ( $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$ ) verhindert. Geringe Veränderungen im  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Experiment einer Probe mit **t3a15N** und **B4D3** deuten auf eine Bindung hin und liefern ein Bindungsepitop der Peptidseite.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch an der zweiten Substanz **B4A1** durchgeführt. Via STD NMR-Studien konnte das Bindungsepitop und durch Auswertung von Konzentrationsreihen die Dissoziationskonstante der Komplexbildung von **B4A1** und **K18** auf  $52 \mu\text{M}$  bestimmt werden.

Im SPR-Experiment wurden die kinetischen Parameter zu  $k_{\text{off}} = 9.57 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{\text{on}} = 444 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bestimmt. Daraus ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $29.3 \mu\text{M}$ . Die Auswertung der Sättigungswerte  $\text{RU}_{\text{max}}$  bei verschiedenen **B4A1**-Konzentrationen lieferte eine Dissoziationskonstante von  $19 \mu\text{M}$ .

Auch beim zweiten Inhibitor wurde untersucht, ob er die Aggregation direkt am Minimalmotiv ( $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$ ) verhindert. Auch hier deuteten geringe Veränderungen der chemischen Verschiebungen im  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-Experiment auf eine Bindung und lieferten Vorstellungen eines Bindungsepitops auf Peptidseite.

Die Untersuchungen des dritten Inhibitors führten zu keiner Beschreibung einer spezifischen Wechselwirkung zum Proteinkonstrukt, da alle Protonen im STD NMR-Experiment die gleichen Signalintensitäten zeigten. Dies ist nur bei unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Protein zu beobachten.

## 7 Summary

The formation of neurofibrillary tangles is a pathological process of Alzheimer's disease. These tangles consist of aggregates of tau protein that therefore cannot properly stabilize microtubules and maintain neuronal transport. Consequently the neurons die of axonal undersupply. Two minimal binding motifs within the repeat regions of the protein play a significant role in forming aggregates.

In the first part of this thesis the interaction of one of these peptide motives **t3a** ( $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$ ) with a tau protein construct **K18** consisting of the four repeat regions (MW = 13.2 kDa) is investigated. Additionally the influence of the polyanionic compound heparin on the aggregation is analyzed.

Addition of heparin to a sample of peptide **t3a** in buffer solution immediately caused the aggregation of the peptide. Changing the order of sample preparation in first dissolving **t3a** followed by addition of **K18** and finally heparin resulted in a homogenous phase. The binding event of the peptide in the complex induced observable changes of the signal volumes in the NOESY-spectra. Strong signal overlap prohibited the identification of sequential or long-range NOE-contacts.

The binding kinetics between protein and peptide is accelerated by the presence of heparin which in turn made the binding process fast enough to allow the characterization of the system by STD NMR experiments. The binding epitope comprises amino acids Asn279, Ile277 or 278, Val275, Gln276 and Lys274, 280 or 281.

After the successful synthesis and characterization of a  $^{15}\text{N}$ -labelled peptide **t3a15N** the binding epitope was described in more detail by additional data obtained by chemical shift changes in the  $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-spectra after the addition of the protein construct **K18**. The influence of the side chain of Asn279 on the binding event was confirmed. It was possible to show that the side chains of the three lysine residues Lys274, 280 and 281 are also involved in the binding event.

The establishment of a SPR-system for the description of the complex consisting of the immobilized protein and the peptide resulted in the dissociation constant of  $K_D = 1.9 \mu\text{M}$ . The sensorgrams showed a negative sign, though. Dissociation of the complex was very slow. Therefore, kinetic data of the dissociation were not directly accessible. Presetting the dissociation constant obtained from the saturation values resulted in an on-rate between 801 and  $69 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . This results in an off-rate in the range of  $10^{-3}$  to  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . This, in turn, is in agreement with the data obtained from the STD NMR spectra.

Subsequently, inhibition of the aggregation of tau protein by three organic compounds was investigated. The quoted structure of **B4D3** turned out to be incorrect. After determination of the correct structure the binding of the molecule to the protein construct **K18** was confirmed and specified by STD NMR spectroscopy. In this context the binding epitope of the

compound was assigned. Titration of the compound yielded a dissociation constant of  $K_D = 11.3 \mu\text{M}$ .

Binding was also confirmed by SPR-experiments. Kinetic analysis provided the association rate constant of  $250 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and the dissociation rate constant of  $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , resulting in a dissociation constant  $K_D = 6.1 \mu\text{M}$ . Analysis of the amount of saturation at different concentrations of **B4D3** resulted in a dissociation constant of  $K_D = 36 \mu\text{M}$ . The latter value had significantly higher margins of error. Therefore, the dissociation constant can be assigned to  $K_D = 8.7 \mu\text{M}$ .

The inhibitor **B4D3** seems to prevent aggregation by binding directly at the minimal binding motif ( $^{272}\text{GGKVQIINKK}^{281}$ ), which could be assessed by small changes in the  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-spectra of a sample consisting of **t3a15N** and **B4D3**.

The same analysis was done with the second inhibitor **B4A1**. Evaluation of STD NMR-studies delivered the binding epitope and the dissociation constant of  $K_D = 52 \mu\text{M}$  in complex with **K18**.

The event was characterized with additional SPR-studies which yielded an association rate constant of  $444 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and a dissociation rate constant of  $9.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . This provided a dissociation constant of  $K_D = 29.3 \mu\text{M}$ . The analysis of the saturation values at different concentrations of **B4A1** resulted in a dissociation constant of  $K_D = 19 \mu\text{M}$ .

It was shown that the second inhibitor also prevents aggregation directly at the minimal binding motif and the binding epitope of the peptide was described by characterization of the  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -HSQC-spectra of **t3a15N** and **B4A1**.

The investigation of the 3<sup>rd</sup> inhibitory compound **bb-5** did not result in the description of a specific interaction with the protein construct. Here, all protons of the inhibitor showed the same signal intensities in the STD NMR spectra. This is only observed if the interaction to the protein is unspecific.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Verwendete Chemikalien

*Tabelle 8.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien.*

Applied Biosystems	DIPEA, Piperidin/DMF (1:4), TBTU, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
BIACORE AB	NHS, EDC, EA
Cambridge Isotope Lab.	Fmoc-L-Asn- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> (Trt)-OH, Fmoc-L-Ile- <sup>15</sup> N-OH, L-Lys- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -OH, Fmoc-L-Val- <sup>15</sup> N-OH, DTT-d <sub>10</sub>
Deutero	Deuteriumoxid 99.9 %, DMSO-d <sub>6</sub> 99.8 %
Fluka	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, Cu(II)CO <sub>3</sub> · Cu(OH) <sub>2</sub>
Hewlett Packard	ES Tuning Mix
Iris Biotech GmbH,	Fmoc-L-Asn-(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH,
Nova Biochem,	Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Ile-OH,
Perseptive	Fmoc-L-Lys-(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, TBTU
J. T. Baker	MeCN (Ultra Gradient HPLC Grade)
Lancaster	TIPS
Merck	Ac <sub>2</sub> O, Aceton, NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , Butan-1-ol, Chloroform, CCA, DCM, Diethylether, 1,4-Dioxan, DSS, Essigsäure 100 %, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, 2-Propanol, Salzsäure 37 %, TFA
Proligo	DMF
Sigma-Aldrich	Fmoc-Gly- <sup>15</sup> N-OH, EDTA-d <sub>12</sub> , DMSO

*Proteinkonstrukt:*

3 mM **K18** in PBS/D<sub>2</sub>O, 24 mM DTT-d<sub>10</sub>, pH 7.2.

*PBS-Puffer:*

0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.02g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.144 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O auf 100 mL mit H<sub>2</sub>O auffüllen (pH 7.2).

*PBS-D<sub>2</sub>O-Puffer:*

0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.02g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.144 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O auf 100 mL mit D<sub>2</sub>O auffüllen (pH 7.2 - nicht korrigiert).

## 8.2 Verwendete Geräte und Materialien

### *Chromatographie*

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Auftrennungen bzw. Aufreinigungen von Rohproduktgemischen über HPLC wurden an einer Biocad Sprint-HPLC-Anlage oder einer Biocad 700E-HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, durchgeführt. Dabei wurden Säulen mit RP- bzw. RP-analogen Phasen verwendet. Alle Laufmittel (HPLC *grade*) waren filtriert und im Ultraschallbad entgast.

**HPLC-Säulen:** Als RP-analoga Phase diente eine semipräparative *218TP510*-Säule (1.0 x 25 cm, 5  $\mu$ m) der Firma Vydac (Flussrate 5 mL/min).

**Laufmittel:** Als mobile Phase wurden Gradienten zwischen Eluent C (H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA, 95:5:0.1) und Eluent D (H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA, 5:95:0.1) verwendet.

**Fraktionssammler:** Die Fraktionen wurden mit Hilfe eines Gilson FC205 bzw. Gilson FC203B „*Fraction Collector*“, Gilson, Middleton, WI, USA, gesammelt.

### *MALDI-TOF-Massenspektrometrie*

Die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA, im *reflector mode*.

### *ESI-Massenspektrometrie*

Die ESI-Massenspektren wurden an einem HP5989B MS *Engine* Massenspektrometer der Firma Hewlett Packard, Böblingen, aufgenommen. Als Ionenquelle diente ein HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface der Firma Hewlett Packard, Böblingen.

### *NMR-Spektroskopie*

NMR-Spektren wurden an Bruker Avance DRX500 und Avance DRX700-Spektrometern der Firma Bruker, Rheinstetten, aufgenommen.

**Bruker Avance DRX500 Spektrometer:** Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für Protonen und 125.77 MHz für <sup>13</sup>C-Kerne. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet.

**Bruker Avance DRX700 Spektrometer:** Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 16.35 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 700.13 MHz für Protonen und 176.07 MHz für <sup>13</sup>C-Kerne. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet.

**Software:** Die Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kalibrierung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR (Version 3.1), Topspin (Version 1.3) und Aurelia (Version 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (Octane, Octane2) und PCs. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten wurde mit Origin 6.1 durchgeführt.



### *SPR-Messungen*

**Biacore T100:** Die SPR-Experimente wurden an einem Biacore T100 Gerät der Firma BIACORE AB, Uppsala, Schweden, durchgeführt. Es wurden CM5-Sensorchips eingesetzt.

**Software:** Die Auswertung erfolgte mit den Programmen Biacore T100 Evaluation Software (Version 1.1), Biacore T100 Control Software (Version 1.1) und Origin 6.1.

### *Zentrifugen*

**Eppendorf Centrifuge 5415C:** Alle zu zentrifugierenden nicht proteinhaltigen Proben wurden auf einer Tischzentrifuge 5415C der Firma Eppendorf, Hamburg, bei Raumtemperatur zentrifugiert.

**Eppendorf Centrifuge 5804R:** Proben, die bei Kühlung benötigten, wurden in einer Kühlzentrifuge 5805R von Eppendorf, Hamburg, zentrifugiert.

### *Photometer*

Die photometrischen Untersuchungen wurden an einem UV-160A, UV-VIS *Recording Spectrophotometer*, der Shimadzu Corporation, Kyoto, vorgenommen.

### *Gefriertrocknungsanlage*

Alle Gefriertrocknungen erfolgten an den Gefriertrocknungsanlagen *Alpha 1-2* und *Alpha 1-4* der Firma Christ durchgeführt.

### *Reinstwasseranlage*

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde über eine *USF Purelab Plus* Anlage gereinigt und in reinster Qualität eingesetzt.

## **8.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften**

### **AAV 1: Peptidsynthese**

Zu Beginn wird das Harz in einer Glasfritte durch DMF und 2-Propanol zum Quellen gebracht (jeweils 1 mL für 10 min). Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten. Dazu wird das Harz zweimal mit 1 mL einer Mischung aus Piperidin/DMF (1:4) für jeweils 10 min geschüttelt. Um das Piperidin vollständig zu entfernen, wird mit DMF gewaschen. Anschließend wird die Amidbindung im Kupplungsschritt mittels mindestens sechsstündiger Kupplung geknüpft. Zu diesem Zweck wird bezogen auf freie Aminogruppen am Harz ein 10%iger Überschuss an N-terminaler Fmoc- und gegebenenfalls seitenkettengeschützter Aminosäure (22  $\mu\text{mol}$ ) und je ein 25%iger Überschuss an Aktivator (TBTU, 25  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (25  $\mu\text{mol}$ ) in 800  $\mu\text{L}$  zugesetzt. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz mit 2 mL DMF gewaschen. Die Acetylierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen erfolgt zweimal mit je 1 mL einer Mischung von  $\text{Ac}_2\text{O}$ /DMF (1:9) für

jeweils 10 min. Anschließend wird das Harz fünfmal mit 1.5 mL DMF gewaschen, um das Ac<sub>2</sub>O vollständig zu entfernen. Die nächste Aminosäurekupplung beginnt wieder mit dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (s. o.). Die Synthese des Peptids endet mit der Acetylierung der letzten Aminosäure 10 min mit 1 mL Ac<sub>2</sub>O/DMF (1:9). Um alle Reagenzien zu entfernen, wird im letzten Schritt das Harz mit DMF und anschließend zweimal mit DCM und 2-Propanol (je 1.5 mL) gewaschen und im Stickstoffstrom für 10 min getrocknet.

### AAV 2: Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens (Fmoc-Wert)

Zur Bestimmung des Fmoc-Wertes wird das Harz in der Glasfritte zweimal mit je 2 mL Piperidin/DMF (1:4) 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und die Reaktionslösung in einem mit Alufolie umwickelten Kolben aufgefangen. Das Harz wird nun anschließend mit je 2 mL DMF gespült, wobei die Waschlösungen ebenfalls in dem Kolben aufgefangen werden. Zur Ausbeutebestimmung werden zwei Verdünnungen der Reaktionslösung hergestellt (1:10 und 1:20). Die Menge an gelöstem Methylenfluoren wird in einer Glasküvette bei 301 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

### AAV 3: Abspaltung vom Harz und der Schutzgruppen

Für die Abspaltung des Peptids vom PAL-PEG-PS-Harz wird dieses mit 2 mL TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:5:2) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wird anschließend in einen tarierten Kolben abgesaugt und das Harz viermal mit je 0.5 mL TFA gewaschen. Das Harz wird erneut mit 2 mL TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:5:2) versetzt und 30 min geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abgesaugt und wieder viermal mit je 0.5 mL TFA gewaschen. Das Lösungsmittel aller Reaktions- und Waschlösungen wird im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Der Rückstand wird mit 2.5 mL Wasser versetzt, im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend an der Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

### AAV 4: Reinigung der Peptide per RP-HPLC

Es werden ca. 5 mg des trockenen Rohproduktes in 1.5 mL H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA (95:5:0.1) im Ultraschallbad über 2 min homogenisiert und die leicht trübe Mischung für 4 min bei 14 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und unlösliche Verunreinigungen über einen 0.45 µm Nylon Zentrifugationsfilter (Costar Spin-X, Corning Inc, Corning, NY, USA) abgetrennt. Für jeden HPLC-Lauf wird 1 mL der erhaltenen Lösung eingesetzt.

Die Aufreinigung der Peptide erfolgt an der BioCAD Sprint- oder Biocad 700E-HPLC-Anlage. Es werden die für jedes Peptid angegebenen Gradienten zwischen Eluent C (H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA, 95:5:0.1) und Eluent D (H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA, 5:95:0.1) verwendet. Die photometrische Detektion wird bei einer Wellenlänge von 215 nm durchgeführt. Die Fraktionen werden mit dem angeschlossenen Fraktionssammler mit Peak-Erkennung in Reagenzgläser gesammelt und der Produktpeak durch MALDI-TOF-MS identifiziert. Die

vereinigten Fraktionen des Produkts werden gefriergetrocknet und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

### AAV 5: NMR-Experimente zur Peptidcharakterisierung

Soweit nicht anders erwähnt werden die NMR-Spektren der Peptide in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) bei einem pH-Wert von 4.0 aufgenommen. Die Zuordnung der <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebungen erfolgt mit Hilfe von 1D-<sup>1</sup>H- (Pulsprogramm zggpw5) sowie 2D-TOCSY- (mlevgpphw5\_2.tb), und COSY- (cosydfgpph19, cosygs) Experimenten, während die <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebungen aus 2D-HSQC- (hsqcetgpsi) werden. Die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals wird mittels WATERGATE-Verfahren (w5- bzw. p3919-Sequenz) erreicht.

Die 2D-Spektren werden üblicherweise mit 256 Inkrementen in F1 aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm werden 8 bis 40 Scans mit 4k Datenpunkten pro Inkrement aufsummiert. Alle Spektren werden mittels TPPI-Verfahren phasensensitiv aufgenommen. Der Phasenfehler der Spektren wird korrigiert und anschließend eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades durchgeführt. Die Spektren werden auf das HDO-Signal bei 4.700 ppm kalibriert. Als *Window*-Funktionen werden in beiden Dimensionen verschobene Quadrat-Sinusfunktionen eingesetzt.

### AAV 6: MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Peptide werden mit einer Konzentration von etwa 10 pmol/μL in einer DHB- und CCA-Matrix bei einer Attenuation von 30 dB vermessen. Hierbei wird vorher auf die Massen des ES-Tuning Mix von Hewlett Packard kalibriert.

### AAV 7: ESI-Massenspektrometrie

Um die Reinheiten der Aminosäurebausteine zu bestimmen, werden die Rohprodukte zu 1 mg/mL gelöst und davon 100 μL direkt in das ESI-Massenspektrometer eingespritzt.

## 8.4 Herstellung des Fmoc-L-Lys<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(Boc)-OH-Bausteins

### Herstellung des L-Lys<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(Boc)-OH-Bausteins

Es wurden 295 mg (1.63 mmol) L-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Lysin-OH und 378 mg (1.73 mmol) basisches Kupfer(II)carbonat in 3 mL H<sub>2</sub>O gelöst und für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und mit 0.2 M NaOH auf pH 13 eingestellt. Danach wurde die Lösung heiß filtriert, in einem Zeitraum von 30 Minuten mit 1.07 g (4.90 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 3.0 mL Dioxan versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene blaue Niederschlag wurde abgetrennt und je fünfmal mit 1 mL kaltem H<sub>2</sub>O und 1 mL Methanol gewaschen. Der Niederschlag wurde in 10 mL Methanol resuspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zu der entstandenen Lösung wurden 10 mL H<sub>2</sub>O und 3 g Chelex Ionentauscherharz gegeben und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und dreimal mit je 2 mL Methanol und einmal mit 2 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Insgesamt wurden 246 mg (0.990 mmol) eines farblosen Produkts erhalten (Ausbeute: 61%). Das Zwischenprodukt wurde durch ESI-MS nach AAV 7 mit seinem [M+Na<sup>+</sup>]-Signal bei 271 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> identifiziert.

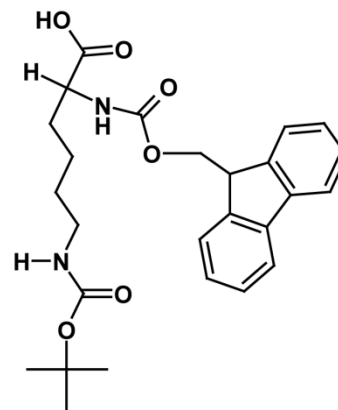
### Herstellung des Fmoc-L-Lys<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(Boc)-OH-Bausteins

Es wurden 246 mg (0.990 mmol) L-Lys<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(Boc)-OH gelöst in 5.5 mL H<sub>2</sub>O mit 557 mg (6.63 mmol) NaHCO<sub>3</sub> und 1 mL Dioxan versetzt. Zu dieser Lösung wurden bei 0 °C unter Rühren langsam 407 mg (1.21 mmol) 9-Fluorenylmethyl-Succinimidyl-Carbonat in 3 mL Dioxan gegeben und über Nacht gerührt.

Der im Laufe der Nacht entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit 20 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Niederschlag und das Filtrat wurden mittels DC auf das Produkt überprüft. Das Produkt konnte im Filtrat nachgewiesen werden, welches daraufhin dreimal mit je 10 mL Chloroform ausgeschüttelt wurde. Das Produkt wurde vom Lösungsmittel getrennt, in 40 mL H<sub>2</sub>O gelöst und mittels Gefriertrocknung wieder vom H<sub>2</sub>O getrennt. Es wurden 422 mg (0.897 mmol) des farblosen Produkts erhalten (Ausbeute: 55%). Das Produkt wurde durch ESI-MS nach AAV 7 mit seinem [M+Na<sup>+</sup>]-Signal bei 493 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> identifiziert. Außerdem wurde es in DMSO-d<sub>6</sub> gelöst und per <sup>1</sup>H-NMR untersucht. Nach Vergleich mit einem Spektrum der unmarkierten Zielverbindung folgte die Zuordnung der Protonensignale unter Zuhilfenahme eines <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY. In der folgenden Abbildung 8-1 ist die Zuordnung der Protonen zu den <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebungen dargestellt.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

δ [ppm]= 1.32 (2H, Lys-H<sub>γ</sub>), 1.38 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.61 (2H, Lys-H<sub>δ</sub>), 1.70 (2H, Lys-H<sub>β</sub>), 2.91 (s, 2H, Lys-H<sub>ε</sub>), 3.90 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 4.24 (t, 1H, Lys-H<sub>α</sub>), 4.30 (d, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.78 (1H, ζNH), 7.35 (t, 1H, Fmoc-H<sup>2</sup>), 7.44 (t, 1H, Fmoc-H<sup>3</sup>), 7.60 (d, 1H, αNH), 7.74 (d, 1H, Fmoc-H<sup>1</sup>), 7.90 (d, 1H, Fmoc-H<sup>4</sup>).



**Abbildung 8-1:** Zuordnung der Protonen der Zielverbindung *Fmoc-L-Lys<sup>15</sup>N<sub>2</sub>(Boc)-OH*.

## 8.5 Peptidsynthesen

### Synthese des Peptids **t3a**

Die Peptidsynthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Dabei wurden 123 mg (19.6 μmol) des PAL-PEG-PS-Harzes mit einer Belegung von 160 μmol/g als feste Phase eingesetzt. Die folgende Tabelle 8.2 fasst die dabei verwendeten Aminosäuremengen und die jeweiligen Kupplungszeiten zusammen.

**Tabelle 8.2:** *Eingesetzte Aminosäuremengen und Reaktionszeiten.*

Kupplung	AS	Masse [mg]	Molmenge [μmol]	Reaktionszeit [h]
1.	K	11.1	23.2	12
2.	K	11.0	23.0	6
3.	N	13.6	22.7	12
4.	I	8.0	22.6	6
5.	I	7.9	22.4	12
6.	Q	13.0	21.1	5
7.	V	7.2	21.3	12
8.	K	11.1	23.2	6
9.	G	6.1	20.7	12
10.	G	6.0	20.3	12

Nach jedem Kupplungsschritt erfolgte die Fmoc-Abspaltung und Bestimmung der Rohausbeute durch Messung der UV-Aktivität der abgespalteten Methylfluorens bei 301 nm nach AAV 2. Dies ist in der folgenden Tabelle 8.3 zusammengefasst.

**Tabelle 8.3: Übersicht der Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte.**

Kupplung	AS	E <sub>301 nm</sub> 1:10	E <sub>301 nm</sub> 1:20	Molmenge [μmol]	Rohausbeute [%]
				1:10 / 1:20 / MW	
1.	K	0.275	0.158	12.5 / 14.3 / 13.4	68
2.	K	0.280	0.160	12.7 / 14.5 / 13.6	101
3.	N	0.254	0.139	11.5 / 12.6 / 12.1	89
4.	I	0.235	0.134	10.2 / 12.1 / 11.2	93
5.	I	0.239	0.126	10.6 / 11.4 / 11.0	98
6.	Q	0.242	0.128	11.0 / 11.6 / 11.3	103
7.	V	0.202	0.122	9.14 / 11.0 / 10.1	89
8.	K	0.239	0.103	10.8 / 9.33 / 10.1	100
9.	G	0.198	0.111	8.97 / 10.1 / 9.54	94
10.	G	0.208	0.109	9.42 / 9.87 / 9.65	101

Die Abspaltung vom Harz wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 23.1 mg eines farblosen Pulvers erhalten. Die Reinigung des Peptids erfolgte nach AAV 4. Dabei wurden folgende Gradienten zur Trennung genutzt:

1.0 CV 100 % Puffer A / 0 % Puffer B  
 5.0 CV 100 % Puffer A / 0 % Puffer B isokratisch nach 65 % Puffer A / 40 % Puffer B  
 1.0 CV 60 % Puffer A / 40 % Puffer B isokratisch nach 0 % Puffer A / 100 % Puffer B  
 2.0 CV 0 % Puffer A / 100 % Puffer B  
 1.0 CV 0 % Puffer A / 100 % Puffer B isokratisch nach 100 % Puffer A / 0 % Puffer B

Das Peptid wurde bei ca. 24 % Puffer B im Fraktionssammler aufgefangen und anschließend an der Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Die Ausbeute an gereinigtem Peptid betrug 10.3 mg (9.15 μmol), was einer Ausbeute von 47 %, bezogen auf die eingesetzte Harzmenge, entspricht.

#### Charakterisierung des Peptids **t3a** per MALDI-TOF MS

Rohprodukt und Produkt nach durchgeführter Reinigung wurden nach AAV 6 mittels MALDI-TOF MS charakterisiert. Dabei wurden folgende Massenpeaks (m/z) gefunden:

Rohprodukt:

1012 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> [M-2·Gly+H<sup>+</sup>], 1069 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> [M-Gly+H<sup>+</sup>], 1126 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> [M+H<sup>+</sup>], 1148 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> [M+Na<sup>+</sup>].

HPLC-gereinigtes Produkt:

1126 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> [M+H<sup>+</sup>], 1148 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub> [M+Na<sup>+</sup>] (M<sub>w</sub> = 1125.39 <sup>g</sup>/<sub>mol</sub>).

Charakterisierung des Peptids **t3a** per NMR

Die Zuordnung des Peptids erfolgte durch Aufnahme eines TOCSY-Spektrums und eines NOESY-Spektrums bei 280 K in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, pH 4 und einem 500 MHz Spektrometer. Nach der durchgeführten Identifizierung der einzelnen Spinsysteme im TOCSY konnte die Sequenzfolge im NOESY bestätigt werden. Die folgende Tabelle 8.4 zeigt die chemischen Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme.

**Tabelle 8.4:** <sup>1</sup>H-NMR-chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids **t3a** in ppm bei 280 K in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O bei pH 4.

	NH	H $\alpha$	H $\beta,\beta'$	H $\gamma,\gamma'$	H $\gamma''$	H $\delta,\delta'$	H $\epsilon,\epsilon'$
<b>COCH<sub>3</sub></b>	-	1.765	-	-	-	-	-
<b>Gly272</b>	8.280	2x 3.640	-	-	-	-	-
<b>Gly273</b>	8.299	2x 3.646	-	-	-	-	-
<b>Lys274</b>	8.074	4.041	2x 1.517	1.113	-	1.388	2.696
<b>Val275</b>	8.087	3.776	1.731	0.626 / 0.654	-	-	-
<b>Gln276</b>	8.438	4.056	2.040 / 1.743	1.661	-	-	-
<b>Ile277</b>	8.286	3.821	1.523	1.192	0.895	0.568	-
<b>Ile278</b>	8.264	3.860	1.543	1.199	0.901	0.584	-
<b>Asn279</b>	8.505	4.421	2.510 / 2.433	-	-	-	-
<b>Lys280</b>	8.329	3.969	1.554	1.134	-	1.420	2.692
<b>Lys281</b>	8.245	3.958	1.514	1.157	-	1.406	2.706
<b>CONH<sub>2</sub></b>	7.421 / 6.761	-	-	-	-	-	-

Zusätzlich wurden die chemischen Verschiebungen in einem TOCSY-Spektrum bei 285 K in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O bei pH 7 am 700 MHz Spektrometer mit Cryoprobekopf bestimmt.

**Tabelle 8.5:**  $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids **t3a** in ppm bei 285 K in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  bei pH 7.

	NH	H $\alpha$	H $\beta,\beta'$	H $\gamma,\gamma'$	H $\delta,\delta'$	H $\epsilon,\epsilon'$	H $\zeta$
<b>Gly272</b>	8.169	2x 3.530	-	-	-	-	-
<b>Gly273</b>	8.196	2x 3.550	-	-	-	-	-
<b>Lys274</b>	8.004	4.113	1.603 / 1.583	1.205	1.501	2.758	7.385
<b>Val275</b>	8.001	3.835	1.794	0.703 / 0.733	-	-	-
<b>Gln276</b>	8.368	4.130	2.100 / 1.801	1.723	-	-	-
<b>Ile277</b>	8.183	3.894	1.605	1.262	0.627	-	-
<b>Ile278</b>	8.168	3.920	1.611	1.233	0.639	-	-
<b>Asn279</b>	8.405	4.465	2.600 / 2.501	-	6.870 / 6.550	-	-
<b>Lys280</b>	8.225	4.049	1.602	1.198	1.482	2.761	7.385
<b>Lys281</b>	8.163	4.030	1.591	1.211	1.489	2.763	7.385

### Synthese des Peptids **t3a15N**

Die Synthese des Peptids **t3a15N** wurde ebenfalls nach AAV 1 durchgeführt. Dabei wurden 123 mg (19.6  $\mu\text{mol}$ ) des PAL-PEG-PS-Harzes mit einer Belegung von 160  $\mu\text{mol/g}$  als feste Phase eingesetzt. Die folgende Tabelle 8.6 fasst die dabei verwendeten Aminosäuremengen und die jeweiligen Kupplungszeiten zusammen.

**Tabelle 8.6:** Eingesetzte Aminosäuremengen und Reaktionszeiten.

Kupplung	AS	Masse [mg]	Molmenge [ $\mu\text{mol}$ ]	Reaktionszeit [h]
1.	K	11.0	23.0	10
2.	K	11.0	23.0	6
3.	N	13.3	22.2	11
4.	I	7.7	21.8	6
5.	I	7.9	22.4	12
6.	Q	12.2	19.8	6
7.	V	7.0	20.7	13
8.	K	11.0	23.0	8
9.	G	5.9	20.0	14
10.	G	5.9	20.0	24

Nach jedem Kupplungsschritt erfolgte die Fmoc-Abspaltung und Bestimmung der Rohausbeute durch Messung der UV-Aktivität der abgespalteten Methylfluorens bei 301 nm nach AAV 2. Dies ist in der folgenden Tabelle 8.7 zusammengefasst.



**Tabelle 8.7: Übersicht der Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte.**

Kupplung	AS	E <sub>301 nm</sub> 1:10	E <sub>301 nm</sub> 1:20	Molmenge [μmol]	Rohausbeute [%]
				1:10 / 1:20 / MW	
1.	K	0.289	0.160	13.1 / 14.5 / 13.8	70.4
2.	K	0.250	0.136	11.3 / 12.3 / 11.8	85.7
3.	N	0.244	0.129	11.1 / 11.7 / 11.4	96.2
4.	I	0.225	0.129	10.2 / 11.7 / 10.9	96.2
5.	I	0.235	0.124	10.6 / 11.2 / 10.9	100
6.	Q	0.231	0.126	10.5 / 11.4 / 10.9	100
7.	V	0.212	0.110	9.60 / 9.96 / 9.78	89.4
8.	K	0.289	0.103	13.1 / 9.35 / 11.2	115
9.	G	0.188	0.101	8.51 / 9.15 / 8.83	55.7
10.	G	0.210	0.107	9.51 / 9.69 / 9.60	109

Die Abspaltung vom Harz wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 21.2 mg eines farblosen Pulvers erhalten. Die Reinigung des Peptids erfolgte nach AAV 4. Dabei wurden folgende Gradienten zur Trennung genutzt:

1.0 CV 100 % Puffer A / 0 % Puffer B  
 5.0 CV 100 % Puffer A / 0 % Puffer B isokratisch nach 65 % Puffer A / 40 % Puffer B  
 1.0 CV 60 % Puffer A / 40 % Puffer B isokratisch nach 0 % Puffer A / 100 % Puffer B  
 2.0 CV 0 % Puffer A / 100 % Puffer B  
 1.0 CV 0 % Puffer A / 100 % Puffer B isokratisch nach 100 % Puffer A / 0 % Puffer B

Das Peptid wurde bei ca. 24 % Puffer B im Fraktionssammler aufgefangen und anschließend an der Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Die Ausbeute an gereinigtem Peptid betrug 8.5 mg (7.47 μmol), was einer Ausbeute von 38 %, bezogen auf die eingesetzte Harzmenge, entspricht.

#### Charakterisierung des Peptids **t3a15N** per MALDI-TOF MS

Rohprodukt und Produkt nach durchgeführter Reinigung wurden nach AAV 6 mittels MALDI-TOF MS charakterisiert. Dabei wurden folgende Massenpeaks (m/z) gefunden:

Rohprodukt:

1022  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  [M-2·Gly+H<sup>+</sup>], 1081  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  [M-Gly+H<sup>+</sup>], 1139  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  [M+H<sup>+</sup>], 1161  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  [M+Na<sup>+</sup>].

HPLC-gereinigtes Produkt:

1139  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  [M+H<sup>+</sup>], 1161  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  [M+Na<sup>+</sup>] ( $M_w = 1138.30 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ).

### Charakterisierung des Peptids **t3a15N** per NMR

Die Zuordnung des Peptids erfolgte durch Aufnahme eines TOCSY-Spektrums und eines NOESY-Spektrums bei 280 K in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, pH 4 und einem 500 MHz Spektrometer. Die einzelnen Spinsysteme wurden im TOCSY identifiziert. Hierbei war zu berücksichtigen, dass jede Aminogruppe außer Gln276 und das C-terminale Amid zwei Spuren verursacht. Die Überprüfung der Sequenzfolge wurde durch die Überlagerung und Vergleich des Spektrums mit dem NOESY-Spektrum der unmarkierten Verbindung durchgeführt (Kapitel 0).

Die Zuordnung der Signale im <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-HSQC-Experiment wurde durch Vergleich der <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebungen mit den Daten der unmarkierten Verbindung durchgeführt (Tabelle 8.5 und Tabelle 8.8). Hierzu wurde das Peptid **t3a15N** in PBS H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O pH 7.2 gelöst und bei 285 K an einem 500 MHz Spektrometer vermessen.

**Tabelle 8.8:** <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H-Zuordnung in ppm des Peptids **t3a15N** bei 285 K in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O bei pH 7.

	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
<b>Gly272/273 Nα</b>	8.196	113.5
<b>Lys274 Nα</b>	8.004	121.5
<b>Val275 Nα</b>	8.001	124.7
<b>Ile277 Nα</b>	8.183	123.6
<b>Ile278 Nα</b>	8.168	122.9
<b>Asn279 Nα</b>	8.405	123.1
<b>Lys280 Nα</b>	8.225	107.9
<b>Lys281 Nα</b>	8.163	125.7
<b>Asn279 Nδ</b>	6.706	111.9
<b>Lys274/280/281 Nζ</b>	7.431	112.0

## 8.6 trNOE-Experimente

Um die Veränderungen der Signalvolumina beim Bindungsereignis zu zeigen, wurden NOESY-Spektren einer Referenzprobe bestehend aus dem Peptid **t3a** ( $c_{\text{t3a}} = 500 \mu\text{M}$ ) und der Probe des trimolekularen Komplexes ( $c_{\text{t3a}} = 500 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{K18}} = 200 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{Heparin}} = 200 \mu\text{M}$ ) in PBS/D<sub>2</sub>O-Puffer miteinander verglichen. Hierbei war die Reihenfolge der Probenvorbereitung entscheidend, um die Aggregation zu verhindern. Peptid **t3a** wurde zunächst im Puffer gelöst und die Lösung anschließend mit der benötigten Menge an Proteinkonstrukt **K18** aus einer 3 mM Stammlösung in deuteriertem PBS-Puffer mit achtfachem Überschuss an DTT-d<sub>10</sub> zur Verhinderung der Dimerisierung versehen. Zu dieser Lösung wurde die Menge an Heparin als Feststoff zugegeben, um die Konzentration auf 200  $\mu\text{M}$  einzustellen.

Die Messungen wurden bei 285 K an einem 500 MHz-Spektrometer unter Benutzungen des Pulsprogramms `noesygp5hw5` (s. Anhang) mit WATERGATE Wasserunterdrückung (w5-Sequenz) durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 10.2485 ppm, 4k Datenpunkten in F2 pro Inkrement und 256 Inkrementen in F1 aufgenommen. Nach der Aufnahme beider Spektren mit je 56 aufsummierten Scans im phasensensitiven TPPI-Verfahren wurden die Phasenfehler korrigiert und eine Basislinienkorrektur mittels Polynom fünften Grades durchgeführt. Die Spektren wurden auf das HDO-Signal bei 4.700 ppm kalibriert. Als *window*-Funktionen wurden beide Dimensionen mit einer verschobenen Sinusfunktion modifiziert.

## 8.7 1D-<sup>1</sup>H-STD NMR-Experimente

Sämtliche 1D-<sup>1</sup>H-STD NMR-Experimente wurden in 3 mm Match-Röhrchen und einem Probenvolumen von 200  $\mu\text{L}$  an einem 700 MHz-Spektrometer mit Cryoprobekopf bei 295 K durchgeführt. Durch den geringeren Durchmesser der Probenröhrchen wurde die Menge an benötigtem Protein gering gehalten und gleichzeitig *radiation damping*-Effekt verringert, durch den das HDO-Signal bei hohen Spektrometerfrequenzen sehr groß und damit für das restliche Spektrum störend werden kann.

Die Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 11.0208 ppm und 32k Datenpunkten unter Anwendung der WATERGATE Wasserunterdrückung (w5-Sequenz) aufgenommen. Die Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde über einen T<sub>1ρ</sub>-Filter, einem Spinlockpuls mit einer Länge von 15 ms bei einer Abschwächung von 11 dB erreicht. Als Pulsprogramm wurde `std.t4_3.bc` (s. Anhang) genutzt, bei dem die Vorsättigung abwechselnd nach jedem Scan für *on* und *off resonance*-Experiment bei der entsprechenden Frequenz durchgeführt wird. Dadurch sollten spätere Artefakte bei der Differenzbildung aufgrund von Inhomogenitäten der Temperatur und des Magnetfeldes verhindert werden. Als weitere Maßnahme, wurden je 16 Scans als Dummiscans aufgenommen, die nicht gespeichert werden. Während der Einstrahlpunkt für den *off resonance*-Fall bei allen Spektren auf

40 000 Hz (57.1 ppm) festgelegt wurde, wurde der Einstrahlpunkt für die Vorsättigung des Proteins im *on resonance*-Fall bei den unterschiedlichen Liganden variiert. Die Sättigungsdauer betrug bei allen Experimenten 4 s, die Abschwächung der Sättigungsleistung 45 dB. Während der Akquisition wurden *on* und *off resonance*-Spektren durch die Wahl des Phasenzykles mit unterschiedlichem Vorzeichen in verschiedene Puffer geschrieben. Die Addition der beiden Spektren lieferte das STD NMR-Spektrum. Nach der anschließenden Phasenkorrektur wurde zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert, die eine Linienverbreiterung von 1 Hz verursachte. Die Spektren wurden auf das HDO-Signal bei 4.700 ppm kalibriert. Der Vergleich des STD NMR-Spektrums mit dem *off resonance*-Spektrum lieferte die Größe des STD-Effekts. Zur Beschreibung des Bindungsepitops wurde das jeweils größte STD-Signal auf 100 % skaliert und nur Signale berücksichtigt, die mindestens 50 % erreichen.

Die Konzentrationen an Proteinkonstrukt **K18** wurden aus einer 3 mM Stammlösung in deuteriertem PBS-Puffer bei pH 7.2 eingestellt, die einen achtfachen Überschuss an DTT-d<sub>10</sub> zur Verhinderung der Dimerisierung enthielt.

Das Peptid **t3a** wurde als Feststoff zugegeben, um die benötigte Konzentration einzustellen. Die Substanzen **B4D3**, **B4A1** und **bb-5** wurden jeweils aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO-d<sub>6</sub> auf die benötigte Konzentration eingestellt.

#### STD NMR-Experimente von **t3a** an **K18**

Zur Bestimmung des in Kapitel 5.2.4 beschriebenen Bindungsepitops wurde eine Probe aus 3.23 mM **t3a**, 3.0 mM **K18**, 3.0 mM Heparin und 24.0 mM DTT-d<sub>10</sub> in 200 µL PBS/D<sub>2</sub>O angesetzt. Hierbei wurde das Heparin als Feststoff zugegeben. Dies entspricht einem Überschuss von 8 % des Peptids gegenüber dem Proteinkonstrukt. Als Einstrahlpunkt für das *on resonance*-Experiment wurden -700 Hz (-1 ppm) gewählt. Die Aufnahme von je 1016 Scans lieferte die Daten für die durchgeführte Auswertung. Nach der anschließenden Phasenkorrektur wurden STD-Spektrum und Referenzspektrum miteinander verglichen, die STD-Effekte und anschließend das Bindungsepitop bestimmt.

#### STD NMR-Experimente von **B4D3** an **K18**

Zur Bestimmung des in Kapitel 0 beschriebenen Bindungsepitops wurde eine Probe aus 250 µM **B4D3**, 5.0 µM **K18** und 40 µM DTT-d<sub>10</sub> in 200 µL PBS/D<sub>2</sub>O angesetzt. Dies entspricht einem 50fachen Überschuss des Liganden gegenüber dem Proteinkonstrukt. Als Einstrahlpunkt für das *on resonance*-Experiment wurden 540 Hz (0.77 ppm) gewählt. Die Aufnahme von je 2044 Scans lieferte die Daten für die durchgeführte Auswertung. Anschließend wurden STD-Spektrum und Referenzspektrum miteinander verglichen, die STD-Effekte bestimmt und anschließend das Bindungsepitop bestimmt.

Zur Bestimmung der in Kapitel 0 beschriebenen Dissoziationskonstante wurde ausgehend von einer Probe aus 1.0 µM **K18** und 8.0 µM DTT-d<sub>10</sub> in 200 µL PBS/D<sub>2</sub>O die Konzentration an **B4D3** variiert. Hierbei wurden die Konzentration 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM und 80 µM

gewählt, was einer Veränderung des Überschusses des Liganden gegenüber dem Proteinkonstrukt von 5fach bis 80fach entspricht. Die anschließende Auftragung der Ligandenkonzentrationen gegen die bestimmten STD-Amplifikationsfaktoren der beteiligten Protonen zeigte, dass Konzentrationen über 20  $\mu\text{M}$  bzw. Überschüsse über 20fach zu unspezifischen Wechselwirkungen führen. Für die Berechnungen der Dissoziationskonstanten wurden deshalb nur die Konzentrationen bis 20  $\mu\text{M}$  berücksichtigt.

### STD NMR-Experimente von **B4A1** an **K18**

Zur Bestimmung des in Kapitel 0 beschriebenen Bindungsepitops wurde eine Probe aus 250  $\mu\text{M}$  **B4A1**, 5.0  $\mu\text{M}$  **K18** und 40  $\mu\text{M}$  DTT-d<sub>10</sub> in 200  $\mu\text{L}$  PBS/D<sub>2</sub>O angesetzt. Dies entspricht einem 50fachen Überschuss des Liganden gegenüber dem Proteinkonstrukt. Als Einstrahlpunkt für das *on resonance*-Experiment wurden 540 Hz (0.77 ppm) gewählt. Die Aufnahme von je 2044 Scans lieferte die Daten für die durchgeführte Auswertung. Anschließend wurden STD-Spektrum und Referenzspektrum miteinander verglichen, die STD-Effekte bestimmt und anschließend das Bindungsepitop bestimmt.

Zur Bestimmung der in Kapitel 0 beschriebenen Dissoziationskonstante wurde ausgehend von einer Probe aus 2.0  $\mu\text{M}$  **K18** und 16.0  $\mu\text{M}$  DTT-d<sub>10</sub> in 200  $\mu\text{L}$  PBS/D<sub>2</sub>O die Konzentration an **B4A1** variiert. Hierbei wurden die Konzentration 10  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  gewählt, was einer Veränderung des Überschusses des Liganden gegenüber dem Proteinkonstrukt von 5fach bis 80fach entspricht. Bei der geringsten Konzentration konnte der STD-Effekt jedoch nicht bestimmt werden, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht ausreichend war. Die anschließende Auftragung der Ligandenkonzentrationen 40 - 100  $\mu\text{M}$  gegen die bestimmten STD-Amplifikationsfaktoren der beteiligten Protonen lieferte nach der Auswertung die Dissoziationskonstanten.

### NMR-Experimente von **bb-5** an **K18**

Die in Kapitel 5.7.1 beschriebenen Probleme der sehr starken Linienverbreiterung nach Zugabe des Proteinkonstrukts wurden durch Veränderungen der Probenzusammensetzung versucht zu beseitigen. Die folgende Tabelle 8.9 beschreibt die durchgeführten Experimente.

**Tabelle 8.9: Probenzusammensetzung *bb-5* ( $c_{bb-5} = 100 \mu\text{M}$ ) mit **K18**.**

Beschreibung	$c_{\text{K18}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$c_{\text{EDTA}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	T [K]
<b>bb-5</b>	-	-	295
<b>bb-5 mit K18</b>	5	-	295
<b>bb-5 mit K18; Temperaturerhöhung</b>	5	-	305
	5	-	325
<b>bb-5 mit K18; EDTA</b>	5	150	295
<b>bb-5 mit weniger K18</b>	1	-	295

Mit der verringerten Proteinkonzentration bzw. dem auf 100fach erhöhten Ligandenüberschuss wurden STD-Experimente durchgeführt. Als Einstrahlpunkt für das *on resonance*-Experiment wurden 540 Hz (0.77 ppm) gewählt. Die Aufnahme von je 2044 Scans lieferte die Daten für die durchgeführte Auswertung. Anschließend wurden STD-Spektrum und Referenzspektrum miteinander verglichen und die vermeintlichen STD-Effekte bestimmt. Es wurde kein Bindungsereignis detektiert.

## 8.8 $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ -HSQC-Experimente

Die NMR-Spektren wurden in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) bei einem pH-Wert von 7.0 bei 285 K an einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen. Als Pulsprogramm wurde *hsqcetgpsi* (s. Anhang) verwendet. Die Spektren wurden mit 64 Inkrementen in F1 aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 50.000 ppm in F1 und 5.0013 ppm in F2 wurden 256 Scans mit 4k Datenpunkten pro Inkrement aufsummiert. Alle Spektren wurden mittels Echo-Antiecho-Verfahren phasensensitiv aufgenommen. Anschließend folgte die Korrektur der Phasenfehler der Spektren und eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades. Als *Window*-Funktionen wurden in beiden Dimensionen verschobene Quadrat-Sinusfunktionen eingesetzt. Die Spektren wurden auf das Val275  $\text{N}\alpha$ -Signal bei F1: 125.00 ppm und F2: 8.027 ppm kalibriert.

Die Konzentrationen an Proteinkonstrukt **K18** wurden aus einer 3 mM Stammlösung in deuteriertem PBS-Puffer bei pH 7.2 eingestellt, die einen achtfachen Überschuss an DTT- $\text{d}_{10}$  zur Verhinderung der Dimerisierung enthielt.

Das Peptid **t3a15N** wurde als Feststoff zugegeben, um die benötigte Konzentration einzustellen. Die Substanzen **B4D3** und **B4A1** wurden jeweils aus einer 10 mM-Stammlösung in  $\text{DMSO-d}_6$  auf die benötigte Konzentration eingestellt.

### $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ -HSQC-Experiment von **t3a15N** mit **K18**

Zur Bestimmung des in Kapitel 5.2.6 beschriebenen Bindungsepitops von **t3a15N** an **K18** wurde eine Probe aus 200  $\mu\text{M}$  **t3a15N**, 200  $\mu\text{M}$  **K18** und 1.6 mM DTT- $\text{d}_{10}$  in 600  $\mu\text{L}$  PBS/ $\text{D}_2\text{O}$  angesetzt. Als Referenzprobe zum Vergleich der Veränderungen der chemischen Verschiebungen wurde eine Probe aus 200  $\mu\text{M}$  **t3a15N** in 600  $\mu\text{L}$  PBS/ $\text{D}_2\text{O}$  genutzt. Die Spektren beider Proben wurden vollkommen gleich prozessiert und miteinander verglichen.

### $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ -HSQC-Experiment von **B4D3** mit **t3a15N**

Zur Bestimmung des in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Bindungsepitops von **B4D3** an **t3a15N** wurde eine Probe aus 90  $\mu\text{M}$  **B4D3** und 90  $\mu\text{M}$  **t3a15N** in 600  $\mu\text{L}$  PBS/ $\text{D}_2\text{O}$  angesetzt. Als Referenzprobe zum Vergleich der Veränderungen der chemischen Verschiebungen wurde eine Probe aus 90  $\mu\text{M}$  **t3a15N** in 600  $\mu\text{L}$  PBS/ $\text{D}_2\text{O}$  genutzt. Die Spektren beider Proben wurden vollkommen gleich prozessiert und miteinander verglichen.

### <sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-HSQC-Experiment von **B4A1** mit **t3a15N**

Zur Bestimmung des in Kapitel 5.6.1 beschriebenen Bindungsepitops von **B4A1** an **t3a15N** wurde eine Probe aus 90  $\mu$ M **B4A1** und 90  $\mu$ M **t3a15N** in 600  $\mu$ L PBS/D<sub>2</sub>O angesetzt. Als Referenzprobe zum Vergleich der Veränderungen der chemischen Verschiebungen wurde eine Probe aus 90  $\mu$ M **t3a15N** in 600  $\mu$ L PBS/D<sub>2</sub>O genutzt. Die Spektren beider Proben wurden vollkommen gleich prozessiert und miteinander verglichen.

## 8.9 SPR-Bindungsstudien

Die Biacore-Studien wurden an einem Biacore T100 Gerät bei einer Temperatur von 298 K unter Verwendung eines CM5-Chips durchgeführt. Als Puffersystem wurde steril filtrierter PBS-Puffer genutzt. Bei den Substanzen wurde 1 % DMSO zugefügt, da die Proben aufgrund der schlechten Löslichkeit in wässrigen Systemen ebenfalls 1 % DMSO enthielten.

Zur Durchführung der Experimente wurde eine Methode gewählt, bei der zunächst sechs Injektionen mit reiner Pufferlösung durchgeführt werden, um die Stabilität des Gerätes zu gewährleisten. Anschließend wurden, von der niedrigsten beginnend, alle eingestellten Konzentrationen automatisch vermessen. Hierbei wurden wieder zwei Messungen ohne Probe und nur mit Puffer durchgeführt, deren Signalantworten bei der Auswertung von den eigentlichen Messungen automatisch abgezogen werden konnten.

Die Auswertungen der kinetischen Daten wurde über die Biacore T100 Evaluation Software durchgeführt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante anhand des *one site binding*-Modells wurde zusätzlich mittels Origin durchgeführt.

### Immobilisierung von **K18**

Als Flussrate wurde für die Immobilisierung 10  $\mu$ L/min gewählt. Für die Immobilisierung des Proteinkonstruktes **K18** wurde die carboxymethylierte Dextranmatrix der Flusszellen Fc1 und Fc2 mit einer Mischung aus 0.1 M NHS und 0.1 M EDC zweimal 8 min aktiviert. Anschließend wurde eine Lösung von 3.0  $\mu$ L **K18** (300  $\mu$ M) in 50  $\mu$ L Acetatpuffer pH 4.5 dreimal für je 3 min über die zweite Flusszelle Fc2 geleitet. Zwischen den einzelnen Injektionen wurde für 2 min mit PBS-Puffer gespült. Anschließend wurden beide Flusszellen mit 1 M Ethanolamin für 7 min gecappt. Es wurden 4292 RU des Proteinkonstrukts **K18** auf Fc2 immobilisiert werden, was einer Belegung von 325 fmol entspricht.

### Vorversuche und Regeneration der Chipoberfläche

Um die optimalen Methodenbedingungen zu bestimmen, wurden Proben verschiedener Konzentration von 1 bis 100  $\mu$ M des Peptids und der beiden Liganden mit unterschiedlich langen Assoziations-, Dissoziations-, Regenerations- und Stabilisierungszeiten vermessen. Hierbei stellte sich heraus, dass eine 20 s lange Injektion mit 50 mM Salzsäure und einer anschließenden 60 s langen Stabilisierungsperiode geeignet ist, um die Chipoberfläche zu regenerieren. Im Falle des Liganden **B4A1** waren jedoch zwei Injektionen notwendig. Als

Flussrate zeigte sich 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  als geeignet, als Kontaktzeit wurde die maximal mögliche Zeit von 700 Sekunden und als Dissoziations- und Stabilisierungszeit jeweils 300 Sekunden gewählt.

### SPR-Experimente von **t3a** an **K18**

Das Peptid **t3a** wurde als Feststoff in PBS-Puffer gelöst. Als Stammlösung wurde eine 100  $\mu\text{M}$  hergestellt, aus denen die weiteren Konzentrationen 80  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.1  $\mu\text{M}$  durch Verdünnen mit weiterem Puffer erhalten wurden. Nach der Durchführung der Messungen mit der beschriebenen Methode zeigte die Auswertung, dass die Regeneration bei den Konzentrationen über 20  $\mu\text{M}$  nicht zu einer ausreichenden Wiederherstellung des Messsystems führten. Deshalb wurde die Auswertung auf die Konzentrationen bis einschließlich 20  $\mu\text{M}$  beschränkt.

### SPR-Experimente von **B4D3** an **K18**

Der Ligand **B4D3** wurde aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO- $d_6$  in PBS-Puffer mit 1 % DMSO gelöst. Als Stammlösung wurde eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung hergestellt, aus denen die weiteren Konzentrationen 75  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.5  $\mu\text{M}$  durch Verdünnen mit weiterem Puffer erhalten wurden. Nach der Durchführung der Messungen mit der beschriebenen Methode zeigte die Auswertung, dass die Regeneration bei den Konzentrationen über 30  $\mu\text{M}$  nicht zu einer ausreichenden Wiederherstellung des Messsystems führten. Deshalb wurde die Auswertung auf die Konzentrationen bis einschließlich 30  $\mu\text{M}$  beschränkt.

### SPR-Experimente von **B4A1** an **K18**

Der Ligand **B4A1** wurde aus einer 10 mM-Stammlösung in DMSO- $d_6$  in PBS-Puffer mit 1 % DMSO gelöst. Als Stammlösung wurde eine 100  $\mu\text{M}$  hergestellt, aus denen die weiteren Konzentrationen 75  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.5  $\mu\text{M}$  durch Verdünnen mit weiterem Puffer erhalten wurden. Nach der Durchführung der Messungen mit der beschriebenen Methode zeigte die Auswertung, dass die Regeneration bei den Konzentrationen über 50  $\mu\text{M}$  nicht zu einer ausreichenden Wiederherstellung des Messsystems führten. Deshalb wurde die Auswertung auf die Konzentrationen bis einschließlich 50  $\mu\text{M}$  beschränkt.



## 9 Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

Substanzname	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	-
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat	Xi	5/36/37/38	26-36
Butan-2,3-diol-1,4-dithiol	Xn	22-36/38	-
Butan-1-ol	Xn	10-22-37/38-41-67	7/9-13-26-37/39-46
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Cu(II)CO <sub>3</sub> · Cu(OH) <sub>2</sub>	T	20-25	22-24/25
α-Cyano-4-hydroxymethylsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33
Dinatriumhydrogenphosphat	Xi	36/37/38	
Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
N,N'-Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid		20/21/22-36/37/38	26-36
N,N'-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure	-	-	24/25
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	-
Ethylendiamintetraessigsäure	Xi, N	36-52/53	
Fmoc-L-Asn-(Trt)-OH	Nicht geprüft!		
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Nicht geprüft!		
Fmoc-L-Gly-OH	Nicht geprüft!		
Fmoc-L-Ile-N-OH	Nicht geprüft!		
Fmoc-L-Lys-(Boc)-OH	Nicht geprüft!		
Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz	Nicht geprüft!		
Fmoc-L-Val-N-OH	Nicht geprüft!		
Fmoc-L-Val-OH	Nicht geprüft!		
N-Hydroxysuccinimid	-	-	24/25
L-Lys-OH	Nicht geprüft!		
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumacetat	-	-	24/25
Natriumhydroxid	C	35	(1/2-)26-37/39-45
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Salzsäure konz.	C	34-37	26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

## 10 Literaturverzeichnis

1. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z f Psychiatrie & Psychisch-gerichtl Med* 64, 146-148, **1907**.
2. NIA/NIH. *Progress Report on Alzheimer's Disease 2004-2005*, 1-82, **2005**.
3. Alzheimer Forschung Initiative e. V.,  
<http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/index.htm>.
4. NIA/NIH. *Progress Report on Alzheimer's Disease 2000*, 6, **2000**.
5. Galasko, D. An Integrated Approach to the Management of Alzheimer's Disease: Assessing Cognition, Function and Behaviour. *Eur J Neurol* 5, 9-17, **1998**.
6. Folstein, M. F., Folstein, S. E., and McHugh, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189-198, **1975**.
7. Katzman, R., Brown, T., Fuld, P., Peck, A., Schechter, R., and Schimmel, H. Validation of a short Orientation-Memory-Concentration Test of cognitive impairment. *Am J Psychiatry* 140, 734-739, **1983**.
8. Pfeffer, R., T, Kurosaki, Harrah, C., Chance, J., and Filis, S. Measurement of functional activities in older adults in the community. *Gerontol* 37, 323-329, **1982**.
9. Rosen, W. G., Mohs, R., and Davis, K. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 141, 1356-1364, **1984**.
10. Solomon, P. R., Hirschoff, A., Kelly, B., Relin, M., Brush, M., DeVaux, R. D., and Pendlebury, W. W. A 7 minute neurocognitive screening battery highly sensitive to Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 55, 349-355, **1998**.
11. Itoh N., Arai H., Urakami K., Ishiguro K., Ohno H., Hampel H., Buerger K., Wiltfang J., Otto M., Kretzschmar H., Moeller H. J., Imagawa M., Kohno H., Nakashima K., Kuzuhara S., Sasaki H., Imahori K., Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease, *Ann Neurol* 50, 150-156, **2001**.
12. Leon J., Cheng C. K., Neumann P. J. , Alzheimer's disease care: costs and potential savings, *Health Aff (Millwood)* 17, 206-216, **1998**.

13. Ernst, R. L. and Hay, J. W. The US economic and social costs of Alzheimer's disease revisited. *Am J Public Health* 84, 1261-1264, **1994**.
14. Ernst, R. L. and Hay, J. W. Economic research on Alzheimer disease: a review of the literature. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 11, 135-145, **1997**.
15. journalMED, Volkswirtschaftliche Aspekte der Alzheimer-Therapie, <http://www.journalmed.de/newsview.php?id=9926>.
16. WHO. *The World Health Report 1999*, 98-109, **1999**.
17. WHO. *The World Health Report 2004*, 121-122, **2004**.
18. Brookmeyer, R., Gray, S., and Kawas, C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* 88, 1337-1342, **1998**.
19. Hebert L. E., Beckett L. A., Scherr P. A., Evans D. A., Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050, *Alzheimer Dis Assoc Disord* 15, 169-173, **2001**.
20. NIA/NIH. *Alzheimer's Disease - Unravelling the Mystery*, 1-64, **2002**.
21. Braak, H. and Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259, **1991**.
22. The Lundbeck Institute, The areas of the brain affected in Alzheimer's disease, [http://www.cnsforum.com/imagebank/item/brain\\_struct\\_ALZ/default.aspx](http://www.cnsforum.com/imagebank/item/brain_struct_ALZ/default.aspx).
23. Calbiochem, Alzheimer's Disease Interactive Pathway<sup>TM</sup> and Related Products, [http://www.merckbiosciences.co.uk/html/CBC/alzheimers\\_disease\\_products\\_interactive\\_signaling\\_pathway.htm](http://www.merckbiosciences.co.uk/html/CBC/alzheimers_disease_products_interactive_signaling_pathway.htm).
24. Schulz, G., Identifikation des Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Heparan Sulfat Proteoglykans Glypikan als Toxizitäts-vermittelndem Rezeptor für  $\beta$ -Amyloid der Alzheimer'schen Krankheit in der neuronalen PC12 Zelllinie, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, **1998**.
25. CSH, [http://meetings.cshl.org/\\_archive/2000/2000degen.htm](http://meetings.cshl.org/_archive/2000/2000degen.htm).
26. Golde, T. E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L. H., and Younkin, S. G. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4, 253-267, **1990**.

27. Arai, H., Lee, V. M., Messinger, M. L., Greenberg, B. D., Lowery, D. E., and Trojanowski, J. Q. Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann Neurol* 30, 686-693, **1991**.
28. Kang, J. and Muller-Hill, B. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 1192-1200, **1990**.
29. Dickson, D. W. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321-339, **1997**.
30. Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P., and Selkoe, D. J. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13170-13175, **1996**.
31. Selkoe D. J., The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease, *Trends Cell Biol* 8, 447-453, **1998**.
32. Li Y. M., Gamma-secretase: a catalyst of Alzheimer disease and signal transduction, *Mol Interv* 1, 198-207, **2001**.
33. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., and Sisodia, S. S. The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* 271, 31894-31902, **1996**.
34. Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., and Swindlehurst, C. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327, **1992**.
35. Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, T. E., and Younkin, S. G. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264, 1336-1340, **1994**.
36. Giulian, D., Haverkamp, L., Yu, J., Karshin, W., Tom, D., Kirkpatrick, J., Kuo, Y., and Roher, A. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J Neurosci* 16, 6021-6037, **1996**.

37. Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 425-427, **1998**.
38. Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Zytoskelett, <http://www.mpasmb-hamburg.mpg.de/>.
39. Lindwall, G. and Cole, R. D. The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem* 259, 12241-12245, **1984**.
40. Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116, 227-247, **1977**.
41. Butner, K. A. and Kirschner, M. W. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115, 717-730, **1991**.
42. Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33, 9511-9522, **1994**.
43. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R. A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526, **1989**.
44. Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., and Crowther, R. A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8, 393-399, **1989**.
45. Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., and Klug, A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4051-4055, **1988**.
46. Andreadis, A., Brown, W. M., and Kosik, K. S. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-10633, **1992**.
47. Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116, 207-225, **1977**.

48. Wiemer, E. A., Wenzel, T., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., and Subramani, S. Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol* 136, 71-80, **1997**.
49. Rickard, J. E. and Kreis, T. E. Clips for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol* 6, 178-183, **1996**.
50. Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., and Hirokawa, N. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209-1220, **1994**.
51. Hollenbeck, P. J. and Swanson, J. A. Radial extension of macrophage tubular lysosomes supported by kinesin. *Nature* 346, 864-866, **1990**.
52. Scales, S. J., Pepperkok, R., and Kreis, T. E. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90, 1137-1148, **1997**.
53. Morris, R. L. and Hollenbeck, P. J. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131, 1315-1326, **1995**.
54. Ebner, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143, 777-794, **1998**.
55. Hirokawa, N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Struct Biol* 6, 74-81, **1994**.
56. Chapin, S. J. and Bulinski, J. C. Non-neuronal 210 x 10(3) Mr microtubule-associated protein (MAP4) contains a domain homologous to the microtubule-binding domains of neuronal MAP2 and tau. *J Cell Sci* 98, 27-36, **1991**.
57. Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7, 72-81, **1995**.
58. Weingarten, M. D. , Lockwood, A., Hwo, S., and Kirschner, M. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 1858-1862, **1975**.

59. Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153-163, **1993**.
60. Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochem* 38, 3549-3558, **1999**.
61. Arnold C. S., Johnson G. V., Cole R. N., Dong D. L., Lee M., Hart G. W., The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine, *J Biol Chem* 271, 28741-28744, **1996**.
62. Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Hart G. W., Gong C. X., O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10804-10809, **2004**.
63. Necula M., Kuret J., Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro, *J Biol Chem* 279, 49694-49703, **2004**.
64. Wischik, C. M., Crowther, R. A., Stewart, M., and Roth, M. Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 100, 1905-1912, **1985**.
65. Liu, W. K., Dickson, D. W., and Yen, S. H. Heterogeneity of tau proteins in Alzheimer's disease. Evidence for increased expression of an isoform and preferential distribution of a phosphorylated isoform in neurites. *Am J Pathol* 142, 387-294, **1993**.
66. Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L. Jr., and Trojanowski, J. Q. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675-678, **1991**.
67. Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., and Crowther, R. A. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159-168, **1992**.
68. Greenberg, S. G., Davies, P., Schein, J. D., and Binder, L. I. Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* 267, 564-569, **1992**.

69. Barghorn, S., Zheng-Fischhofer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochem* 39, 11714-11721, **2000**.
70. Wischik, C. M., Novak, M., Thogersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., Roth, M., and Klug, A. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4506-4510, **1988**.
71. von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5129-5134, **2000**.
72. von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem* 276, 48165-48174, **2001**.
73. Serpell, L. C., Fraser, P. E., and Sunde, M. X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils. *Meth Enzymol* 309, 526-536, **1999**.
74. Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 118, 573-584, **1992**.
75. Perez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., and Avila, J. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 67, 1183-1190, **1996**.
76. Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochem* 37, 10223-10230, **1998**.
77. Hasegawa, M., Crowther, R. A., Jakes, R., and Goedert, M. Alzheimer-like changes in microtubule-associated protein Tau induced by sulfated glycosaminoglycans. Inhibition of microtubule binding, stimulation of phosphorylation, and filament assembly depend on the degree of sulfation. *J Biol Chem* 272, 33118-33124, **1997**.



78. Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J., and Crowther, R. A. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383, 550-553, **1996**.
79. Schwab, C. and McGeer, P. L. Tubulin immunopositive structures resembling intracellular neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging* 19, 41-45, **1998**.
80. Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399, 344-349, **1996**.
81. Schweers, O., Mandelkow, E. M., Biernat, J., and Mandelkow, E. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8463-8467, **1995**.
82. Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., Davies, P., and Mandelkow, E. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15712-15717, **1998**.
83. King, M. E., Ahuja, V., Binder, L. I., and Kuret, J. Ligand-dependent tau filament formation: implications for Alzheimer's disease progression. *Biochem* 38, 14851-14859, **1999**.
84. Drubin, D. G. and Kirschner, M. W. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103, 2739-2746, **1986**.
85. Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112, 2355-2367, **1999**.
86. Braak, H. and Braak, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18, 351-357, **1997**.
87. Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., and Hyman, B. T. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41, 17-24, **1997**.
88. Spillantini, M. G. and Goedert, M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 21, 428-433, **1998**.
89. Wilhelmsen, K. C. The tangled biology of tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7120-7121, **1999**.

90. Jacobsen J. S., Reinhart P., Pangalos M. N., Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease, *NeuroRx* 2, 612-626, **2005**.
91. Bowen D. M., Smith C. B., White P., Davison A. N., Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies, *Brain* 99, 459-496, **1976**.
92. Davies P., Maloney A. J., Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease, *Lancet* 2, 1403, **1976**.
93. Kryger G., Silman I., Sussman J. L., Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*, *J Physiol Paris* 92, 191-194, **1998**.
94. Greenblatt H. M., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman J. L., Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution, *FEBS Lett* 463, 321-326, **1999**.
95. Farlow M., A clinical overview of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, *Int Psychogeriatr* 14, 93-126, **2002**.
96. Greenamyre J. T., Young A. B., Excitatory amino acids and Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 10, 593-602, **1989**.
97. Mattson M. P., Pedersen W. A., Duan W., Culmsee C., Camandola S., Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Ann N Y Acad Sci* 893, 154-175, **1999**.
98. Bullock R., New drugs for Alzheimer's disease and other dementias, *Br J Psychiatry* 180, 135-139, **2002**.
99. Merrifield R.B., Peptide synthesis on a solid polymer, *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* 21, 412, **1962**.
100. Kullmann, W. Enzymatic Peptide Synthesis. Boca Raton, CRC Press Inc. **1987**.
101. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., and Boyer, H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198, 1056-1063, **1977**.

102. Sheppard, R. C. Peptides "Solid phase peptide synthesis: assessment of the present position". Amsterdam, North Holland Publishing Company, **1971**.
103. Carpino L. A., Han G. Y., The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group, *J Org Chem* 37, 3404-3409, **1972**.
104. Pearson D.A., Blanchette M, Baker M.L., Guindon C.A., Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis, *Tetrahedron Lett* 30, 2739-2742, **1989**.
105. Reid G. E., Simpson R. J., Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butylloxycarbonyl amino acids, *Anal Biochem* 200, 301-309, **1992**.
106. Carpino L. A., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive, *J Am Chem Soc* 115, 4397-4398, **1993**.
107. Carpino, L. A., El-Faham, A., and Albericio, F. Racemization studies solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Lett* 35, 2279-2282, **1994**.
108. Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* 115, 4397-4398, **1993**.
109. Hesse M., Meier H., Zeeh B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart, New York, **1995**.
110. Lottspeich F., Zorbas H., *Bioanalytik*, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, **1998**.
111. Zenobi R., Knochenmuss R., Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry, *Mass Spectrom Rev* 17, 337-366, **1998**.
112. Mortz, E., Vorm, O., Mann, M., and Roepstorff, P. Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* 23, 249-261, **1994**.
113. Friebolin H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 3. Auflage, Wiley-VCH Weinheim, New York, **1999**.
114. Braunschweiler L., Ernst R.R., Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy, *J Magn Reson* 53, 521-528, **1983**.

115. Jeener J., Meier B.H., Bachmann P., Ernst R.R., Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J Chem Phys* 71, 4546-4553, **1979**.
116. Kessler H., Gehrke M., Griesinger C., Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Background and Overview of the Experiments, *Angew Chem* 100, 507-554, **1988**.
117. Meyer B., Peters T., NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors, *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 864-890, **2003**.
118. Mayer M., Meyer B., Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy, *Angew Chem Int Ed* 38, 1784-1788, **1999**.
119. Mayer M., Meyer B., Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J Am Chem Soc* 123, 6108-6117, **2001**.
120. Mayer M., STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen, Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **2001**.
121. Meinecke R., Meyer B., Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin alphaIIb beta3, *J Med Chem* 44, 3059-3065, **2001**.
122. Klein J., Meinecke R., Mayer M., Meyer B., Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR, *J Am Chem Soc* 121, 5336-5337, **1999**.
123. Jayalakshmi V., Krishna N. R., Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly ligand-receptor complexes., *J Magn Reson* 155, 106-118, **2002**.
124. Claasen B., Axmann M., Meinecke R., Meyer B., Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin alpha(IIb)beta3 in native platelets than in liposomes, *J Am Chem Soc* 127, 916-919, **2005**.
125. Otting G., NMR studies of water bound to biological molecules, *Prog NMR Spectrosc* 31, 259-285, **1997**.

126. Dalvit C., Fogliatto G., Stewart A., Veronesi M., Stockman B., WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability, *J Biomol NMR* 21, 349-359, **2001**.
127. Meyer B., Weimar T., Peters T., Screening mixtures for biological activity by NMR, *Eur J Biochem* 246, 705-709, **1997**.
128. Ni F., Recent developments in transferred NOE methods, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 26, 517-606, **1994**.
129. Chen A., Shapiro M.J., NOE Pumping: A Novel NMR Technique for Identification of Compounds with Binding Affinity to Macromolecules, *J Am Chem Soc* 120, 10258-10259, **1998**.
130. Chen A., Shapiro M.J., NOE Pumping. 2. A high-throughput method to determine compounds with binding affinity to macromolecules by NMR, *J Am Chem Soc* 122, 414-415, **2000**.
131. Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W., Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, *Science* 274, 1531-1534, **1996**.
132. Hajduk P. J., Gerfin T., Boehlen J. M., Haberli M., Marek D., Fesik S. W., High-throughput nuclear magnetic resonance-based screening, *J Med Chem* 42, 2315-2317, **1999**.
133. Hajduk P. J., Augeri D. J., Mack J., Mendoza R., Yang J., Betz S. F., Fesik S. W., NMR-Based Screening of Proteins Containing <sup>13</sup>C-Labeled Methyl Groups, *J Am Chem Soc* 122, 7898-7904, **2000**.
134. Pervushin K., Riek R., Wider G., Wuthrich K., Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12366-12371, **1997**.
135. Hajduk P.J., Olejniczak E.T., Fesik S.W., One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules, *J Am Chem Soc* 119, 12257-12261, **1997**.
136. Barjat H., Morris G. A., Smart S., Swanson A. G., Williams S. C. R., High Resolution Diffusion Ordered 2D Spectroscopy (HR-DOSY) - A New Tool for the Analysis of Complex Mixtures, *J Magn Reson* 108, 170-172, **1995**.

137. Carr H.Y., Purcell E.M., Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments, *Phys Rev* 94, 630-638, **1954**.
138. Meiboom S., Gill D., Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times, *Rev Sci Instrum* 29, 688-691, **1958**.
139. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K., Lofas S., Persson B., Roos H., Ronnberg I., et al., Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology, *BioTechniques* 11, 620-627, **1991**.
140. Turbadar T., Complete Absorption of Light by Thin Metal Films, *Proc Phys Soc* 73, 40-44, **1959**.
141. Otto A., Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmaschwingungen, *Phys Stat Solidi* 26, K99-K101, **1968**.
142. Kretschmann E., Rather H., Radiative decay of non radiative surface plasmon excited by light., *Z Naturf* 230, 2135-2136, **1968**.
143. Weimar T., Recent Trends in the Application of Evanescent Wave Biosensors, *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 1219-1221, **2000**.
144. Holmes S.D., May K., Johansson V., Markey F., Critchley I.A., Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore), *J Microbiol Meth* 28, 77-84, **1997**.
145. Xing L., Tjarnlund K., Lindqvist B., Kaplan G. G., Feigelstock D., Cheng R. H., Casasnovas J. M., Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses, *EMBO J* 19, 1207-1216, **2000**.
146. Quinn J. G., O'Neill S., Doyle A., McAtamney C., Diamond D., MacCraith B. D., O'Kennedy R., Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions, *Anal Biochem* 281, 135-143, **2000**.
147. Biacore AB Uppsala, "Analysis at the Speed of Light", *Biajournal* 1, 4-5, **1994**.
148. Karlsson R., Stahlberg R., Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities, *Anal Biochem* 228, 274-280, **1995**.
149. Coksezen, A., Diplomarbeit: "Studien zur Aggregation des  $\tau$ -Proteins - einem pathologischen Prozess der Alzheimer Demenz", Dissertation, University of Hamburg, Hamburg, **2002**.

## 11 Anhang (NMR-Pulsprogramme)

STD NMR am 700MHz-Spektrometer „std.t4\_3.bc“

```
;std.t4_3.bc
;avance-version (03/10/10)
;1D sequence
;  for saturation transfer difference
;with shaped pulse train for saturation on f2 channel
;with spinlock to suppress protein signals
;alternating between on and off resonance
;  to be defined by fq2list
;
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1784-1788 (1999)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. 111, 1902-1906 (1999).

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

"d12=20u"
"p29=d29"
"l5=d20/p13+0.5"
"d31=p13*15"
"DELTA1=d1-d31"

1 ze
  10u st0
2 30m
  4u BLKGRAD
  d12 fq2:f2 st
  50u UNBLKGRAD
  4u p110:f1
  (p17 ph2)
  (p17*2 ph3)
  4u
  p30:gp1
  10m p11:f1
  4u BLKGRAD
  DELTA1
3 (p13:sp13 ph4):f2
  4u
  lo to 3 times 15
  p1 ph1
  4u p129:f1
  (p29 ph21)
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp2
  d16 p118:f1
  p28*0.23077 ph5
  d19*2
  p28*0.69231 ph5
  d19*2
  p28*1.46154 ph5
  d19*2
  p28*1.46154 ph6
  d19*2
  p28*0.69231 ph6
  d19*2
  p0*0.23077 ph6
```

```
46u
p16:gp2
d16
go=2 ph31
30m wr #0 if #0
4u BLKGRAD
d31
exit

ph1=0 0 2 2
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=0 0 1 1 2 2 3 3
ph6=2 2 3 3 0 0 1 1
ph21=1 1 3 3
ph31=0 2 0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default) [120 dB]
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p129: f1 channel - power level as for TOCSY-spinlock
;sp13: f2 channel - shaped pulse for saturation [35 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - high power pulse
;p13: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p29: f1 channel - trim pulse
;p30: gradient pulse [5 msec]
;d1 : relaxation delay: 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d20: saturation time
;d29: spinlock time [10 - 50 msec]
;d31: saturation time as executed
;l5: loop for saturation: (p11 + d20) * 15 = saturation time
;NS: 16 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 16
;gp1: gradient for spinlock
;gp2: gradient for watersupression
;define FQ2LIST (irradiation frequencies, alternating on/off resonance)
; (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/f1")
;use gradient ratio: gp 1
; 40
;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: 20%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;$Id: $
```



## TOCSY am 500 MHz Spektrometer „mlevgptp19“

```
;mlevgptp19
;avance-version
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
;   for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
;   Series A 102, 241 -245 (1993)

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

;;"p5=p6*.667"
;;"p7=p6*2"
;;"d0=3u"
;;"d12=20u"

1 ze
2 d1
3 d12 p11:f1
  p1 ph1
  d0
  d12 p110:f1
  (p17 ph26)
4 (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 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 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
lo to 4 times l1
  (p17 ph26)
50u UNBLKGRAD
p16:gpl
d16
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
```

```

46u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph4=0 0 1 1 2 2 3 3
ph5=2 2 3 3 0 0 1 1
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p110
;
;      use for fine adjustment
;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
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p110
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
;      20 : 20

```

## NOESY am 500 MHz Spektrometer „noesygtp19“

```

;noesygtp19
;avance-version
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using TPPI
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

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

;;"d0=3u"
;;"d12=20u"

1 ze
2 d1
3 d12 pl1:f1
  pl ph1
  d0
  pl ph2
  d8:r
  pl ph3
  d12 pl18:f1
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16
  p28*0.231 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph5
  d19*2
  p28*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
  lo to 3 times td1
exit

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

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18
; use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

```

```

;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time with variable delay V9
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 20 : 20

```

### TOCSY am 700 MHz Spektrometer „mlevgpphw5“

```

;mlevgpphw5
;avance-version (00/10/05)
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
; for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;phase sensitive
;water suppression using watergate W5 pulse sequence with gradients
;using double echo
;
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J.K. Nicholson & J.C. Lindon,
; J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)

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

"p2=p1*2"

"p5=p6*.667"

"p7=p6*2"

"d12=20u"

"d0=in0/2-p1*2/3.1416-4u"

"SCALEF=p7*2/p5+0.5"
"FACTOR1=((d9-p17*2)/(p6*64+p5))/SCALEF+0.5"
"l1=FACTOR1*SCALEF"

1 ze
2 d1
3 d12 p11:f1
  p1 ph1
  d0
  4u p110:f1
  (p17 ph26)

```

```

;begin MLEV17
4 (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 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 4 times 11

;end MLEV17

(p17 ph26)

50u pl18:f1 UNBLKGRAD
p16:gp1
d16
p27*0.087 ph2
d19*2
p27*0.206 ph2
d19*2
p27*0.413 ph2
d19*2
p27*0.778 ph2
d19*2
p27*1.491 ph2
d19*2
p27*1.491 ph3
d19*2
p27*0.778 ph3
d19*2
p27*0.413 ph3
d19*2
p27*0.206 ph3
d19*2
p27*0.087 ph3
50u
p16:gp1
d16

4u

p16:gp2
d16
p27*0.087 ph4
d19*2
p27*0.206 ph4
d19*2
p27*0.413 ph4
d19*2
p27*0.778 ph4
d19*2
p27*1.491 ph4
d19*2
p27*1.491 ph5

```

```

d19*2
p27*0.778 ph5
d19*2
p27*0.413 ph5
d19*2
p27*0.206 ph5
d19*2
p27*0.087 ph5
p16:gp2
d16

4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 1 1 2 2 3 3
ph3=2 2 3 3 0 0 1 1
ph4=0
ph5=2
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p118: f1 channel - power level for W5-pulse (watergate)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 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
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;l1: loop for MLEV cycle: ((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEC
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 34 : 22
;for z-only gradients:
;gpz1: 34%
;gpz2: 22%
;use gradient files:
;gpnaml: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

```

<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-HSQC am 500 MHz Spektrometer „hsqcetgpsi“

```
;hsqcetgpsi
;avance-version (02/07/15)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn.
; Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114,
; 10663-5 (1992)
;J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky,
; S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Griesinger, J. Biomol. NMR 4,
; 301-306 (1994)

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

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d0=3u"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d13=4u"
"DELTA1=d13+p16+d16+4u"

#   ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+50u+larger(p2,p22)+d0*2"
#   else
"DELTA=p16+d16+50u+p2+d0*2"
#   endif /*LABEL_CN*/

1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
  d4 p12:f2
  (center (p2 ph1) (p4 ph6):f2 )
  d4
  p28 ph1
  d13
  (p1 ph2) (p3 ph3):f2
  d0

#   ifdef LABEL_CN
  (center (p2 ph7) (p22 ph1):f3 )
#   else
  (p2 ph7)
#   endif /*LABEL_CN*/
```

```

d0
50u UNBLKGRAD
p16:gp1*EA
d16
(p4 ph4):f2
DELTA
(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
d24
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d24
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
d4
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d4
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
d13
p16:gp2
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
      F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0
ph7=0 0 2 2
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;cnst2: = J(XH)

```



```

;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2
;                       80 : 20.1   for C-13
;                       80 :  8.1   for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;           option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end

;$Id: hsqcetgpsi,v 1.3 2002/07/16 12:41:06 ber Exp $

```

### <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY am 700 MHz Spektrometer „cosy90”

```

;cosy90
;avance-version
;2D homonuclear shift correlation
;W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, J. Chem. Phys. 64, 2229 (1976)
;K. Nagayama et al., J. Magn. Reson. 40, 321 (1980)

#include <Avance.incl>

; ;"d0=3u"

1 ze
2 d1
3 p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 zd
  lo to 3 times td1
exit

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

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: QF

```

```
13C, 1H-HSQC am 700 MHz Spektrometer „inviedetgs“
;inviedetgs
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;with multiplicity editing during selection step
;W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum & W. Bermel, Magn. Reson.
; Chem. 31, 287-292 (1993)

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

;;"p2=p1*2"
;;"p4=p3*2"
;;"d0=3u"
;;"d4=1s/(cnst2*4)"
;;"d11=30m"
;;"d13=3u"

"l3=(td1/2)"

"d20=d24-p16-d16-p2-d0*2"
"d21=d4-p16-d13-4u"

1 ze
  d11 pl12:f2
2 d1 do:f2
3 d11
  18m
4 (p1 ph1)
  d4 pl2:f2
  (p2 ph1) (p4 ph6):f2
  d4 UNBLKGRAD
  p28 ph1
  d13
  (p1 ph2) (p3 ph3):f2
  d0
  p2 ph5
  d0
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  d20
  (p2 ph1) (p4 ph4):f2
  d24
  (p1 ph1) (p3 ph4):f2
  d4
  (p2 ph1) (p4 ph1):f2
  d13
  GRADIENT(cnst22)
  d21 pl12:f2
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31 cpd2:f2
  d1 do:f2 wr #0 if #0 zd
  lo to 3 times 2
```

```

d11 id0
  3m ip3
  3m ip3
  3m ip6
  3m ip6
  3m ip31
  3m ip31
  lo to 4 times 13
exit

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

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: =d24-p16-d16-p2-d0*2
;d21: =d4-p16-d13-4u
;d24: set d24 according to multiplicity selection
; 1/(2J(XH)) XH, XH3 positive, XH2 negative
;L3: loop for phase sensitive 2D using E/A method : 13 = td1/2
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16, but 2 * ns * m
;td1: number of experiments
;MC2: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient program (GRDPROG) : 2sineea

;use gradient ratio: cnst21 : cnst22 : cnst23 : cnst24
; 80 : 20 : 80 : -20 for C-13
; 80 : 8 : 80 : -8 for N-15

```

$^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -HMBC am 700 MHz Spektrometer „inv4gslplrndpr“

```
;inv4gslplrnd
;avance-version
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;optimized on long range couplings
;with low-pass J-filter to suppress one-bond correlations
;no decoupling during acquisition
;using gradient pulses for selection

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

"p2=p1*2"
"d0=3u"
"d2=1s/(cnst2*2)"
"d13=3u"

1 ze
2 d11
3 d12 p19:f1
  d1 cw:f1
  d13 do:f1
  d12 p11:f1
  p1 ph1
  d2
  p3:f2 ph3
  d6
  p3:f2 ph4
  d0
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  p2 ph2
  50u
  GRADIENT(cnst22)
  d16
  d0
  p3:f2 ph5
  d13
  GRADIENT(cnst23)
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d1 do:f2 wr #0 if #0 id0 zd
  lo to 3 times td1
exit

ph1=0
ph2=0 0 0 0 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0 2
ph5=0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph31=0 2 0 2 0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0
```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH
;d6 : delay for evolution of long range couplings
;d13: short delay [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: QF

;use gradient program (GRDPROG) : 3sine
;use gradient ratio: cnst21 : cnst22 : cnst23
; 50 : 30 : 40 for C-13
; 70 : 30 : 50 for N-15

```

## Mein Dank gilt...

...meiner Familie, meinen Eltern **Filiz** und **Erhan Çoksezen** und meinem Bruder **Kartal**. Ohne Eure finanzielle Unterstützung, Eure Liebe und Eure Zuversicht hätte ich das so nicht geschafft...

...den Menschen, die mir besonders nah stehen und standen. Durch die Zeit mit Euch habe ich die Kraft erhalten, die ich brauchte...

...dem gesamten Arbeitskreis B. Meyer für die so schöne Zeit, den Spaß, den wir zusammen hatten und die Unterstützung...

...meinen Kommilitonen Benjamin Wenzke, Christian Piel, Dalibor Vukadinovic-Tenter und Jan Plog für das schöne Studium...

...dem gesamten Institut für Organische Chemie, dafür, dass ich mich im Hause wohl gefühlt habe...

... Axel Neffe, Birgit Claasen, Boris Kröplin, Britta Hünnefeld, Christian Flügge, Christian Seeberger, Dennis Wilhelm, Dirk Rehders, Heiko Möller, Jan-Christoph Westermann, Katharina Wallach, Kolja Klein, Marco Axmann, Martin Hollinger, Mirko Lindner, Robert Meinecke, Robin Job, Sabine Kainz, Stephan Franke, Svenja Scheid, Thomas Hackl, Thomas Kühnemund, Volker Sinnwell und Winrich Scherres...

...für fachliche Diskussionen jeglicher Art, Mithilfe und Hilfe:

- an den NMR-Spektrometern
- zum Thema NMR
- am MALDI
- am ESI
- an den HPLCs
- an der Mikrowelle
- mit Sybyl
- zur Gelelektrophorese
- an den PCs
- an den Workstations und
- bei der Durchsicht des Manuskripts dieser Dissertation...

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten:*

Name Atilla Çoksezen  
Geburtsort/-datum Istanbul, 22.07.1977

### *Promotion:*

05/2002 - 11/2006 Promotion am Institut für Organische Chemie der Universität  
Hamburg: „Untersuchung von Inhibitoren der pathologischen  
Aggregation des Tau-Proteins bei der Alzheimer Krankheit“.  
12/01/2007 Tag der Disputation

### *Diplom-Chemie:*

03/2002 Abschluss: Diplom-Chemiker (Note 1.5)  
08/2001 - 03/2002 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität  
Hamburg: „Studien zur Aggregation des Tau-Proteins - einem  
pathologischen Prozess der Alzheimer Demenz“.  
10/1996 - 03/2002 Studium der Chemie an der Universität Hamburg  
Schwerpunkte: Organische Chemie, biomolekulare  
Wechselwirkungen.

### *Schulbildung:*

06/1996 Allgemeine Hochschulreife (Note 1.8)  
07/1987 - 06/1996 Detlefsenschule in Glückstadt  
06/1983 - 06/1987 Grundschule in Glückstadt

### *Stipendien:*

10/2003 - 09/2005 Graduiertenförderung der Friedrich-Naumann-Stiftung  
08/1998 - 03/2002 Grundförderung der Friedrich-Naumann-Stiftung

**Anstellungsverhältnisse:**

- 05/2002 - 06/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg (Betreuung zweier NMR-Spektrometer: Betrieb, Störungsbeseitigung, Einweisung neuer Anwender, Betreuung von Praktikanten).
- 06/2005 - 12/2005 Projektanalysen für eine internationale Pharmafirma und eine Mineralölfirma über die Alepharma oHG (Charakterisierung eines Glycopeptids; Bestimmung des <sup>1</sup>H-Gehalts in Flugkerosinproben per NMR).
- 10/2002 - 12/2002 Projektanalyse für eine internationale Pharmafirma über die Alepharma oHG (Untersuchung von Protein/Ligand-Komplexen).
- 11/1998 - 03/2002 Anstellungen als studentische Hilfskraft in den Instituten für Organische Chemie und Anorganische Chemie der Universität Hamburg (NMR-Automation, Synthesen für eine forschende Dentalfirma, Verwaltung des Glassatzes im Grundpraktikum).

**Veröffentlichungen:**

Gregor Larbig, M.Pickhardt, I. Khlistunova, B. Schmidt, E.-M.Mandelkow, E.Mandelkow, A.Coksezen, B.Meyer: „*Phenylthiazol-hydrazide and its derivatives as inhibitors of tau aggregation in vitro and in cells*“ in Vorbereitung.

A.Coksezen, M.Pickhardt, E.-M.Mandelkow, E.Mandelkow, B.Meyer: „*NMR-spectroscopic characterization of the minimal aggregation motive of tau protein*“ in Vorbereitung.

**Poster:**

Möller, H. M., Wulfken, J., Schulte, B., Coksezen, A. und Meyer, B.: „Optimization of CD4-binding peptide mimetics as HIV-entry inhibitors.“ *2<sup>nd</sup> International Symposium on Conformational Control of Biomolecular Function of the VW Foundation*, Lübeck, **2001**.





Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 24. Oktober 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Atilla Çoksezen', written in a cursive style.

Atilla Çoksezen