

**Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Wirkstoffdesign:
Ligandbindung an membranständige Proteine in lebenden
Zellen und die Identifizierung einer Leitstruktur als *entry-*
Inhibitor der SARS-CoV Infektion**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marco Axmann

aus Oldenburg

Hamburg, März 2007



Universität Hamburg



für Gesine & Lenn

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

Disputation am 25. Mai 2007

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde von August 2003 bis Oktober 2006 im Institut für Organische Chemie, Department Chemie der Universität Hamburg, Leiter Prof. Dr. Chris Meier, durchgeführt.

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

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	i
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Protein-Ligand-Wechselwirkungen	1
1.1.1 Die Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	1
1.1.2 Essenzielle Typen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.....	2
1.1.3 Entropische Beiträge zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen.....	2
1.1.4 Ein Beispiel für die Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen.....	3
1.2 Ligandbindung an Membranproteine	4
1.2.1 Membrangebundene Rezeptorproteine	4
1.2.2 Das Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ – cycloRGDfV System.....	5
1.2.3 Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2)	6
1.3 Das Schwere Akute Atemwegssyndrom (SARS)	7
1.3.1 Coronaviren.....	7
1.3.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV)	8
1.3.3 Die SARS-CoV-Infektion.....	9
2 METHODEN	11
2.1 Festphasenpeptidsynthese	11
2.2 Charakterisierung von Peptiden	13
2.2.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie	13
2.2.2 NMR-Spektroskopie.....	14
2.3 Protein-Ligand Bindungsstudien.....	16
2.3.1 <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR)-Sensorchipsystem.....	16
2.3.2 Die <i>Saturation Transfer Difference</i> (STD) NMR-Spektroskopie	19
2.4 SARS-CoV Inhibitionsassays	22
3 AUFGABENSTELLUNG	24
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	26
TEIL A.....	26
4.1 NMR-Spektroskopie mit humanen Thrombozyten.....	26
4.1.1 Präparation der Zellsuspensionen	26
4.1.2 STD NMR-Spektroskopie mit humanen Thrombozyten	27
4.1.3 STDD NMR-Spektroskopie - Der doppelte Differenzfilter.....	28
4.1.4 Die Bindung von cycloRGDfV an humane Thrombozyten.....	31
4.2 Diskussion	33
TEIL B.....	34
4.3 Bindungsstudien von RBD-Peptiden des SARS-CoV und ACE2	34
4.3.1 Synthese der Peptidbibliothek B1	34
4.3.2 SPR- <i>screening</i> der RBD-Peptide aus der Bibliothek B1	36
4.3.3 Synthese der Peptidbibliothek B2	43

4.3.4	SPR- <i>screening</i> der RBD-Peptide aus der Bibliothek B2	44
4.3.5	STD NMR Bindungsepitop des Liganden 18	47
4.3.6	STD NMR Bindungsepitop des Liganden 11	51
4.3.7	Synthese des Fusionspeptids 31	55
4.3.8	SPR-Bindungsstudien des Fusionspeptids 31	57
4.3.9	STD NMR Bindungsepitop des Fusionspeptids 31	58
4.4	SARS-CoV Inhibitionsassay mit Peptid 18 (YKYRYL)	60
4.4.1	Plaque-Assay	60
4.4.2	<i>real-time</i> RT-PCR Reduktionsassay	61
4.5	SPR-Bindungsstudien von Peptidanaloga der Leitstruktur Y438-L443	64
4.5.1	Synthese der Peptidbibliothek B3	64
4.5.2	SPR-Bindungsstudien der Peptidanaloga aus der Bibliothek B3	65
4.6	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	73
4.7	Diskussion	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	SUMMARY	81
7	EXPERIMENTELLER TEIL	84
7.1	Chemikalien	84
7.2	Verwendete Geräte und Software	86
7.3	NMR Experimente mit humanen Thrombozyten	88
7.3.1	Umpufferung der humanen Thrombozyten in TBS-Puffer	88
7.3.2	STD NMR Messungen mit Thrombozyten	88
7.3.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung von cycloRGDfV	89
7.4	Peptidsynthesen	91
7.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Peptidsynthese	91
7.4.2	Automatisierte Festphasenpeptidsynthesen	93
7.4.3	Automatisierte Synthese der Peptide 1-31 und 35-41	94
7.4.4	Manuell Synthese der Peptide 18, 32-34	94
7.4.5	Identifizierung der Peptide mit MALDI-TOF-MS	96
7.5	SPR-Experimente	96
7.5.1	Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip	96
7.5.2	SPR-Bindungsuntersuchungen	98
7.6	NMR-Experimente	100
7.6.1	Charakterisierung der Peptide 11 , 18 und 31	100
7.6.2	STD NMR mit ACE2	106
7.7	Toxikologie und Handhabung der Chemikalien	110
8	LITERATUR	112
9	DANKSAGUNG	123
10	LEBENS LAUF	124

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
AEBSF-HCl	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
AVL	<i>lysis buffer for viral nucleic acid purification</i> (Qiagen)
1D, 2D	ein-, zweidimensional
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
CCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CM	carboxymethyliert
CoV	Coronavirus
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EC50	<i>effective concentration (in vivo) 50%</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	extrazelluläre Matrix
Fmoc	9 <i>H</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl
ΔG	freie Bindungenthalpie
GP	Glycoprotein
GPCR	<i>G-protein-coupled receptors</i>
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR-C, HR-N	<i>heptad repeat region-C, -N</i>
IC	intrazelluläre Domäne
IC50	<i>inhibitory concentration 50%</i>
IgG	Immunglobulin G
k _{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K _i	Bindungskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ ionisation - time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmbar

NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
PAL	<i>peptide amide linker</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFU	<i>plaque forming units</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
RBD	<i>receptor binding domain</i>
RBM	<i>receptor binding motif</i>
rhACE2	<i>recombinant human angiotensin converting enzyme 2</i>
RIA	<i>radio immuno assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RRA	<i>radioreceptor assay</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
RU	<i>resonance unit</i>
SAR	<i>structure activity relationship</i>
SARS	<i>severe acute respiratory syndrom</i>
SPA	<i>scintillation proximity assay</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
STDD	<i>saturation transfer double difference</i>
T	Temperatur
T ₁ , T ₂	longitudinale-, transversale Relaxationszeit
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TIRFM	<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TM	Transmembrandomäne
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
trNOE	<i>transferred NOE</i>
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
UV	<i>ultraviolet</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
VIS	<i>visible</i>
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>world health organisation</i>

Tabelle 1: Aminosäurebezeichnungen und deren Abkürzungen

Aminosäure	Abkürzung	Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
D-Phenylalanin	-	f
4-Benzoyl-Phenylalanin	Bpa	-
Citrullin	Cit	-
Cyclohexylalanin	Cha	-
4-Fluor-Phenylalanin	Phe(4-F)	F _f

1 EINLEITUNG

In dieser Doktorarbeit wurden Protein-Ligand-Wechselwirkungen vor dem Hintergrund der methodischen Weiterentwicklung und des Wirkstoffdesigns untersucht. Für die durchgeführten Studien wurden die *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie sowie die *surface plasmon resonance* (SPR)-Technik verwendet. Im ersten Teil der Arbeit wurde die STD-Methode auf das Protein-Ligand-System Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -cycloRGdFV in lebenden Thrombozyten angewandt und weiterentwickelt. Im zweiten Teil wurden das STD- sowie das SPR-Verfahren dazu eingesetzt, um eine potentielle Leitstruktur für das Design von *entry*-Inhibitoren der SARS-Coronavirus Infektion zu identifizieren. Dafür wurde das Protein-Ligand-System, bestehend aus viralen Peptiden aus der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des S-Proteins (*spike* Protein) und dem humanen Rezeptorprotein *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) etabliert und studiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine neue Methode zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen an Membranproteinen in lebenden Zellen bereit.¹ Darüber hinaus liefern die Bindungseigenschaften der gefundenen Leitstruktur wichtige Informationen für die Entwicklung von Inhibitoren der SARS-CoV Infektion.

In den folgenden Kapiteln soll zunächst ein Einblick in die Theorie der Protein-Ligand-Wechselwirkungen gegeben und die untersuchten Membranproteine kurz vorgestellt werden. Im letzten Abschnitt der Einleitung wird ein Überblick über das Schwere Akute Atemwegssyndrom (SARS) und das damit assoziierte Coronavirus gegeben.

1.1 Protein-Ligand-Wechselwirkungen

1.1.1 Die Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Die Bindung eines Wirkstoffs an ein Zielmolekül, meistens ein Protein, ist die Voraussetzung zur Entfaltung seiner Wirkung. Damit sich spezifische Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein ausbilden können, ist es notwendig, dass die Oberflächeneigenschaften der beiden Bindungspartner zueinander passen.^{2;3} Die Stärke derartiger Protein-Ligand-Wechselwirkungen lässt sich experimentell bestimmen und durch die charakteristische Größe der Bindungs- (K_i) bzw. der Dissoziationskonstanten (K_D) quantifizieren. Dabei ist K_D eine thermodynamische Größe, die angibt, welcher Anteil des Liganden im Mittel an das Protein gebunden ist und hat die Dimension einer Konzentration. Statt der Konstanten wird häufig auch die freie Bindungsenthalpie ΔG angegeben. Experimentell bestimmte Bindungskonstanten liegen häufig in einem Bereich zwischen 10^{-2}

und 10^{-12} M, entsprechend einer Freien Standardbindungsenthalpie von -10 bis -80 kJ/mol in wässriger Lösung bei $T = 298$ K.^{4;5} Ferner wird oft statt des K_D -Wertes ein so genannter IC_{50} -Wert bestimmt, der angibt, bei welcher Ligandkonzentration die Aktivität des Proteins auf die Hälfte absinkt.

1.1.2 Essenzielle Typen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Die nichtkovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen können generell in drei Kategorien eingeteilt werden: Wasserstoffbrückenbindungen, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen. Wasserstoffbrückenbindungen sind elektrostatische Wechselwirkungen, die durch eine ausgeprägte Abstands- und Winkelabhängigkeit gekennzeichnet sind. Polare Gruppen werden in der Regel durch Wasserstoffbrückenbindungen abgesättigt.⁶ Für geladene Gruppen des Liganden wird häufig beobachtet, dass sie an entgegengesetzt geladene Gruppen des Proteins binden. Diese ionischen Wechselwirkungen (Salzbrücken) sind besonders stark, wenn die Ladungen zwischen 2.7 und 3.0 Å voneinander entfernt liegen.² Befinden sich lipophile Gruppen im Liganden, etwa aliphatische bzw. aromatische Kohlenwasserstoffe, Halogensubstituenten sowie Heterocyclen, können diese durch enge Nachbarschaft zu unpolaren Aminosäure-Seitenketten des Proteins hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden. Diese sind im Gegensatz zu den Wasserstoffbrückenbindungen nicht gerichtet mit Ausnahme der Aromaten, für die es bevorzugt relative Anordnungen gibt (π -stacking).⁷ Obwohl die direkten Anziehungskräfte zwischen den lipophilen Gruppen gering sind, haben hydrophobe Wechselwirkungen oft den wichtigsten Beitrag zur Bindungsaffinität. Die Triebkraft dabei ist von entropischer Natur und liegt in der Verdrängung oder Freisetzung von Wassermolekülen aus der lipophilen Umgebung.

1.1.3 Entropische Beiträge zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Da alle biochemischen Vorgänge in wässriger Umgebung stattfinden, darf bei der Betrachtung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen der Einfluss der Wassermoleküle nicht vernachlässigt werden.^{2;4} Sowohl das Protein mit seiner Ligandbindungsdomäne als auch der Ligand selbst sind vollständig von Wasser umgeben, dessen Moleküle ein mehr oder weniger stark ausgebildetes Wasserstoffbrückenbindungsnetz zu den hydro- und lipophilen Bereichen der jeweiligen Moleküloberfläche ausbilden. Kommt es zu einer Bindung zwischen Protein und Ligand, werden zahlreiche Wassermoleküle verdrängt, viele Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen sowie neue ausgebildet. Der Gewinn an freier Bindungsenergie ist für einen derart komplexen Vorgang schwer vorhersagbar und wird durch die relative Stärke der

verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungen – die Gesamtzahl dieser Bindungen kann bei einer Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand durchaus konstant bleiben – sowie durch entropische Beiträge bestimmt. So ist z.B. ein lipophiler Kontakt zwischen Protein und Ligand im Wesentlichen entropischer Natur, da sich für das System Protein-Ligand-Wasser insgesamt die Zahl der Freiheitsgrade durch Assoziation des Liganden an das Protein günstig verändert. Der Erhöhung der Freiheitsgrade, die hauptsächlich durch die verdrängten Wassermoleküle bedingt sind, stehen ein Verlust an Translations- und Rotations-Freiheitsgraden der zuvor frei beweglichen Protein- und Ligandmoleküle gegenüber. Darüber hinaus kann der an das Protein gebundene Ligand nur noch eine Konformation einnehmen und befindet sich daher in einem entropisch ungünstigen Zustand. Die entropische Kompensation durch die freigesetzten Wassermoleküle ist in erster Näherung proportional zur Größe der hydrophoben Oberfläche.

1.1.4 Ein Beispiel für die Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen

In der Arbeitsgruppe von Paul A. Bartlett wurden Inhibitoren der Metalloprotease Thermolysin synthetisiert, in denen ein Phosphonamid $-\text{PO}_2\text{NH}-$ gegen ein Phosphonat $-\text{PO}_2\text{CH}_2-$ bzw. ein Phosphinat $-\text{PO}_2\text{O}-$ ersetzt wurde (Abbildung 1).^{8;9}

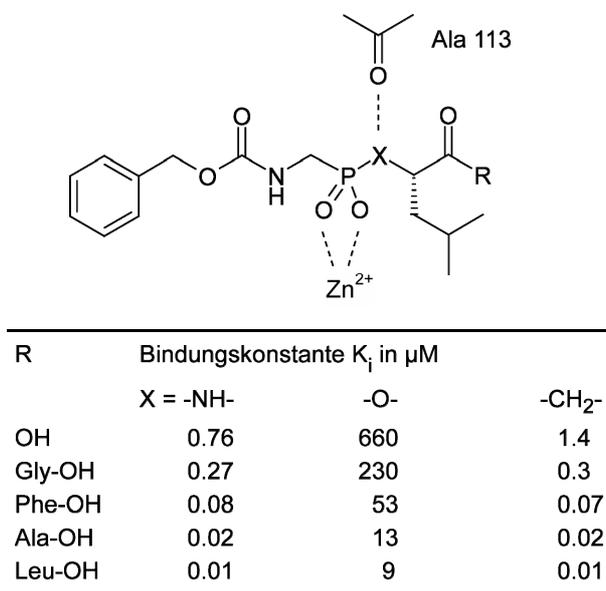


Abbildung 1: Bindungskonstanten K_i für Thermolysin-Inhibitoren, die entweder ein Phosphonamid ($X = -\text{NH}-$), ein Phosphonat ($X = -\text{O}-$) oder ein Phosphinat ($X = -\text{CH}_2-$) enthalten (Quelle: Böhm, H. J.; Klebe, G.; Kubinyi, H., *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 2002).

Aus der Röntgenstrukturanalyse ergibt sich, dass die NH-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Sauerstoff der Carbonylgruppe von Ala 113 ausbildet. Dennoch kann die Amidgruppe ohne Verlust der Bindungsaffinität durch eine CH₂-Gruppe ersetzt werden, da sowohl für das Phosphonamid als auch für das Phosphinat die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen vor und nach der Bindung jeweils unverändert bleibt.

Wird die NH-Gruppe durch ein Sauerstoffatom substituiert, bricht die Bindung fast vollständig zusammen und, wie anhand der K_i-Werte abzulesen ist, die Affinität sinkt um den Faktor 1000. Der Grund dafür ist die elektrostatische Abstoßung der Sauerstoffatome von Ala 113 und des Phosphonats -PO₂O-, die sich im Protein-Ligand-Komplex genau gegenüberstehen und damit die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr gegeben ist.

1.2 Ligandbindung an Membranproteine

1.2.1 Membrangebundene Rezeptorproteine

Die Strukturanalyse sowie Untersuchungen hinsichtlich der Funktion und den Wechselwirkungen mit Liganden für Membranproteine sind im Vergleich zu löslichen Proteinen deutlich erschwert. Obwohl einige Membranproteine kristallographisch untersucht wurden¹⁰⁻¹⁶, existieren keine hochaufgelösten Strukturen von pharmakologisch relevanten, membrangebundenen Rezeptoren. Die Gewinnung und Rekonstitution der Proteine geht oft mit strukturellen Veränderungen und damit einem Verlust der Aktivität einher. Die membrangebundenen Proteine, insbesondere die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), stellen interessante Angriffspunkte für das Wirkstoffdesign dar¹⁷⁻²¹. Es wechselwirken bereits 30-50% aller pharmazeutischen Wirkstoffe mit dieser Proteinklasse.^{22,23} Umso wichtiger erscheinen Bindungsassays für das Ligandscreening oder *structure activity relationship* (SAR) Studien an Membranproteinen, die in ihrer natürlichen Umgebung und im Idealfall direkt in der Rezeptorzelle belassen werden. Zwar sind manche Membranproteine in einer prozessierten Form ohne den Membrananteil verfügbar, jedoch können diese löslichen Proteine in Affinitätsmessungen stark veränderte Ligandbindungseigenschaften aufweisen. Für die GPCRs ist die Isolierung aus der Membran prinzipiell nicht ohne Verlust der Aktivität möglich, da meist mehrere auf dem Helixbündel exponierte Schleifen ein sequenziell diskontinuierliches Bindungsepitop darstellen.

Für Bindungsstudien an Membranproteinen, die dazu bevorzugt in Lipiddoppelschichten eingebettet vorliegen, wurden Methoden wie etwa *total internal reflection fluorescence*

microscopy (TIRFM)^{24;25}, *surface plasmon resonance* (SPR)²⁶⁻²⁸ sowie Enzym Immunoassays wie ELISA, der *scintillation proximity assay* (SPA)^{29;30}, Radioassays wie RIA (*radio immuno assay*)³¹ und RRA (*radioreceptor assay*)³² adaptiert. Darüber hinaus wurden zahlreiche NMR-spektroskopische Methoden, wie z.B. *transferred nuclear Overhauser enhancement* (trNOE) Spektroskopie³³⁻³⁵, *structure activity relationship* (SAR) by NMR^{36;37}, *NOE pumping*³⁸⁻⁴⁰ sowie *competitive binding spectroscopy*⁴¹ zum *screening* und zur Beschreibung von Protein-Ligand Bindungsprozessen entwickelt.

1.2.2 Das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ – cycloRGDfV System

Das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ gehört zur Proteinfamilie der Integrine, welche heterodimere Zelladhäsionsrezeptoren darstellen. Sie vermitteln Wechselwirkungen zu Nachbarzellen und zu extrazellulären Matrixproteinen (EM-Proteine). Es handelt sich um glycosylierte Transmembranproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen.^{42;43} Sowohl für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten als auch für die Ligandbindungseigenschaft des Komplexes sind zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+}) essenziell.

Das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ wird auf den Vorläuferzellen der Thrombozyten (Megakaryozyten) exprimiert und ist neben CD42b (GPIb-V-IX) und kleinen Anteilen an Integrin $\alpha_2\beta_1$ (CD49b / CD29) und $\alpha_v\beta_3$ mit einer Anzahl von etwa 40000-80000 Molekülen pro Zelle das häufigste Rezeptormolekül auf den Blutplättchen. In der Literatur werden oft noch frühere Bezeichnungen wie Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) oder auch CD41/CD61 gefunden.⁴⁴⁻⁴⁷

Das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ gehört, wie auch das Integrin $\alpha_v\beta_3$, der β_3 -Subfamilie an und bindet über das RGD-Motiv an verschiedene extrazelluläre Matrix-Proteine im Blutplasma wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und den von-Willebrand-Faktor (vWF) mit unterschiedlicher Affinität.^{48;49} Die Interaktionen der Blutplättchenintegrine spielen eine wesentliche Rolle bei der primären und sekundären Hämostase. Dabei aggregieren die Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand, werden über Fibrinogenmoleküle miteinander vernetzt und bilden einen Pfropf. Neben den nativen RGD-Domänen in Proteinen binden auch kleinere Fragmente, synthetische Oligopeptide und Cyclopeptide mit dem RGD-Motiv an das Integrin und inhibieren dadurch die Zellaggregation. Dabei haben die flankierenden Aminosäuren und die Konformation der RGD-Sequenz großen Einfluss auf die Affinität und Selektivität.^{50;51}

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Ligand des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ist das zyklische Pentapeptid cycloRGDfV, welches als potenter Inhibitor für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ von Kessler *et*

al. entwickelt wurde. Neben einer hohen Affinität im nanomolaren Bereich für Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet cycloRGDFV mit einer Bindungskonstante von 5 μ M auch an Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$.^{23;52}

1.2.3 Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2)

Im Jahr 2000 stellten die Gruppen von Donoghue *et al.* und Tipnis *et al.* das erste bekannte homologe Protein des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) vor.^{53;54} Bis dahin galt ACE als Schlüsselprotein des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), welches für die Blutdruckregulierung von entscheidender Bedeutung ist. Das homologe Protein wurde ACE2 genannt und ist überwiegend im Endothelium von Herz und Niere sowie zu einem geringeren Anteil im Magen-Darm-Trakt und den Lungen exprimiert.^{55;56} Die beiden Enzyme ACE und ACE2 sind Typ 1 Transmembranproteine und obwohl die Aminosäuresequenzen der beiden Zink-Metalloproteasen in den katalytischen Domänen zu 42% identisch sind, weisen die Enzyme unterschiedliche Substratspezifitäten auf, die wichtige physiologische Konsequenzen haben. Während ACE an der Bildung des gefäßverengenden Angiotensin II beteiligt ist, fördert ACE2 vermutlich die vermehrte Produktion von Angiotensin(1-7) und Angiotensin(1-9), die u. a. als blutdrucksenkende Mediatoren im RAS auftreten.⁵⁷ ACE2 gilt neben ACE mittlerweile als wichtiger Regulator des Herz-Kreislauf-Systems.⁵⁸

Darüber hinaus zeigten Li *et al.* im November 2003, dass ACE2 ein funktioneller Rezeptor für das SARS assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) darstellt.³⁵ Aus deren Studie geht ebenso hervor, dass das Virus spezifisch an ACE2 assoziiert, und nicht an sein verwandtes homologes Protein ACE. Die Bindung erfolgt fernab der katalytischen Peptidasedomäne von ACE2 und so zeigen Mutationsstudien in der Zink-koordinierenden-Region keinen Einfluss auf die Virus-Rezeptor-Interaktion. Wie aus einer Röntgenkristallstrukturanalyse des Komplexes aus ACE2 und dem Inhibitor MLN-4760 hervorgeht, ist dessen Wechselwirkung jedoch mit erheblichen Konformationsänderungen im Protein verbunden, die eventuell eine Assoziation des Virus an ACE2 erschweren könnten.⁵⁹

Die initiale Wechselwirkung des SARS-CoV mit dem Rezeptor ACE2 stellt vor diesem Hintergrund eine viel versprechende Angriffsmöglichkeit für einen *entry*-Inhibitor dar. Ein potentieller Ligand, der an ACE2 bindet und die Assoziation des Virus an den Rezeptor blockiert, wird vermutlich geringe Nebenwirkungen zeigen, die durch die Inhibition des katalytischen Zentrums verursacht würden. Idealerweise bleibt trotz der Blockierung der viralen Bindungsregion die natürliche Enzymaktivität voll erhalten.

1.3 Das Schwere Akute Atemwegssyndrom (SARS)

1.3.1 Coronaviren

Humane Coronaviren wurden 1965 von D. A. Tyrrell und Mitarbeitern bei Erkältungskrankheiten entdeckt und drei Jahre später aufgrund von morphologischen Unterschieden zu anderen Viren als eigene Familie definiert. Die Berechtigung dieser Einteilung lieferten die später gefundenen molekularen Details über den Genomaufbau und Replikationsmechanismus.⁶⁰ Bis zum Auftreten des Schweren Akuten Atemwegssyndroms (SARS) im Winter 2002 in Südchina verursachten die Coronavirusinfektionen beim erwachsenen Menschen harmlose Erkältungskrankheiten und in seltenen Fällen Gastroenteritis. Bei Tieren hingegen wurden Coronaviren in Verbindung mit Infektionen des respiratorischen und des gastrointestinalen Traktes beobachtet.

Der Aufbau der Viruspartikel ist in Abbildung 2 schematisch gezeigt. Die Virionen haben einen Durchmesser von 80 bis 160 nm und tragen innerhalb der Membranhülle das einzelsträngige RNA-Genom in Plusstrangorientierung.

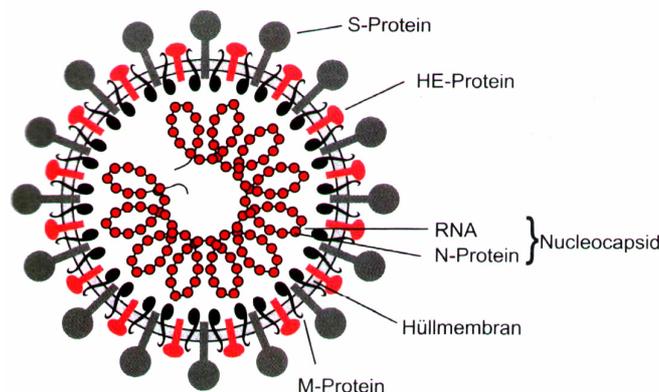


Abbildung 2: Aufbau eines Coronaviruspartikels. Im Innern des Partikels befindet sich das mit N-Proteinen komplexierte RNA-Genom als helikales Nucleocapsid. Es ist von einer Membranhülle umgeben, in welche die Glycoproteine S und HE sowie das nichtglycosylierte M-Protein eingelagert sind (Quelle: Susanne Modrow, Dietrich Falke; Molekulare Virologie; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 1. korrigierter Nachdruck 1998).

Dieses liegt assoziiert mit den N-Proteinen als Nucleocapsid vor, ist infektiös und ist mit einer Länge von etwa 30000 Basen das größte Genom aller bekannten RNA-haltigen Viren.^{61;62} Bestimmte Aminosäuren im N-Protein interagieren mit der carboxyterminalen Domäne des in die Membran eingelagerten M-Proteins, so dass das Nucleocapsid über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der Innenseite der Membranhülle assoziiert vorliegt. Neben dem

glycosylierten M-Protein (20-30 kDa) sind das S- (*surface* bzw. *spike*) Glycoprotein (180-200 kDa), welches als keulenförmige Oligomere (Di- oder Trimer) etwa 20 nm aus der Membranoberfläche herausragen, und bei einigen Virustypen (HCV-OC43 und ähnlichen) das HE-Protein (65 kDa) in die Membran eingelagert. Das HE-Protein liegt als Dimer vor und zeigt hämagglutinierende Aktivität.

Im Verlauf einer Infektion werden neutralisierende Antikörper gegen das S-Protein gebildet, welches die entscheidende Rolle bei der Adsorption des Virus an die Rezeptoren der Zelloberfläche sowie der induzierten Membranfusion spielt. Bei einigen Virustypen muss zur Aktivierung der Fusionsaktivität das S-Protein an einer stark basischen Aminosäureabfolge in der Mitte der Sequenz durch Proteasen gespalten werden. Dadurch entsteht ein aminoterminaler S1-Anteil, der nichtkovalent mit der carboxyterminalen Domäne S2 verbunden ist. Allerdings sind auch Virustypen bekannt, wie etwa das im folgenden Abschnitt beschriebene SARS assoziierte Coronavirus, deren S-Proteine Zellverschmelzungen induzieren, ohne dass sie vorher proteolytisch gespalten werden.^{63;64} Das S-Protein ist ein virales Typ 1 Fusionsprotein und enthält zwei charakteristische Regionen, die so genannten *heptad repeat regions* (HR-N und HR-C), die im nativen Protein eine *coiled-coil* Struktur annehmen. Ausgelöst durch die Bindung des S-Proteins an den Rezeptor kann es in diesen Regionen zu einer Konformationsänderung kommen, die zur Ausbildung eines 6-Helix-Bündels (Trimer von Dimeren) führen, welches die Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran vermittelt.⁶⁵⁻⁶⁷

1.3.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV)

Im Winter 2002/03 wurde in der südchinesischen Provinz Guangdong zum ersten Mal von einer nicht identifizierbaren Atemwegserkrankung berichtet. Es folgten ähnliche Berichte aus Vietnam, Kanada und Hong Kong von einer schweren fieberhaften Erkrankung der Atemwege, die sich mit einer Inkubationszeit von 2 bis 7 Tagen insbesondere auf Familienmitglieder und Pflegepersonal übertrug und rasch verbreitete. Dr. Carlo Urbani und seine Kollegen in einem vietnamesischen Krankenhaus lenkten die Aufmerksamkeit der WHO auf das bis dahin unbekannte Krankheitsbild, das im März 2003 als Schweres Akutes Atemwegssyndrom (*severe acute respiratory syndrome*, SARS) bezeichnet wurde. Durch eine effektive internationale Zusammenarbeit konnte wenig später ein neues Coronavirus als Auslöser von SARS identifiziert werden, welches dann als SARS-assoziiertes Coronavirus bekannt wurde. Die darauf weltweit eingeleiteten Sicherheitsmaßnahmen, wie etwa der Quarantäne von Flugzeugen aus entsprechenden Gebieten, trugen dazu bei, dass die

alarmierende Epidemie glücklicherweise schnell eingedämmt werden konnte. An SARS infizierten sich weltweit etwa 8000 Menschen, von denen ungefähr 10% starben.^{63;68-75} Abgesehen von einem deutlich abgeschwächten SARS-Ausbruch im Winter 2003/04, ist bis heute kein weiterer Fall einer Infektion bekannt.

1.3.3 Die SARS-CoV-Infektion

Die Infektion von humanen Wirtszellen durch das SARS-CoV wird durch einen initialen Kontakt des viralen S-Proteins (kurz *S*) mit dem Wirtszellrezeptorprotein eingeleitet. Im November 2003 identifizierten Li *et al.* die Metallopeptidase Angiotensin-converting-Enzym 2 (ACE 2) als funktionellen Rezeptor von SARS-CoV.³⁵ Darüber hinaus konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD) innerhalb des S-Proteins lokalisiert werden. Anhand von Fusionsexperimenten u. a. mit Hilfe von löslichen S-Fragmenten schlugen Xiao *et al.* eine RBD zwischen den Aminosäuren 303 und 537 vor.⁷⁶ Die Sequenz zwischen 270 und 510 erwies sich in der Durchflusszytometrie in der Gruppe von Babcock *et al.* als die minimale Rezeptorbindungsdomäne.⁷⁷ Die Arbeitsgruppe von M. Farzan, die auch ACE 2 als Rezeptor des Virus identifizieren konnten, postulierten die Region zwischen den Aminosäuren 318 bis 510 innerhalb der S1-Domäne von *S* als die kritische Determinante der Virus-Rezeptor-Interaktion.⁷⁸ Dabei zeigte deren RBD, fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG1 Antikörpers, höhere Affinität gegenüber ACE2, als das in voller Länge exprimierte und an den Antikörper gebundene Protein (S1-Ig). Im September 2005 veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe die in Abbildung 3 gezeigte Röntgenkristallstrukturanalyse des Komplexes aus RBD (Aminosäuren 306-527) und ACE2 (N-terminale Domäne zwischen Aminosäuren 19-615).⁷⁹ Die Analyse zeigt, dass innerhalb der RBD eine exponierte Schleife (Region 424-494) sämtliche Kontakte zu ACE2 ausbildet (Tabelle in Abbildung 3), die daher als Rezeptorbindungsmotiv (RBM) bezeichnet wurde. Innerhalb dieses Motivs sind sechs Tyrosine an einer direkten Wechselwirkung zum ACE2 beteiligt. Neben der für das Virus wichtigen Funktion für die Adsorption an den Wirtszellrezeptor sowie der induzierten Membranfusion scheint das S-Protein ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Artenspezifität der Coronavirusinfektion zu spielen. Die Veränderung der Aminosäuresequenz im S-Protein, insbesondere die Einführung eines Threonins an Position 487 und eines Aspartats anstelle einer geladenen Lysinseitenkette an 479, führte zur Adaption des Virus an den Menschen, d.h. zu einer hohen Affinität gegenüber humanem ACE2.⁸⁰⁻⁸²

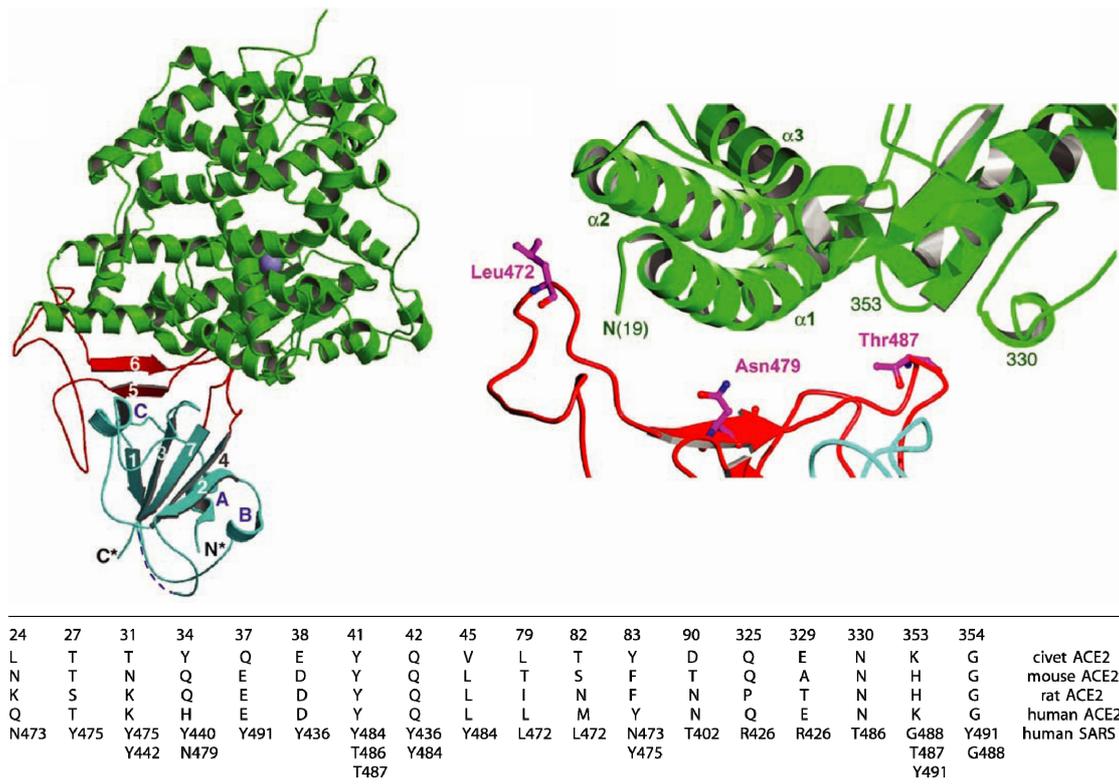


Abbildung 3: **oben** Komplex aus Röntgenkristallstrukturanalyse von ACE2 (grün) und SARS-CoV RBD (cyan) bzw. RBM (rot) sowie Ausschnitt aus der Berührungsoberfläche der beiden Proteine, **unten** Kontakte zwischen ACE2 und RBD: die Aminosäuren des Rezeptors, die in direktem Kontakt zur RBD stehen, sind entsprechend ihrer Sequenzposition (Nummer oberhalb jeder Spalte) und Einbuchstabencode für ACE2 aus Schleichkatzen (civet), Mäusen (mouse), Ratten (rat) und Menschen (human) aufgelistet, unterhalb jeder Spalte sind die kontaktierten Aminosäuren aus der hier gezeigten RBD mit entsprechender Sequenznummerierung aufgelistet (Quelle: Fang Li, Wenhui Li, Michael Farzan, Stephen C. Harrison, Structure of SARS Coronavirus Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Receptor, Science, 309 (2005), 1864-68).

Die am Anfang der Infektion stattfindende Interaktion zwischen SARS-CoV und ACE2 ist ein attraktives Ziel für einen potentiellen Wirkstoff, zumal bestimmte Epitope aus der RBD als Leitstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors dienen könnten. Als andere wichtige Angriffsmöglichkeiten seien an dieser Stelle der durch das S-Protein induzierte Fusionsprozess der Virus- mit der Wirtszellmembran oder die Inhibition der viralen Proteinase 3CL^{pro} genannt.⁸³⁻⁸⁵

2 METHODEN

2.1 Festphasenpeptidsynthese

Neben gentechnischen Methoden und enzymatischen Synthesen ist die von R. B. Merrifield entwickelte Peptidsynthese an festen Trägern heute ein etabliertes Syntheseverfahren.⁸⁶ Der Vorteil dieser rein chemischen Peptidsynthese ist die kontrollierte und automatisierte Verknüpfung verschiedener Aminosäuren entsprechend der angestrebten Peptidsequenz. Dabei erfolgt der Aufbau des Peptids entgegen der natürlichen Syntheserichtung vom C- zum N-Terminus in sich wiederholenden Synthesesyklen.

Für die im Grunde unkomplizierte Reaktion einer Amino- mit einer Carboxylgruppe zu einer Amidbindung ergeben sich bei der Peptidsynthese verschiedene Schwierigkeiten, da Aminosäuren multifunktionelle Verbindungen sind. Das bedeutet, dass mit Hilfe der Schutzgruppentechnik gearbeitet werden muss, um unkontrollierte Oligomerisierungen und Nebenreaktionen zu verhindern. Damit eine peptidische Amidbindung unter milden Reaktionsbedingungen geknüpft werden kann, muss die Carboxylfunktion der entsprechenden Aminosäure aktiviert werden. Dies muss möglichst so geschehen, dass eine Racemisierung vermieden wird. Die hier standardmäßig eingesetzten Monomere der Peptidsynthese sind z.B. Aminosäuren, die an ihrer α -Aminofunktion die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe tragen und deren funktionellen Seitengruppen durch säurelabile Schutzgruppen geschützt sind. Die Fmoc-Gruppe kann unter milden basischen Bedingungen, etwa in einem Gemisch aus Piperidin und DMF im Verhältnis 1:4, als Methylenfluoren abgespalten werden. Anhand dessen Bildung lässt sich der Verlauf der Synthese photometrisch verfolgen und die Kupplungsausbeute bestimmen.⁸⁷ Als säurelabile Schutzgruppen kommen im Allgemeinen Trt-, Pbf-, tBu- und Boc-Gruppen zum Einsatz, die sich mit Hilfe einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser im Verhältnis 95:5:2 abspalten lassen. Die feste Phase der Peptidsynthese bildet ein funktionalisiertes Harz. Auf dessen Oberfläche befinden sich so genannte *linker*, die in der Regel Fmoc-geschützte Aminogruppen oder Hydroxybenzylfunktionen besitzen. Die Art des *linkers* entscheidet darüber, ob am Ende der Synthese die Peptide mit Carboxamid oder freier Carboxylgruppe am C-Terminus entstehen. Weiterhin bestimmen die Abspaltbedingungen des *linkers* und damit des daran gebundenen Peptids, ob der Schutz der Funktionalitäten in den Seitenketten erhalten bleibt oder mit abgespalten wird. Die oben aufgeführten Schutzgruppen können so gewählt werden, dass sie sich unter den gleichen Bedingungen wie das Peptid vom Harz in TFA unter Zusatz von

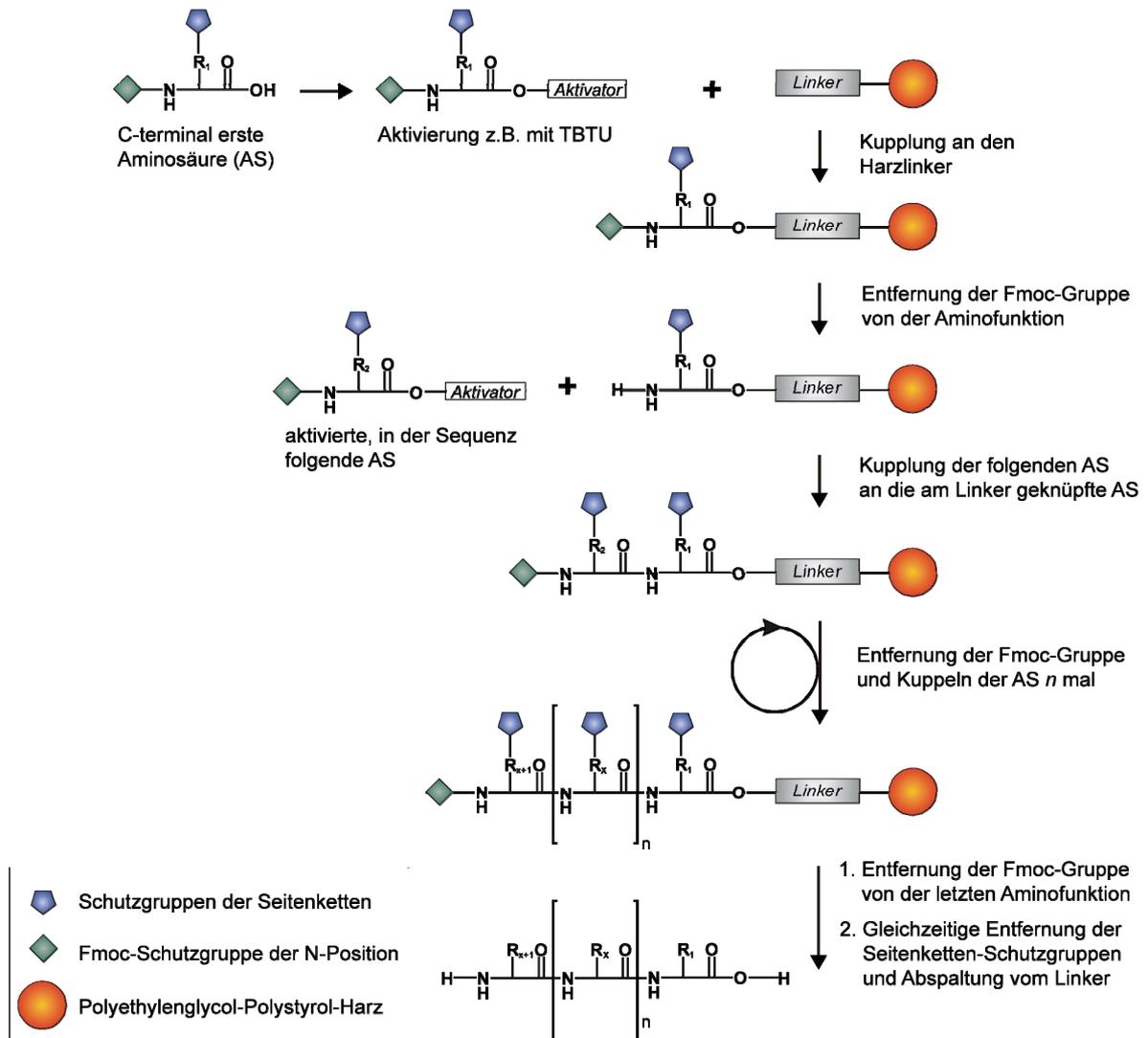


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.

Die sich wiederholenden Reaktionszyklen können ideal mit Hilfe von automatisierten Peptidsynthesizern durchgeführt werden. Diesen liegt üblicherweise das *continuous flow* oder das so genannte *batch* Verfahren zugrunde. Bei ersterem werden die Reagenzien kontinuierlich über das in einer Reaktionssäule befindliche Harz gepumpt, während bei dem *batch* Verfahren die Reaktion in kleinen Gefäßen stattfindet, in denen die Durchmischung der Reagenzien über einen *vortex* Mechanismus erreicht wird.

2.2 Charakterisierung von Peptiden

2.2.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) ermöglicht durch eine fragmentierungsfreie Ionisation die Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Quotienten (m/z) von Makromolekülen

und eignet sich daher besonders gut zur Identifizierung von Biomolekülen. Diese hochmolekularen Verbindungen können in herkömmlichen Verfahren aufgrund ihrer Molmasse nur schwer in die Gasphase überführt werden, ohne dabei zu fragmentieren. Ein weiterer praktischer Vorteil dieser Methode liegt in der bequemen und schnellen Durchführung sowie einer hohen Empfindlichkeit bis in den Femtomol-Bereich.

Es handelt sich bei der MALDI-TOF-MS um ein *hot spot* Verfahren, bei dem die Ionisierung durch Laserpulse erreicht wird. Die zu untersuchende Substanz wird zusammen mit einer geeigneten Matrix kokristallisiert. Diese besitzt ein Absorptionsmaximum bei der entsprechenden Wellenlänge des Lasers. Durch lokale Erhitzung mit einem Laserpuls werden Matrixmoleküle schlagartig verdampft und die Probenmoleküle mitgerissen.⁹⁰ Bei der Desorption der Matrixmoleküle werden diese durch Photoionisation angeregt und es findet ein Protonentransfer auf elektrisch neutrale Matrixmoleküle statt. Ein weiterer Ladungstransfer auf die Probenmoleküle sorgt dann für die Ionisation derselben. Das Masse-Ladungsverhältnis der ionisierten Moleküle wird mit Hilfe des nachfolgenden TOF-Analysators ermittelt. Die Geschwindigkeit der Analytmoleküle ist umgekehrt proportional zu ihrer Molekülmasse, so dass anhand ihrer Flugzeit durch eine typischerweise 0.5 - 2 Meter lange Strecke das Masse-Ladungsverhältnis errechnet werden kann.⁹¹ Es ist zu beachten, dass eine Quantifizierung von Einzelkomponenten in einer zu untersuchenden Probe bei der MALDI-TOF-MS nicht möglich ist, da nicht von einer homogenen Lösung als Analyt ausgegangen wird, sondern von heterogen niedergeschlagenen Kristallen.

2.2.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist zu einem der wichtigsten Hilfsmittel für die Identifizierung und Konformationsanalyse von Biomolekülen geworden. Sie nimmt unter anderen spektroskopischen Verfahren, wie z.B. der Röntgenstrukturanalyse, insofern eine besondere Rolle ein, als dass Substanzen in Lösung und dadurch unter annähernd physiologischen Bedingungen untersucht werden können. Da es sich um eine zerstörungsfreie Meßmethode handelt, können untersuchte Substanzen problemlos zurückgewonnen werden. Dies ist besonders bei schwer darstellbaren Molekülen und wertvollen Proteinen ein großer Vorteil. In der Arzneimittelforschung hat sich die NMR-Spektroskopie als unverzichtbares Hilfsmittel herausgestellt, da durch diese Methode die bioaktive Konformation des Wirkstoffs bestimmt werden kann.⁹²

Aufgrund der Komplexität vieler Verbindungen reichen eindimensionale Experimente jedoch nicht mehr aus, da Signalüberlagerungen die Auswertbarkeit der Spektren unmöglich machen.

Mit der Aufnahme zweidimensionaler NMR-Spektren wird ein genauerer Einblick in die Struktur der untersuchten Verbindungen erreicht. Die 2D-Spektren ermöglichen die Identifizierung der einzelnen Spinsysteme und eine genaue Ermittlung skalarer sowie dipolarer Kopplungen. Die skalare Kopplung, auch Spin-Spin- oder J -Kopplung genannt, wird über die Bindungselektronen vermittelt und ist typischerweise über zwei bis vier Bindungen effektiv. Aus den Kopplungskonstanten lassen sich über die Karplus-Beziehung die Diederwinkel des entsprechenden Spinsystems bestimmen.⁹³ Im Gegensatz dazu gibt die dipolare Kopplung der Spins deren Wechselwirkung direkt durch den Raum wieder. Das von der dipolaren Kopplung abhängige Phänomen (NOE s.u.) erlaubt daher eine Bestimmung der Abstände von Protonen unabhängig davon, ob diese über skalare Kopplungen miteinander verbunden sind oder nicht. Innerhalb der verschiedenen Möglichkeiten, die einem die NMR-Spektroskopie bietet, haben sich die NOE-Experimente und solche, die eine Bestimmung der 3J -Kopplungskonstanten ermöglichen, als wichtigste Lieferanten struktureller Daten herausgestellt.

*TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)*⁹⁴: ^1H - ^1H -TOCSY-Experimente liefern 2D-Spektren, die eine Bestimmung der chemischen Verschiebungen der jeweiligen Aminosäureprotonen des untersuchten Peptids ermöglichen. Durch Anlegen eines so genannten Spinlockfeldes kann die totale Korrelation der gekoppelten Spins eines Spinsystems erreicht werden, was durch die Kreuzpeaks im Spektrum angezeigt wird. Der dabei stattfindende Magnetisierungstransfer hängt von der Spinlockzeit im Experiment und den Kopplungskonstanten des Spinsystems ab. Bei $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungen, die kleiner als zwei Hertz sind, ist der Transfer aufgrund zu geringer Intensität nicht zu beobachten. Das erhaltene Kopplungsmuster ermöglicht die Identifizierung einzelner Spinsysteme, da im Idealfall das gesamte Spinsystem in einer Spur beobachtbar ist. Auf diese Weise wird z.B. eine Zuordnung der Aminosäuren eines Peptids über die charakteristischen chemischen Verschiebungen ihrer Protonen möglich. Die Ermittlung der chemischen Verschiebungen erfolgt dabei vorzugsweise durch Analyse der Spuren im NH-Bereich, da diese meist gut dispergiert und separiert von den anderen Resonanzsignalen vorliegen. Um einen Austausch der NH-Protonen gegen Deuterium zu vermeiden, werden die Spektren in einer Lösung aus $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ im Verhältnis 9:1 und einem pH-Wert von etwa 3 aufgenommen.

NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy)^{95,96}: Das NOESY-Experiment kann zur Sequenzbestimmung von Peptiden verwendet werden. Es basiert auf der dipolaren Kopplung der Spins direkt durch den Raum, wodurch das Relaxationsverhalten räumlich benachbarter Kerne beeinflusst wird. Die Magnetisierung eines Spins führt zu einer vom

Gleichgewicht abweichenden Magnetisierung eines benachbarten Spins. Dieses Phänomen wird als *Nuclear-Overhauser-Enhancement* (NOE) bezeichnet. Die Intensität eines NOESY-Kreuzsignals ist unter anderem abhängig vom räumlichen Abstand der Kopplungspartner zueinander. Die so genannten NOE-Kontakte sind zwischen Kernen beobachtbar, deren Abstand bis zu 5.0 Å beträgt. Deshalb können Aussagen sowohl über die Primär- als auch die Sekundärstruktur eines Peptids gemacht werden.

2.3 Protein-Ligand Bindungsstudien

2.3.1 *Surface Plasmon Resonance* (SPR)-Sensorchipsystem

Die von der Firma Biacore entwickelte Methode zur Untersuchung spezifischer Bindungsereignisse zwischen Biomolekülen beruht auf dem Prinzip der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (*surface plasmon resonance*, SPR).⁹⁷ Deren physikalischen Grundlagen wurden bereits 1959 von Turbadar beschrieben.⁹⁸

Bei der Methode werden kleinste Änderungen des Brechungsindex registriert, wobei das aktive Probenvolumen durch die Reichweite einer evaneszierenden Welle gegeben ist. Dieses quantenmechanische Phänomen wird bei der Totalreflexion eines planar polarisierten Lichtstrahls beobachtet, der auf die Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren und dünneren Medium auftrifft. Unter einem bestimmten Winkel kommt es zur Resonanz, die zu einer deutlichen Verstärkung des evaneszierenden Feldes (SPR) führt und damit verbunden, ist eine Reduktion der Intensität des reflektierten Lichtes messbar.

In Abbildung 6 ist das von der Firma Biacore Anfang der neunziger Jahre entwickelte SPR Sensorchipsystem schematisch dargestellt.

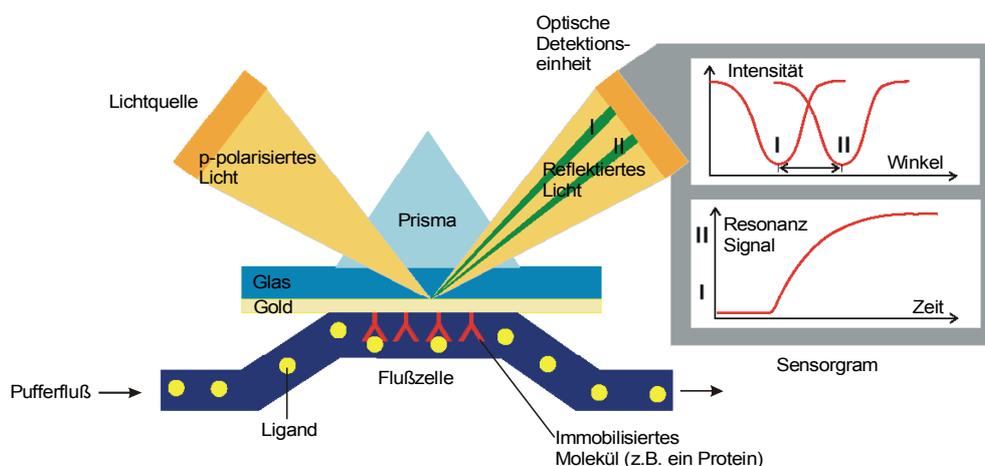


Abbildung 6: Schematische Darstellung des SPR-Sensorchipsystems.

Das optisch dichtere Medium stellt bei dem Biacore-Chipsystem ein mit einem Goldfilm bedeckter Glasträger und das optisch dünnere Medium eine Flusszelle dar. Auf dem Sensorchip ist eine Matrix aufgetragen, an die ein Bindungspartner des zu untersuchenden biologischen Systems immobilisiert wird, während der andere in gelöster Form entlang der Flusszelle darüber geleitet wird. Im Fall einer Interaktion mit der immobilisierten Verbindung verändert sich der Brechungsindex in der Flusszelle und damit des optisch dünneren Mediums, das von dem evaneszierenden Feld in der Nähe der Sensorchipoberfläche durchdrungen wird. Diese Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung lässt sich daher als Winkelveränderung des Intensitätsminimums der Totalreflexion detektieren, bei der erneut Oberflächen-Plasmonen-Resonanz auftritt. Die Verschiebung des SPR-Winkels wird in Echtzeit gemessen, wobei eine Änderung des Brechungsindex um 1×10^{-3} eine Verschiebung des Winkels um 0.1° verursacht. Mit den kommerziell erhältlichen Geräten der Firma Biacore können Winkeländerungen von bis zu 10^{-4} Grad aufgelöst werden. In den SPR-Messungen wird die Veränderung des SPR-Winkels als Signal in RU (*response unit*) ausgegeben. Da die Injektion des gelösten Liganden auch ohne spezifische Bindungsereignisse eine gewisse Veränderung des RU-Wertes bewirkt, wird gleichzeitig zu der Messung der Flusszelle eine Referenzzelle detektiert, auf der kein Bindungspartner immobilisiert wurde. Die Differenz zwischen Mess- und Referenzzelle stellt die eigentliche Biacore-Kurve mit der *response difference* in RU als Ordinatenachse dar (Abbildung 7). Zur Immobilisierung der Substanzen stehen diverse Chipoberflächen zur Verfügung, wobei sich für Peptide und Proteine die kovalente Fixierung über eine Carboxymethylierte-Dextranmatrix (CM-Matrix) als vorteilhaft erwiesen hat. Dafür wird mit Hilfe von NHS und EDC das Protein oder Peptid über freie Aminogruppen – z.B. von Lysinseitenketten – an die Carboxylfunktion der Matrix gekuppelt. In Abbildung 7 ist die idealisierte Darstellung einer Assoziations- und Dissoziationskurve, wie sie aus der SPR-Messung hervorgeht, dargestellt. Wird demnach ein gelöster möglicher Bindungspartner durch die Messzelle geleitet und kommt es dann zu einer Wechselwirkung mit der immobilisierten Verbindung, steigt der RU-Wert an (Assoziation). Ein Differenzwert von 1 RU entspricht dabei einer Masse von etwa 1 pg gebundener Substanz. Nach der Injektion der zu untersuchenden Verbindung wird mit Puffer nachgespült und es kommt idealerweise zur Wiederherstellung des Ausgangszustandes, d.h. der Bindungspartner dissoziiert (Dissoziation). Das Sensorgramm entspricht der Auftragung der RU-Werte von der Injektion bis zur Regeneration gegen die Zeit.

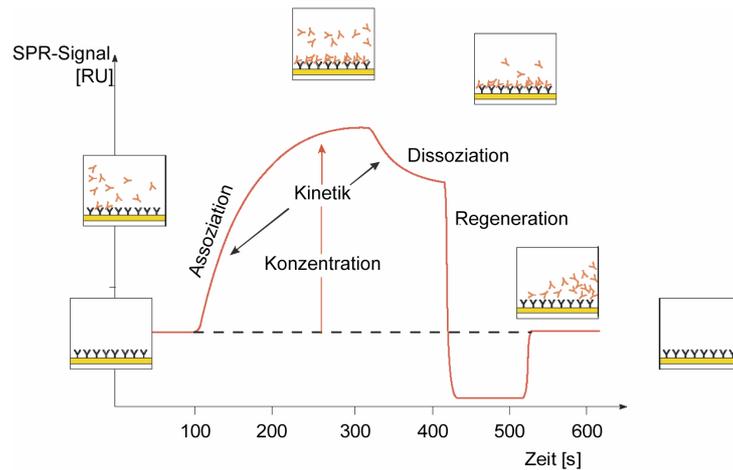


Abbildung 7: Idealisiertes Sensorgramm einer SPR-Messung.

Zur vollständigen Regeneration ist es manchmal notwendig, Regenerationslösungen einzusetzen, das sind z.B. Detergenzien, verdünnte Säuren oder Basen. Aus den gewonnenen Sensorgrammen lassen sich Informationen über die Kinetik und Thermodynamik des Bindungsereignisses gewinnen. So können die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion (k_{on} und k_{off}) durch Anpassung an die Langmuir-Gleichung (Gleichung 1) bestimmt werden. Aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten ergibt sich nach Gleichung 2 die Dissoziationskonstante K_D :

$$\text{Assoziation: } R(t) = R_{eq} - R_{eq} \times e^{-k_{obs} \times t}$$

$$\text{Dissoziation: } R(t) = R_0 \times e^{-k_{off} \times t}$$

Gleichung 1: Langmuir-Gleichung zur Beschreibung der Assoziation bzw. Dissoziation mit $R(t)$ = SPR-Antwort in Abhängigkeit der Zeit, R_{eq} = SPR-Antwort im steady state, R_0 = SPR-Antwort zu Beginn der Dissoziation, k_{obs} = empirische Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}) mit $k_{obs} = k_{on} \times C + k_{off}$ und k_{off} = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation.

$$K_D = \frac{[A] \times [B]}{[AB]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Gleichung 2: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D mit $[A]$ = Konzentration der immobilisierten Komponente, $[B]$ = Konzentration der gelösten Komponente und $[AB]$ = Konzentration des Komplexes.

Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter sind mögliche Ungenauigkeiten zu berücksichtigen, wie sie etwa durch die begrenzte Datenrate des Gerätes, diffusionsbedingte Massentransportlimitierungen, *rebinding*-Effekte oder Regenerationsprobleme verursacht werden können. Der im Fall einer spezifischen Wechselwirkung erreichte Gleichgewichtswert (*steady state*) erlaubt einen quantitativen Vergleich zwischen unterschiedlichen Bindungspartnern. Die Auftragung des RU-Wertes im *steady state* gegen die jeweilige Konzentration der gelösten Verbindung (c_B) entspricht einer Bindungskurve, die nach dem *one-site-binding* Modell an Gleichung 3 gefittet werden kann:

$$R [\text{RU}] = \frac{\text{RU}_{\max} \times c_L}{(K_D + c_L)}$$

Gleichung 3: Thermodynamische Analyse der erhaltenen SPR-Antworten (R), wobei RU_{\max} dem extrapolierten Gleichgewichts-RU-Wert bei unendlich hoher Ligandkonzentration c_L und K_D der Dissoziationskonstante entspricht.

Der daraus erhaltene Wert RU_{\max} entspricht dem theoretischen Gleichgewichts-RU-Wert bei unendlich hoher Ligandkonzentration und der Wert $\text{RU}_{\max}/2$ der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D . Die Methode ist schnell und sehr empfindlich und verlangt nur geringe Substanzmengen. Neben Proteinrezeptoren können prinzipiell auch molekular anspruchsvollere Systeme wie Viren, Bakterien oder Zellen mit dieser Methode untersucht werden. Gegenüber anderen biochemischen Assays besteht der Vorteil der SPR-Messungen darin, dass keiner der Bindungspartner mit einem *label* oder *linker* markiert werden muss.

2.3.2 Die *Saturation Transfer Difference* (STD) NMR-Spektroskopie

Die STD NMR-Spektroskopie ist ein etabliertes Verfahren, um Rezeptor-Ligand-, insbesondere Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene hinsichtlich des Liganden zu untersuchen. Die Methode kann dabei zum *screening* von Substanzbibliotheken, zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten und Charakterisierung von Bindungsepitopen des Liganden leistungsfähig eingesetzt werden.^{99;100} Das Prinzip des Sättigungstransfers ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Eine Voraussetzung für das Gelingen des Experiments ist die selektive Sättigung des Rezeptormoleküls (Protein) während des Experiments. Dies kann durch eine Kaskade von Gausspulsen über einen Zeitraum von einer bis vier Sekunden erreicht werden. Die Proteinsignale besitzen aufgrund ihrer kurzen T_2 -Relaxationszeit große Linienbreiten und es ist daher möglich, den Einstrahlpunkt der Puls-kaskade außerhalb des spektralen Bereiches der zu untersuchenden Liganden zu wählen. Dieser liegt typischerweise

im negativen ppm Bereich bis etwa -1 ppm. Die Sättigung wird sehr schnell durch die Spindiffusion über das gesamte Protein verteilt. Dabei handelt es sich um einen indirekten Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen über einen dritten, der auftritt, wenn die Kreuzrelaxationsrate groß gegenüber der T_1 -Relaxationszeit ist. Für ein erfolgreiches STD NMR-Experiment ist es nötig, dass das Rezeptorprotein mindestens etwa 10 kDa groß ist, da bei kleineren Molekülen die Spindiffusion nicht effektiv genug ist.

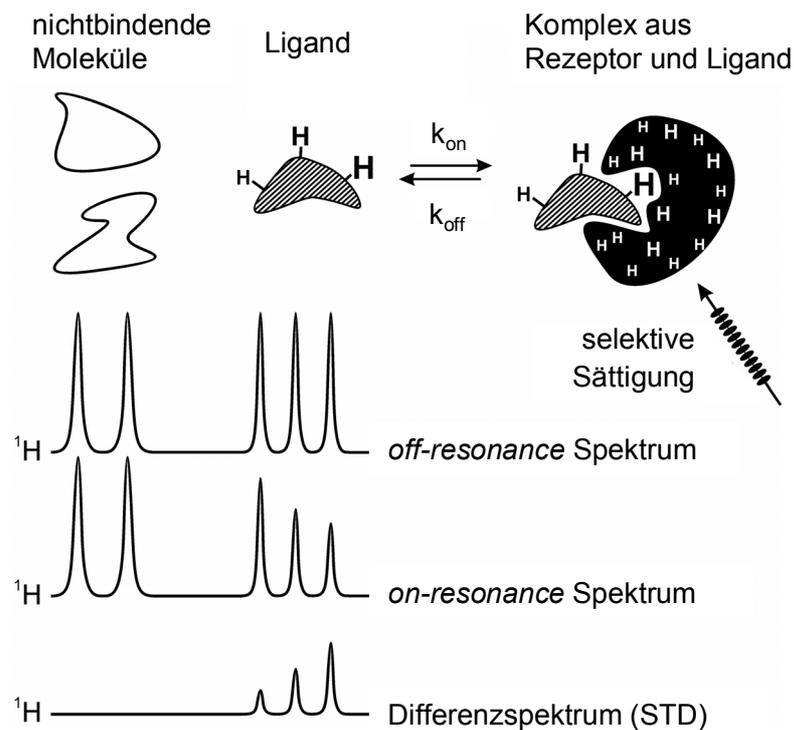
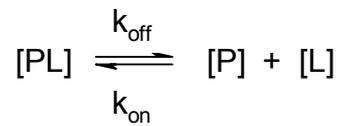


Abbildung 8: Prinzip der STD NMR-Spektroskopie.

Kommt es wie in Abbildung 8 angedeutet zu einer Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand, wird Sättigung auf diesen übertragen. Der Ligand dissoziiert entsprechend der Gleichgewichtskonstanten K_D und führt zur Sättigung in der Lösung, wo sie detektiert wird. Die Signalintensitäten der bindenden Liganden sind in diesem *on-resonance* Spektrum gegenüber denen im *off-resonance* Spektrum – d.h. der Einstrahlpunkt der Sättigungspulse befindet sich außerhalb der Resonanzbereiche der Liganden und des Proteins – verringert. Das STD-Spektrum ist das Differenzspektrum aus dem *on-* und *off-resonance* Spektrum und enthält die Signale des bindenden Liganden, die Resonanzen von nicht bindenden werden ausgelöscht. Zur Unterdrückung der Proteinsignale, die im STD-Spektrum ebenfalls auftreten und gegebenenfalls zu Signalüberlagerungen mit Ligandsignalen führen, wird ein $T_{1\rho}$ -Filter verwendet. Das HDO-Signal wird durch eine WATERGATE-Pulssequenz unterdrückt. Zur Bestimmung des Bindungsepitops der Liganden wird die Tatsache ausgenutzt, dass

Molekülgruppen, die in engem räumlichen Kontakt zum Protein stehen, effektiver gesättigt werden als diejenigen mit größerem Abstand. Die Größe der STD-Intensität ist ebenfalls durch die Bindungskinetik bestimmt. Für das Dissoziationsgleichgewicht gilt:



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

Gleichung 4: Für die STD-Intensität entscheidendes Dissoziationsgleichgewicht in Abhängigkeit von der Bindungskinetik mit $[P]$ = Proteinkonzentration, $[L]$ = Ligandkonzentration, $[PL]$ = Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes, k_{on} = Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion und k_{off} = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Für das STD-Experiment ist dabei entscheidend wie viele Ligandmoleküle im Verlauf der Sättigungszeit die Bindungstasche erreichen. So führen kleine *off-rates* dazu, dass der Durchsatz zu gering ist und keine Signalintensität zu beobachten ist. Ferner besteht die Möglichkeit, dass bei sehr hohen *on-* und *off-rates* die Verweilzeit in der Bindungstasche nicht für den Transfer von Sättigung ausreicht. Bei einer diffusionskontrollierten Assoziationsreaktion beträgt k_{on} ca. $10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. In Abhängigkeit vom K_D -Wert lässt sich dann k_{off} abschätzen. Dieser sollte für STD-Messungen größer als 1 s^{-1} sein.¹⁰¹

Werden mit Hilfe von STD NMR-Spektroskopie Dissoziationskonstanten bestimmt, ist es nötig, das gleiche STD-Experiment bei verschiedenen Ligandkonzentrationen durchzuführen. In jedem erhaltenen Spektrum werden die STD-Effekte durch Vergleich mit dem *off-resonance* bestimmt und daraus der STD-Amplifikationsfaktor ($\text{STD}_{\text{Ampl.}}$) nach Gleichung 5 berechnet. Der Faktor dient der Quantifizierung des Durchsatzes an Ligandmolekülen und ist das Produkt aus dem prozentualen STD-Effekt und dem Ligandüberschuss.

$$\text{STD}_{\text{Ampl.}} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \times \frac{[L]_{\text{total}}}{[P]_{\text{total}}}$$

Gleichung 5: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors ($\text{STD}_{\text{Ampl.}}$) mit I_0 = Signalintensität im off-resonance-Spektrum, I_{sat} = Signalintensität im on-resonance-Spektrum, $I_0 - I_{\text{sat}}$ = Signalintensität im STD-Spektrum, $[L]_{\text{total}}$ = Gesamtligandkonzentration und $[P]_{\text{total}}$ = Gesamtproteinkonzentration.

Der so erhaltene Amplifikationsfaktor wird als Funktion der Ligandkonzentration aufgetragen. Analog der SPR-Analyse in Gleichung 3 können die Daten im Fall einer spezifischen Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor an das *one-site-binding* Modell angepasst werden. Aus dem *fit* wird gemäß Gleichung 6 der K_D -Wert erhalten.

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

Gleichung 6: Durch Anpassung des STD-Amplifikationsfaktors an das *one-site-binding* Modell werden die Dissoziationskonstante K_D sowie der theoretisch maximale Faktor $\text{STD}_{\text{Ampl.}(\text{max})}$ bei unendlich hoher Ligandkonzentration $[L]$ erhalten.

Neben Systemen mit löslichem Rezeptorprotein kann das STD NMR-Verfahren auch zur Untersuchung von Protein-Ligand-Systemen verwendet werden, bei denen das Protein z.B. immobilisiert oder in eine Membran eingebettet vorliegt.^{102;103}

2.4 SARS-CoV Inhibitionsassays

Da Methoden wie SPR- und STD NMR-Spektroskopie in der Regel keine Aussagen über die biologische Aktivität eines Liganden ermöglichen, ist es nötig, die chemischen Substanzen im lebenden Zellsystem zu untersuchen. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Plaque-Inhibitions- und *real-time* RT-PCR Reduktionsassays sollte die inhibierende Wirkung der entsprechenden Substanz auf den Zelleintritt des SARS-CoV untersucht werden. Die Studien wurden in der Arbeitsgruppe von Christian Drosten am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in einem Sicherheitslabor der Stufe S4 mit Viren vom Typ *SARS-CoV Isolat Frankfurter Indexpatient* durchgeführt.

Für den so genannten Plaque-Assay werden VeroE6-Zellen ausgesät und mit der entsprechenden Viruslösung inkubiert, wodurch die Zellen infiziert werden. Soll die Wirkung eines Inhibitors getestet werden, kann eine entsprechend hohe Konzentration eines

potentiellen Wirkstoffs in dieser Inkubationslösung eingestellt werden. Nach der Infektion der Zellen werden diese gewaschen und mit einem Methylcellulose-Medium überschichtet. Der Methylcellulose-Anteil des Mediums bewirkt eine Verdichtung, die eine Diffusion infektiöser Partikel verhindert, so dass von einer infizierten Zelle aus lediglich die jeweiligen Nachbarzellen infiziert werden können. Es entstehen Infektionsherde, welche als Löcher (Plaques) im Zellrasen erscheinen oder mittels Immunfärbung als Immunfoci dargestellt werden können und makroskopisch auszählbar sind. Nach Inkubation über mehrere Tage bei 37 °C werden die Platten in Formalin-Lösung aus dem S4-Labor geschleust, wobei gleichzeitig das Virus inaktiviert und die Zellen fixiert werden. Die Zellen werden nach der Formalin-Fixierung mit Kristallviolettlösung überschichtet. Nach Abgießen der Lösung und Waschen können die Plaques gezählt werden. Anhand dessen lassen sich so genannte *plaque-forming-units* (PFU) und - bezogen auf die Zahl der ausgesäten Zellen - die MOI (*multiplicity of infection*) als Maß der Infektiösität errechnen. Dabei gilt mit d = Verdünnungsfaktor der Viruslösung:

$$(\text{Anzahl Plaques}) \times d = \text{PFU} \left[\frac{1}{\text{ml}} \right] \quad \text{und} \quad \frac{\text{PFU}}{\text{Zahl ausgesäter Zellen}} = \text{MOI}$$

Für den Reduktionsassay mit Hilfe von *real-time* RT-PCR wird zunächst analog vorgegangen. Bei erfolgreicher Infektion der Zellen und Vermehrung des Virus in VeroE6-Zellen wird dieses in den Überstand der Flüssigkultur freigesetzt. Eine Methode, die Vervielfältigung der Viruspartikel zu messen, ist die quantitative *real-time* RT-PCR, mit deren Hilfe sich virale RNA quantifizieren und mit dem Virustiter korrelieren lässt.¹⁰⁴ Damit ist die Bestimmung der Reduktion der Virusreplikation durch einen potentiellen Wirkstoff möglich.¹⁰⁵ Im Gegensatz zu dem Plaque-Assay kann in diesem Test der Wirkstoff während des gesamten viralen Lebenszyklus anwesend sein.

3 AUFGABENSTELLUNG

Das Thema dieser Arbeit war die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen vor dem Hintergrund des Wirkstoffdesigns. Für diese Arbeit ergaben sich zwei Ziele:

- A) Entwicklung eines *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie basierten Verfahrens zur direkten Beobachtung von Ligandbindung an membranständige Rezeptoren in lebenden Zellen.
- B) Die Entwicklung einer peptidischen Leitstruktur für das Design von *entry*-Inhibitoren der SARS-CoV Infektion mit Hilfe von *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie und *surface plasmon resonance* (SPR)-Bindungsstudien zur Bestimmung der Aktivitäten.

Teil A

Im Rahmen der Doktorarbeit von R. Meinecke konnte die Wechselwirkung zwischen dem cyclischen Peptid cyclo(RGDfV) und dem membranständigen Rezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ charakterisiert und das Bindungsepitop des Liganden mit Hilfe von STD NMR-Spektroskopie bestimmt werden.^{102;106} Dazu wurde die Ligandbindung an rekonstituiertes Integrin in Liposomenmembranen untersucht. Ferner wurden erste Experimente durchgeführt, die eine direkte, spezifische Bindung von cyclo(RGDfV) an natives, zellulär exprimiertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten nachgewiesen haben. Die Identifizierung der Ligandsignale und eine Bestimmung des Bindungsepitops anhand der STD NMR-Spektren waren jedoch aufgrund zahlreicher Signalüberlagerungen limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die störenden und im STD NMR-Spektrum beobachtbaren Signale, die durch Zellbestandteile und deren zahlreichen Bindungsprozesse verursacht werden, so weit zu unterdrücken, dass eine Bestimmung des Bindungsepitops des Liganden in Wechselwirkung mit lebenden Zellen möglich wird. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die durch lebende Zellen eingeführten Suszeptibilitätssprünge zu Problemen in den NMR-Spektren führen. Der Vergleich von Bindungsvorgängen an intakten Proteinen in Zellen mit denen an reintegrierten Liposomen sollte Auskunft geben, in wieweit diese Proteine in Liposomen wirklich die Zustände eines nativen Proteins beschreibt.

Teil B

Das SARS Coronavirus (SARS-CoV) ist der Erreger des Schweren Akuten Atemwegssyndroms (SARS), das im Winter 2002/03 als alarmierende Epidemie mit insgesamt etwa 8000 infizierten Menschen und einer Sterberate von etwa 10% bekannt wurde. Im ersten Schritt der Infektion vermittelt die von der Arbeitsgruppe um M. Farzan identifizierte Rezeptorbindungsdomäne (RBD)⁷⁸ des viralen *spike* (S)-Proteins den Kontakt des Virus zum humanen Rezeptor, der von der gleichen Arbeitsgruppe als *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) identifiziert wurde.³⁵ Die RBD des SARS-CoV S-Proteins umfasst die Aminosäuren 318-510 und ist in der S1-Domäne des Proteins lokalisiert.

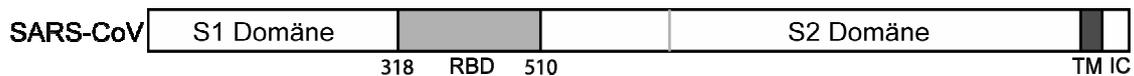


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Domänenstruktur S1 und S2 des S Proteins und eingezeichnet die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) sowie die Transmembrandomäne (TM) und der intrazelluläre Abschnitt (IC).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, das Bindungsepitop der RBD des SARS-CoV *spike* Proteins gegenüber dem humanen Rezeptor ACE2 auf molekularer Ebene zu charakterisieren und ein minimales Bindungsepitop zu bestimmen. Anhand der durchgeführten Studien soll eine Leitstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors der Virusinfektion vorgeschlagen werden.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Teil A

Die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit Frau Dr. B. Claasen entstanden.¹⁰⁷ Dabei war Frau Dr. B. Claasen für die Programmierung des hier verwendeten Pseudo-2D-STD NMR-Experiments (stdw5sp2d.bc), die Implementierung der $T_{1\rho}$ -Filter (stdw5slsp2d.bc) sowie für die Variierung von NMR-Pulsprogrammen verantwortlich. Die Idee der vorgestellten Methode sowie die Interpretation der Ergebnisse wurden gemeinsam analysiert, diskutiert und publiziert.¹

4.1 NMR-Spektroskopie mit humanen Thrombozyten

4.1.1 Präparation der Zellsuspensionen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten NMR-Messungen mit intakten humanen Thrombozyten wurden Thrombozytenkonzentrate benutzt, die für Transfusionszwecke aus Vorsichtsmaßnahmen nicht mehr verwendet wurden. Um geeignete Bedingungen für die NMR-Spektroskopie zu schaffen, d.h. möglichst geringe Intensitätseinbußen aufgrund der Resonanz von Wasser zu haben, gleichzeitig aber auch nahezu physiologische Bedingungen zu schaffen, wurden die Thrombozyten in einen deuterierten Puffer überführt. Dabei wurden Blutplasmabestandteile sowie die bei der Herstellung des Konzentrats zugesetzten Substanzen wie Citratpuffer und Glucose entfernt. Die verwendeten Puffer waren durch Tris gepufferte Lösungen, wobei für die Umpufferung insgesamt drei unterschiedliche Zusammensetzungen verwendet wurden (Tabelle 8 in Abschnitt 7.1). Entsprechend der in 7.3.1 beschriebenen Durchführung wurden die Thrombozyten in der Zentrifuge sedimentiert, der Überstand dekantiert und anschließend das zurückbleibende Thrombozytenpellet resuspendiert. Dazu wurde zunächst der deuterierte Puffer *d*-TBS-AEBSF-EDTA verwendet, dem zur Komplexbildung von Metallionen 1 mM EDTA- Na_2 und zur irreversiblen Inhibition von Cystein- und Serinproteasen 1 mM AEBSF-HCl zugesetzt wurde. Dieser Zusatz ist insbesondere dann wichtig, wenn in der Zellsuspension die Interaktion eines Peptids mit den Thrombozyten untersucht werden soll. Durch Lyse der Zellen werden lösliche Proteasen sowohl bei der Umpufferung als auch bei den NMR-Experimenten freigesetzt. Metalloproteasen und membrangebundene Aminopeptidasen hingegen werden durch AEBSF-HCl nicht deaktiviert und können zur Proteolyse von Ligandpeptiden oder zum Abbau der Integrinmoleküle führen. Wie R. Meinecke im Rahmen seiner Dissertation untersucht hat, war

jedoch für das hier erneut untersuchte cyclische Peptid cyclo(RGDfV) kein messbarer Zerfall durch Proteasen zu beobachten. Nach mehrmaligem Wiederholen der Sedimentation und Resuspendierung folgten ein Schritt mit Puffer ohne Zusatz von EDTA-Na₂ (*d*-TBS-AEBSF) und anschließend die Zugabe des NMR-Messpuffers mit einem Zusatz von 1 mM CaCl₂. Ca²⁺-Ionen sind für die Aktivierung der Rezeptormoleküle Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ notwendig. Für die in 4.1.3 beschriebenen STDD NMR-Experimente wurden zwei NMR-Proben benötigt. Dazu wurde die hergestellte Zellsuspension auf zwei NMR-Röhrchen aufgeteilt und zu der einen Zellsuspension 150 nmol cyclo(RGDfV) aus einer Stammlösung des Peptids hinzu gegeben. Die präparierten NMR-Proben enthielten etwa 7×10^9 Thrombozyten, was ungefähr einer Menge von 100 bis 600 pmol Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ entspricht, wenn angenommen wird, dass ca. $1-5 \times 10^4$ Moleküle Integrin auf einer Zelle präsentiert werden. Für die im folgenden Abschnitt beschriebenen STD NMR-Experimente wurde jeweils nur die Probe benötigt, die die Zellsuspension und den Liganden enthält.

4.1.2 STD NMR-Spektroskopie mit humanen Thrombozyten

Das untersuchte Rezeptor-Ligand System, bestehend aus humanen Thrombozyten und cyclo(RGDfV) in deuteriertem TBS, ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

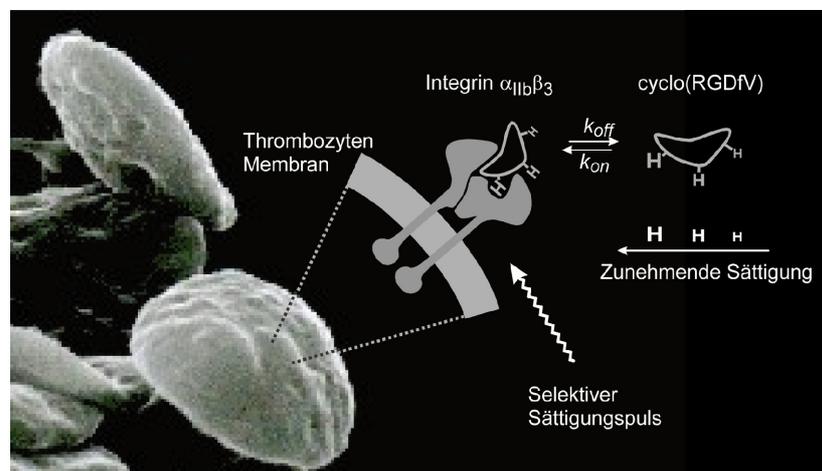


Abbildung 10: Schematische Darstellung des mit STD NMR-Spektroskopie untersuchten Rezeptor-Ligand Systems. Es sollte die Ligandbindung zu membrangebundenen Proteinen in lebenden Zellen untersucht werden: auf der linken Seite sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten dargestellt. Im rechten Bildabschnitt ist schematisch vergrößert das membranverankerte Intergrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit gebundenem und freien Liganden cyclo(RGDfV) gezeigt.

Die Anwendung eines so genannten *spinlock*-Feldes oder $T_{1\rho}$ -Filters ist eine etablierte NMR Methode, um Signale großer Moleküle zu unterdrücken.¹⁰⁸ In Abbildung 11 sind jeweils die ^1H STD-Spektren der Thrombozytensuspension mit dem Liganden cyclo(RGDfV) abgebildet, die ohne Anwendung eines *spinlock*-Feldes (oben) und mit 30 ms (15 dB) $T_{1\rho}$ -Filter (unten) aufgenommen wurden. Im unteren Spektrum ist zu erkennen, dass insbesondere die Signale mit großer Linienbreite unterdrückt werden können, gleichzeitig jedoch auch eine deutliche Verminderung der Signalintensität des Liganden zu beobachten ist. Außer den Resonanzen von Val H γ/γ' und Phe H δ,ϵ,ζ ist eine eindeutige Identifizierung von Ligandsignalen in diesem Spektrum nicht möglich, da auch hier noch zahlreiche andere Bindungsereignisse in Form von STD-Signalen das zu beobachtende Bindungsereignis überlagern. Wie R. Meinecke bereits zeigen konnte, lässt sich so nur die spezifische Bindung des Peptids an den auf den Thrombozyten exprimierten Rezeptor Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ detektieren, nicht aber das Bindungszeptop des Liganden näher charakterisieren. Dazu sollte ein zweiter Differenzfilter erzeugt werden, der sämtliche Hintergrundsignale eliminiert.

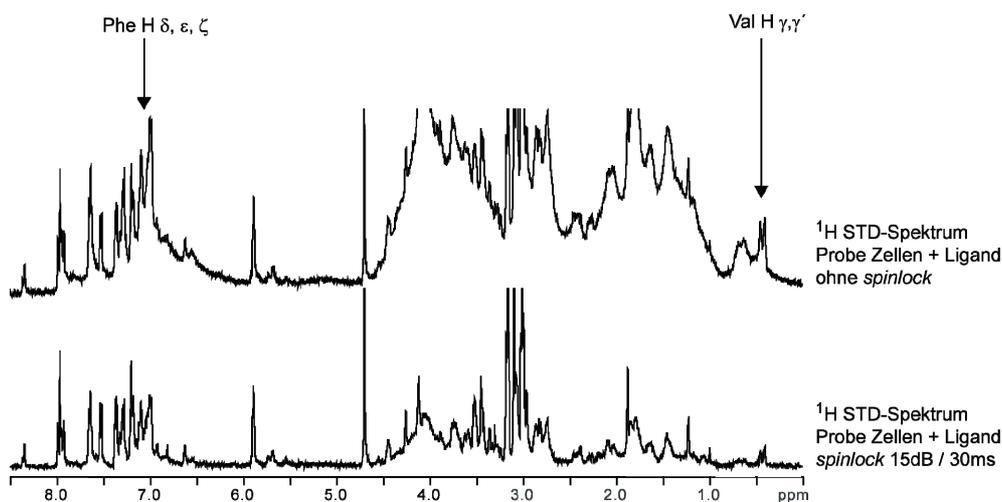


Abbildung 11: ^1H STD NMR-Spektren der Thrombozytensuspension mit dem Liganden cyclo(RGDfV), aufgenommen ohne Anwendung eines *spinlock*-Feldes (**oben**) und mit 30 ms (15 dB) $T_{1\rho}$ -Filter (**unten**). Lediglich die Resonanzen von Val H γ/γ' und Phe H δ, ϵ, ζ können eindeutig identifiziert werden.

4.1.3 STDD NMR-Spektroskopie - Der doppelte Differenzfilter

Die Idee, die dem doppelten Differenzfilter (*Saturation Transfer Double Difference*, STDD) zugrunde liegt, ist in Abbildung 12 schematisch gezeigt. Die hergestellte Zellsuspension wird auf zwei NMR-Röhrchen aufgeteilt, so dass beide Proben über eine identische Zusammensetzung an Zellen, Proteinen, Membranbruchstücken, etc. verfügen. Dies ist

wichtig, damit in den später aufgenommenen STD NMR-Spektren die gleichen Bindungsprozesse beobachtet und durch Subtraktion eliminiert werden können.

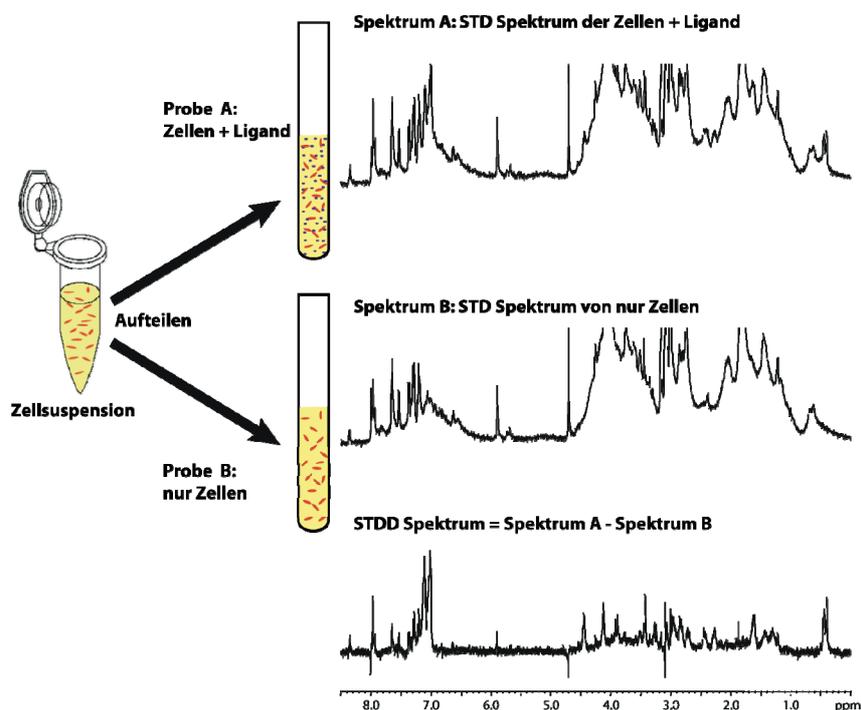


Abbildung 12: Schematische Übersicht über die Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR Methode zur Detektion der Bindung von Liganden (angedeutet durch violette Punkte) an membrangebundene Rezeptoren in lebenden Zellen (dargestellt durch rote Ellipsen). Die in deuteriertem Puffer hergestellte Zellsuspension wird auf zwei NMR-Röhrchen aufgeteilt und zu einer der Proben (Probe A) die entsprechende Menge Ligand dazugegeben. Das andere Röhrchen (Probe B) enthält nur die identische Zellsuspension. Von beiden Probe wird ein STD NMR-Spektrum aufgenommen und von den erhaltenen Spektren anschließend die Differenz (Spektrum A – Spektrum B) gebildet. Das so erhaltene doppelte Differenzspektrum (STDD Spektrum) zeigt fast ausschließlich die STD-Signale des bindenden Liganden.

Zu einer der Proben wird Ligand aus einer Stammlösung hinzugegeben und anschließend werden die STD-Spektren beider Proben aufgenommen. Dabei dient das Spektrum der Probe, die nur die Zellsuspension enthält, als Referenzspektrum, das anschließend von dem Spektrum der Zell-Ligand-Suspension subtrahiert wird. Da ein STD-Spektrum bereits ein Differenzspektrum darstellt, resultiert so ein doppeltes Differenzspektrum, in dem idealerweise nur die Resonanzen des Liganden sichtbar und einer quantitativen Auswertung zugänglich werden. In Abbildung 13 sind die erhaltenen STDD-Spektren und der Filtereffekt dieser Methode zusammengefasst.

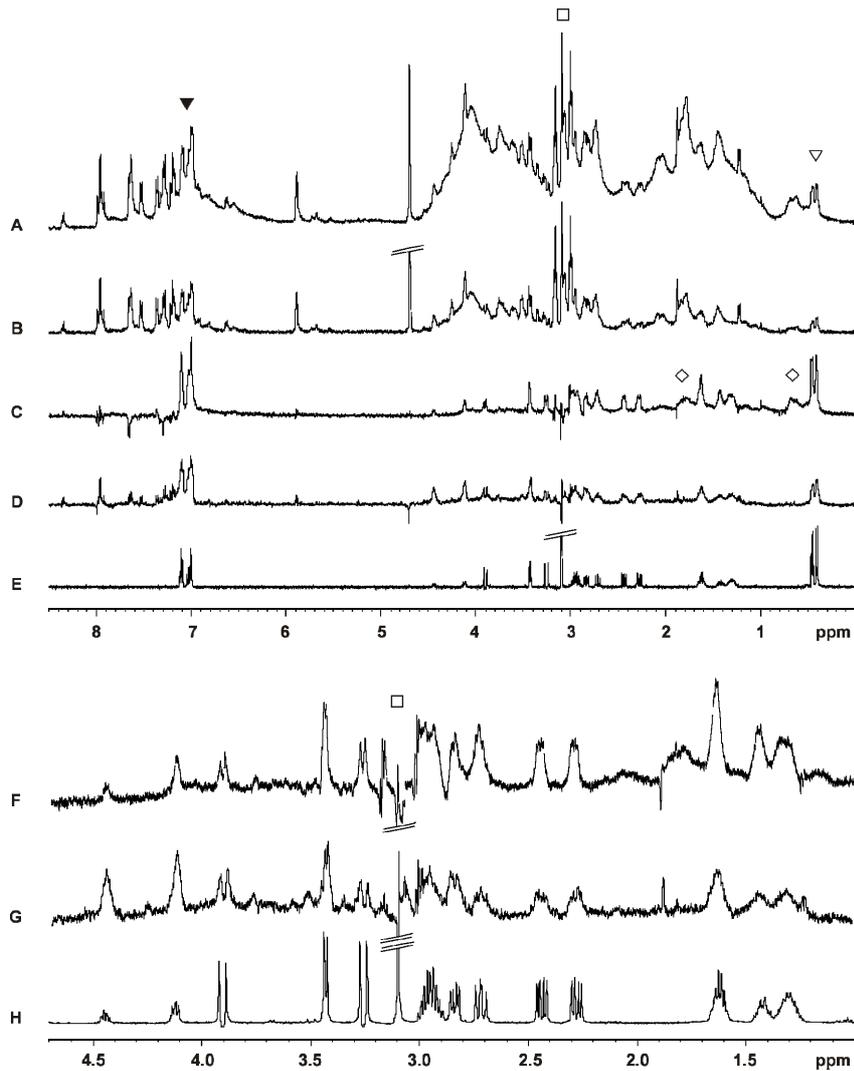


Abbildung 13: Effekt des doppelten Differenzfilters der STDD-Technik: **A** zeigt das überlagerte ^1H STD NMR-Spektrum der Zellsuspension und cyclo(RGDfV) bei 500 MHz. Nur die mit einem Dreieck markierten Signale können eindeutig quantifiziert werden (\blacktriangledown Phe H δ , ϵ , ζ ; \triangledown Val H γ, γ'). Signale von Proteinen und anderen Bindungsprozessen überlagern die eigentlich interessanten STD-Signale des Liganden. Wie in 4.1.2 beschrieben bewirkt ein $T_{1\rho}$ -Filter von 30 ms Länge bei 500 MHz nur eine unbefriedigende Unterdrückung der Thrombozytensignale (**B**). Sowohl das STDD-Spektrum aufgenommen bei 700 MHz (**C**) als auch bei 500 MHz (**D**) zeigen eindeutig den Filtereffekt dieser Methode bei Vergleich mit dem Referenzspektrum des Liganden (**E**) (\diamond Thrombozytensignale). (**F**), (**G**) und (**H**) zeigen Ausschnitte aus den Spektren (**C**), (**D**) respektive (**E**). Die Wasserunterdrückung wurde durch eine WATERGATE Sequenz (w5) erreicht, mit Ausnahme für das Spektrum (**C**), in dem die WATERGATE 3-9-19 Sequenz verwendet wurde. Alle Spektren wurden in deuteriertem TBS und bei 283 K aufgenommen (\square Tris).

Die durch Subtraktion der STD-Spektren erhaltenen doppelten Differenzspektren in Abbildung 13 (C) und (D) enthalten fast ausschließlich Resonanzen des Inhibitorpeptids cyclo(RGDfV). Der Vergleich mit dem Referenzspektrums des Liganden (E) zeigt, dass die störenden, überlagerten Thrombozytensignale nahezu perfekt eliminiert werden konnten. Der Filtereffekt wird besonders deutlich im Spektralbereich zwischen 1.1 und 4.6 ppm (Abbildung 13 F, G und H), in dem die Peptidresonanzen vollständig von der Hüllkurve der Thrombozyten im STD-Spektrum (A) überdeckt wurden. Der Grund für die im 700 MHz STDD-Spektrum (C) sichtbaren Verunreinigungen, im Vergleich zu dem Spektrum aufgenommen bei 500 MHz (D), ist nicht geklärt. Auf der Basis der gezeigten STDD-Spektren ist eine eindeutige Zuordnung der Ligandsignale und darüber hinaus eine Bestimmung des Bindungsepitopes möglich. Die standardmäßige Unterdrückung von großen Molekülen in STD-Spektren durch einen $T_{1\rho}$ -Filter führt gleichzeitig zu einem Verlust von Sättigung durch T_1 - und T_2 -Relaxationsprozesse und damit zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Auf die Anwendung eines *spinlock*-Feldes kann bei der STDD NMR-Spektroskopie verzichtet werden, was in diesem Fall zu einem 1.5fach höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Spektren B und D) resultierte. Die Spektren können innerhalb einer Stunde Aufnahmedauer erhalten werden, so dass eine schnelle und empfindliche Methode zur Verfügung steht, um die Ligandbindung an membranständige Rezeptoren in lebenden Zellen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie direkt zu beobachten.¹

4.1.4 Die Bindung von cycloRGDfV an humane Thrombozyten

Das von Kessler *et al.* entwickelte zyklische Pentapeptid cycloRGDfV bindet mit einer Bindungskonstante von 5 μM an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.^{23;52}

Die quantitative Auswertung der STDD-Spektren ergibt das in Abbildung 14 (B) dargestellte Bindungsepitop von cyclo(RGDfV), gebunden an nativ exprimiertes Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf humanen Thrombozyten. Wie leicht zu erkennen ist, erhalten die individuellen Protonen entsprechend ihrer Nähe zum Rezeptor einen unterschiedlichen Sättigungstransfer. Die Ergebnisse sind den STD NMR-Bindungsstudien von R. Meinecke gegenübergestellt.^{102;106} Darin wurde die Bindung des Inhibitorpeptids an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, eingebettet in Liposomen, charakterisiert. Die drei Protonen Arg H δ/δ' sowie Gly H α zeigen in dem hier untersuchten Thrombozyten-Ligand-System signifikante Abweichungen in den STD-Antworten, was darauf hindeutet, dass im Vergleich zu löslichem Integrin, welches in Liposomen eingebettet vorliegt, ein etwas veränderter Bindungsmodus zum nativen Rezeptor besteht. Die veränderten STD-Effekte indizieren vermutlich eine etwas andere Orientierung von Glycin

sowie der Argininseitenkette zum Rezeptor. Abgesehen von diesem Unterschied stimmen die erhaltenen relativen STD-Effekte der beiden Systeme gut überein und das von R. Meinecke charakterisierte Bindungsepitop kann bestätigt werden. Die stärksten STD-Effekte können für Arg H α,β und Phe H δ,ϵ,ζ beobachtet werden. Die Protonen der Alkylseitenkette von Arg zeigen entsprechend einer hydrophoben Wechselwirkung in der Nähe des Peptidrückgrades eine zunehmende Sättigung.

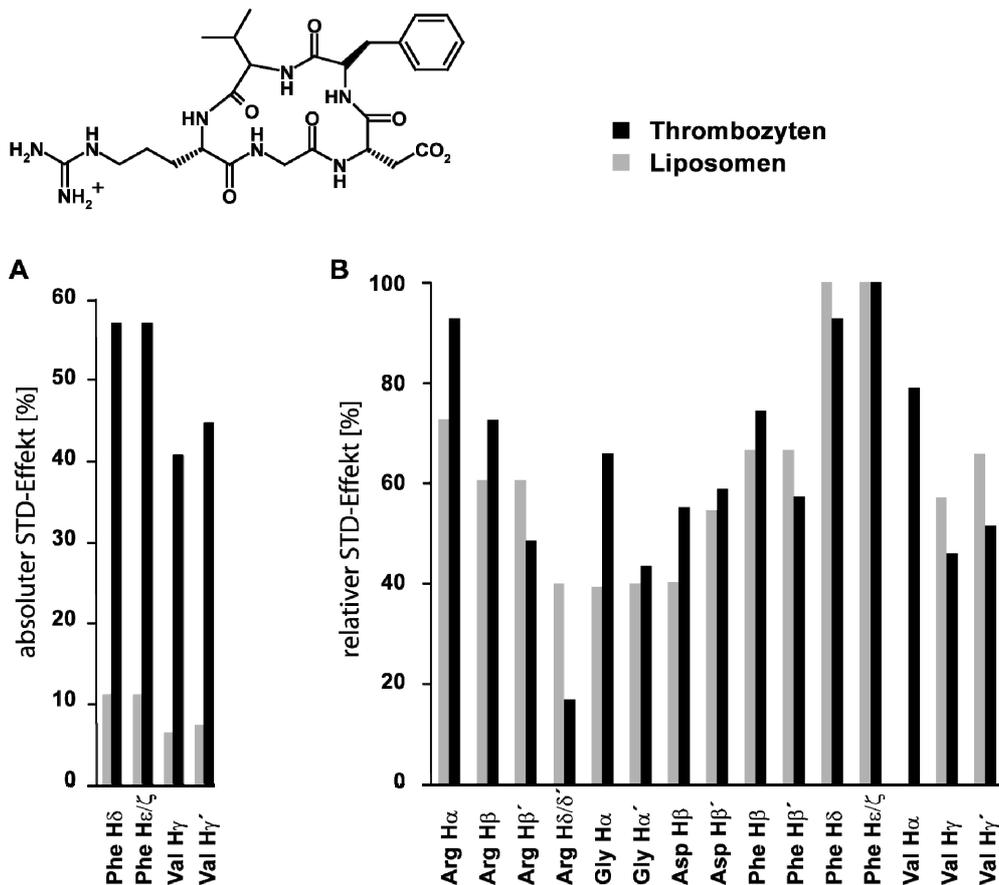


Abbildung 14: Vergleich der STD-Effekte und des Bindungsepitopes von cycloRGDfV bestimmt mit Liposomen und Thrombozyten. (oben) Chemische Strukturformel des Inhibitorpeptids cyclo(RGDfV), (A) zeigt anhand von vier Peptidgruppen, dass der absolute STD-Effekt mit Thrombozyten (schwarz) signifikant höher ist als mit Liposomen (grau). Das Säulendiagramm in (B) gibt das Bindungsepitop von cyclo(RGDfV) gebunden an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nativ in humanen Thrombozyten (schwarz) und rekonstituiert in Liposomen (grau) wieder. Das Resonanzsignal für Val H α konnte im Spektrum der Liposomen nicht analysiert werden.

Ein entscheidender Vorteil der STDD-Technik liegt darin, dass das Rezeptorprotein in seiner natürlichen Umgebung belassen werden kann. Wie in Abbildung 14 (A) anhand von vier

Protonengruppen exemplarisch zu erkennen ist, weist die Interaktion von cyclo(RGDfV) mit nativem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ etwa 5fach höhere STD-Prozente auf als mit reintegriertem Protein in Liposomen bei gleichem Ligandüberschuss. Die Rezeptorkonzentration in der Thrombozytensuspension betrug $\sim 0.6 \mu\text{M}$ und in den Liposomenpräparationen $5 \mu\text{M}$ unter der Annahme, dass 50% der Integrimoleküle entsprechend der natürlichen Orientierung in die Membran eingebettet vorlagen. Die Tatsache, dass trotz niedrigerer Rezeptordichte in der Zellsuspension eine 5fach stärkere STD-Antwort des Liganden zu beobachten ist, deutet auf eine stärkere Affinität von cyclo(RGDfV) zu nativem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ im Vergleich zu löslichem Integrin in Liposomen hin. Dies ist nicht verwunderlich, insbesondere vor dem Hintergrund, dass für eine Integration von Membranproteinen in Liposomen diese isoliert, gelöst und gereinigt werden müssen und dieser Prozess sicherlich mit erheblichen Verlusten an nativ gefaltetem Protein verbunden ist.

Da Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ das bei Weitem häufigste Membranprotein auf Thrombozyten ($\sim 53\%$ aller membranständigen Proteine) darstellt, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die STDD-Signale von anderen Rezeptoren verursacht werden können.

4.2 Diskussion

Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen den Wert dieser Methode, um damit die direkte Ligandbindung an Membranproteine in lebenden Zellen zu untersuchen. Bei Verwendung von Cryoprobeköpfen und größeren Magnetfeldstärken lässt sich die Empfindlichkeit weiter erhöhen, so dass bereits wenige Picomol Membranprotein ausreichen sollten, um eine Ligandbindung zu detektieren. Damit wären auch Bindungsstudien an Zelllinien, die GPCRs in einer Dichte von etwa 10^6 Rezeptoren pro Zelle überexprimieren, mit der STDD-Technik zugänglich. Die ersten STDD-Bindungsstudien an einem 7-Helix-Transmembranrezeptor konnten erfolgreich durchgeführt werden.¹⁰⁹ Dazu wurde die Bindung von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des Glycoproteins GP120 des HIV an dem Korezeptor CCR5, eingebettet in Liposomen, mit dieser Technik untersucht und auf molekularer Ebene charakterisiert.

Darüber hinaus erscheint es plausibel, mit der STDD-Technik biochemische Prozesse an Membranproteinen zu beobachten, die am zytoplasmatischen Abschnitt oder etwa an Organellen und am Zellkern stattfinden. Als zukünftiger Ausblick für die Methode sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch Informationen über den Bindungs- und damit Wirkmodus von Medikamenten in Gewebe und Organen zugänglich sein müsste.

Teil B

4.3 Bindungsstudien von RBD-Peptiden des SARS-CoV und ACE2

4.3.1 Synthese der Peptidbibliothek B1

Die von der Arbeitsgruppe um M. Farzan identifizierte Rezeptorbindungsdomäne (RBD)⁷⁸ des SARS-CoV *spike* (S) Proteins umfasst die Aminosäuren 318-510 und besitzt die im Folgenden dargestellte Aminosäuresequenz:

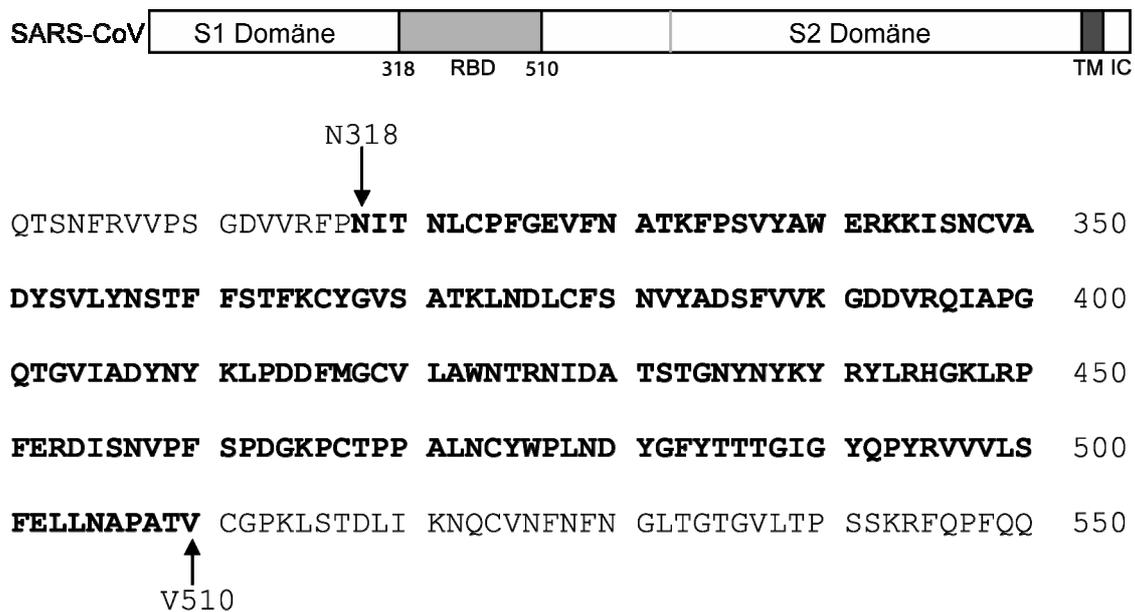


Abbildung 15: **oben:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur S1 und S2 des S-Proteins und eingezeichnet die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) sowie die Transmembrandomäne (TM) und der intrazelluläre Abschnitt (IC). **unten:** Die 193 Aminosäuren umfassende Sequenz der RBD (UniProt Eintrag P59594, SPIKE-CVHSA).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, das Bindungsepitop der RBD des SARS-CoV *spike* Proteins genauer zu charakterisieren und aus den gewonnenen Erkenntnissen eine Leitstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors zu identifizieren. Es wurde zunächst eine Peptidbibliothek erstellt, die annähernd die 193 Aminosäuren der Domäne beinhaltet. Dazu wurde die Sequenz in 16 Dodecapeptide unterteilt, wobei die in der natürlich vorkommenden Primärstruktur enthaltenen Cysteine durch Serin ersetzt wurden. Um eine handhabbare Bibliothekgröße hinsichtlich Synthese, Reinigung und Charakterisierung zu erhalten, wurde die Unterteilung in die resultierenden Peptide so gewählt, dass die 16 Verbindungen in

direkter Abfolge die Sequenz wiedergeben, d.h., dass zunächst keine Überlappung der jeweiligen Peptidsequenzen vorlag. Es konnten somit die 192 Aminosäuren N318-T509 in der Bibliothek **B1** abgedeckt werden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die synthetisierten Peptide, die erfolgreich mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese entsprechend der Durchführungen aus 7.4.2 und 7.4.3 dargestellt werden konnten. Anstelle der natürlichen Carboxylfunktion am C-Terminus wurden die Peptide als C-terminale Amide vom Harz abgespalten. Die Reinigung der jeweilig erhaltenen Rohprodukte erfolgte durch Ausfällen mit *tert*-Butylmethylether (AAV 5) und anschließende RP-HPLC (AAV 6). Die Identifizierung der von der Säule eluierten Produkte erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach der in 7.4.5 beschriebenen Durchführung.

*Tabelle 2: Aminosäuresequenzen der synthetisierten RBD Peptidbibliothek **B1**, sowie die entsprechenden mit MALDI-TOF-MS identifizierten Masse-zu-Ladungs Quotienten (M+H)⁺.*

Peptid	Sequenz	Fragment	Molmasse [g/mol]	MALDI-TOF-MS (M+H) ⁺ [m/z]
1	NITNLSPFGEVF	N318-F329	1335.7	1336.6
2	NATKFPSVYAW	N330-E341	1410.7	1411.8
3	RKKISNSVADYS	R342-S353	1365.7	1366.6
4	VLYNSTFFSTFK	V354-K365	1451.7	1352.5
5	SYGVSATKLNDL	S366-L377	1265.7	1266.4
6	SFSNVYADSFVV	S378-V389	1332.6	1333.3
7	KGDDVRQIAPGQ	K390-Q401	1281.7	1282.7
8	TGVIADYNYKLP	T402-P413	1351.7	1353.1
9	DDFMGSVLAWNT	D414-T425	1353.6	1355.2
10	RNIDATSTGNYN	R426-N437	1323.6	1324.3
11	YKYRYLRHGKLR	Y438-R449	1651.0	1652.4
12	PFERDISNVPFS	P450-S461	1405.7	1406.6
13	PDGKPSTPPALN	P462-N473	1191.6	1192.6
14	SYWPLNDYGFYT	S474-T485	1523.7	1524.5
15	TTGIGYQPYRVV	T486-V497	1351.7	1352.7
16	VLSFELLNAPAT	V498-T509	1272.7	1273.6

4.3.2 SPR-*screening* der RBD-Peptide aus der Bibliothek **B1**

Die RBD-Peptide **1-16** sollten jeweils auf ihre Bindungsaffinität gegenüber dem Wirtszellrezeptor ACE2 untersucht werden. Dazu wurde mit Hilfe des SPR-Sensorchipsystems ein *screening* von **B1** durchgeführt. In einem ersten Durchgang wurden 11 fmol rekombinantes humanes ACE2 (R&D Systems) entsprechend der in 7.5.1 beschriebenen Durchführung auf einem CM5-Chip immobilisiert. Anschließend wurden die Peptide **1-16** jeweils im Messpuffer (TBS, s. Tabelle 8) gelöst und nacheinander über das immobilisierte Protein geleitet (Durchführung 7.5.2.) Unter der Annahme, dass pro Molekül ACE2 lediglich eine spezifische Wechselwirkungsregion bzw. eine Ligandbindungstasche vorhanden ist, wird bei 11 fmol Rezeptor ein maximaler theoretischer RU-Wert ($RU_{\text{theor.}}$) von 17 RU bei einer Molmasse des Liganden von $M = 1500 \text{ g/mol}$ erwartet. Von den sechzehn untersuchten RBD-Peptiden zeigten die Verbindungen **11** und **14** eine eindeutige Interaktion mit dem Rezeptor. Ligand **11** ergab eine SPR-Antwort von 32 RU bei einer Konzentration von $c = 250 \text{ }\mu\text{M}$ und für Peptid **14** resultierte ein SPR-Signal von 30 RU bei einer höheren Konzentration von $c = 500 \text{ }\mu\text{M}$. Die erhaltenen RU-Werte liegen im Rahmen von $RU_{\text{theor.}}$, deuten jedoch darauf hin, dass auch unspezifische Wechselwirkungen mit dem Rezeptor stattfinden. Die Sensorgramme der Liganden **11** und **14** sind jeweils in den Abbildung 16 und Abbildung 17 gezeigt. Während der Injektion (1 min, Flussrate $5 \text{ }\mu\text{L}$) ist für beide Verbindungen ein deutlicher Assoziationsverlauf der Kurve festzustellen, die nach etwa 10 s abflacht und in den Sättigungsbereich oder den so genannten *steady state* übergeht, in dem sich die oben genannten Differenzantworten der beiden Liganden ablesen lassen. Der Verlauf der Kurve zeigt nach der Injektion ein erfreuliches Dissoziationsverhalten, da bereits nach etwa 50 s sämtliche Ligandmoleküle vom Rezeptor in den Laufpuffer diffundiert und weggespült sind, d.h. die Basislinie wieder den Ursprungswert erreicht hat. Auf eine zusätzliche Regeneration konnte somit verzichtet werden. Das Verhalten der Liganden entspricht dem einer typischen SPR-Bindungsaffinität und lässt daher auf eine spezifische Interaktion der RBD-Peptide mit ACE2 schließen. Die am Anfang und Ende der Injektion auftretenden Peaks im Sensorgramm sind gerätebedingte Puffersprünge.

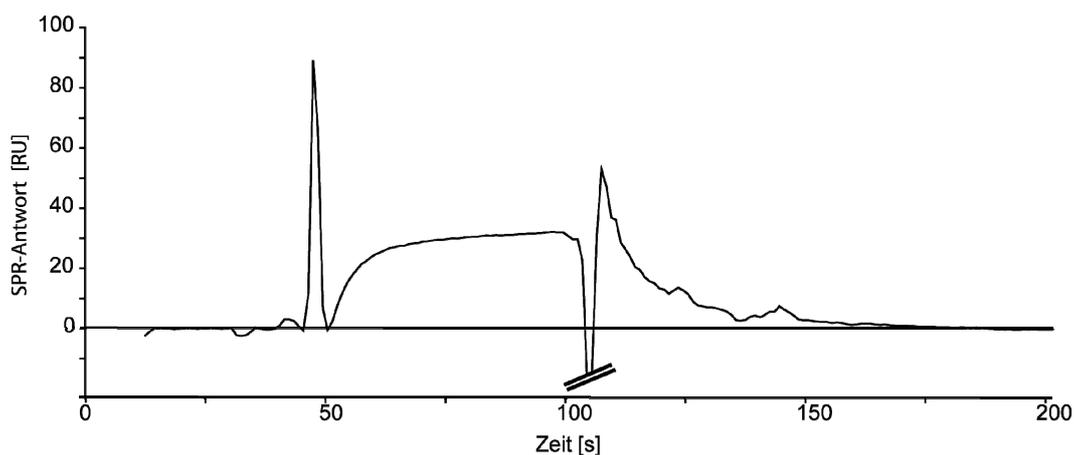


Abbildung 16: SPR-Sensorgramm von **11** bei einer Konzentration von $c = 250 \mu\text{M}$ und 11 fmol immobilisiertem ACE2. Die SPR-Differenz Antwort beträgt 32 RU.

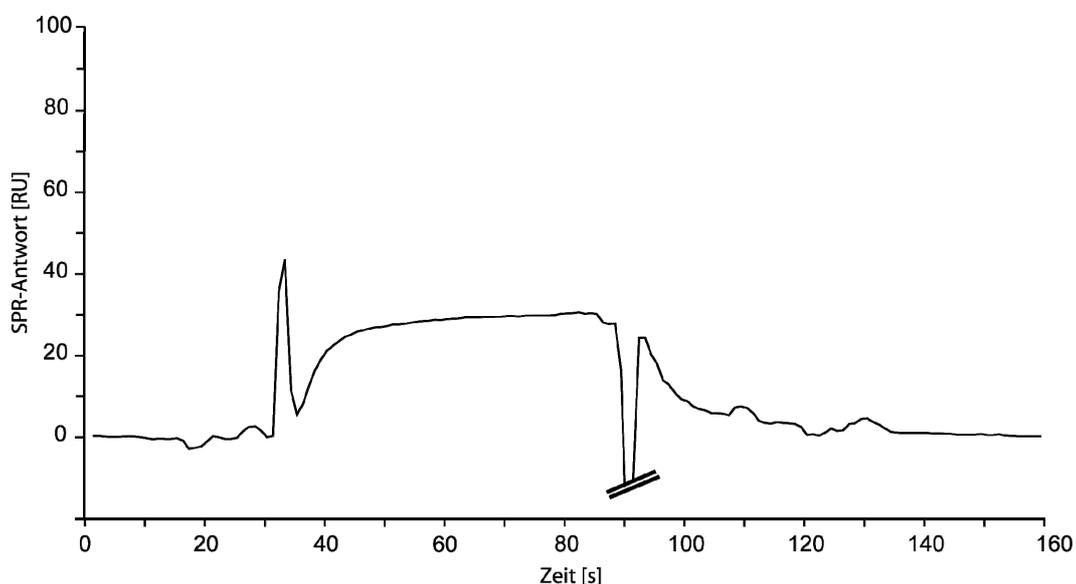


Abbildung 17: SPR-Sensorgramm von **14** bei einer Konzentration von $c = 500 \mu\text{M}$ und 11 fmol immobilisiertem ACE2. Die SPR-Differenz Antwort beträgt 30 RU.

Die Liganden **1-10**, **12**, **13**, **15** und **16** zeigten in diesem ersten *screening* keine Affinität gegenüber ACE2. Stellvertretend für diese Liganden sind in Abbildung 18 die Sensorgramme der Verbindungen **2**, **5**, **10** und **13** exemplarisch aufgeführt. Die Sensorgramme zeigen keinerlei positive Assoziation, vielmehr kommt es direkt nach den gerätebedingten Puffersprüngen am Anfang und Ende der Injektion zur Wiederherstellung der Basislinie. Die Injektion von TBS ohne Liganden zeigte ein vergleichbares Sensorgramm.

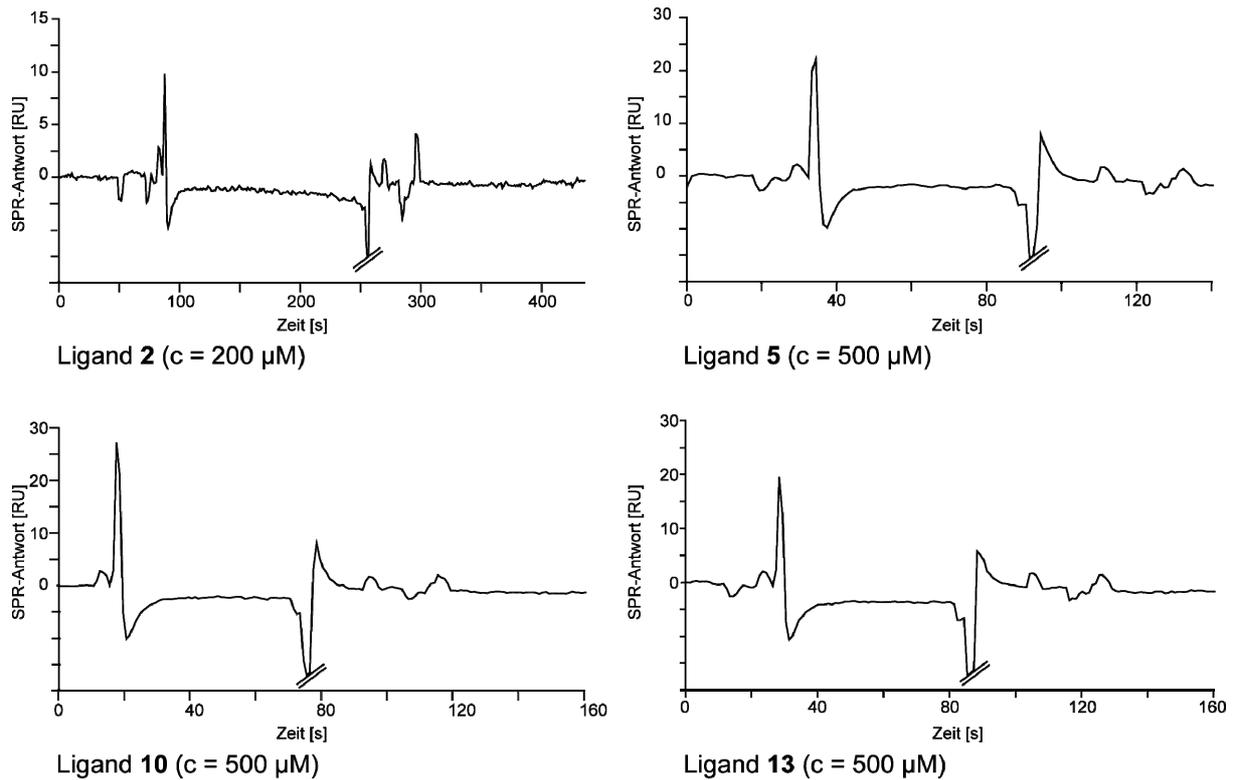


Abbildung 18: Exemplarisch ausgewählte SPR-Sensorgramme von den nicht bindenden Peptiden **2**, **5**, **10** und **13**.

Um für weitere *screening* Versuche die Empfindlichkeit der Messungen zu erhöhen, wurden auf eine weitere Flusszelle 54 fmol ACE2 immobilisiert, das entspricht bei einer Molmasse der Liganden von $M \approx 1500$ g/mol einem theoretisch maximal zu erwartenden RU-Signal von ca. 81 RU. Durch die so gesteigerte Empfindlichkeit konnte unter diesen Bedingungen neben einer Bestätigung der bereits identifizierten Bindungspartner **11** und **14** eine weitere Interaktion beobachtet werden. Bei Ligand **15** konnte mit einer Peptidkonzentration im Puffer von $c = 1.3$ mM eine SPR-Antwort von 52 RU gemessen werden. In Abbildung 19 links ist das SPR-Sensorgramm von **15** gezeigt. Im Vergleich dazu zeigten **11** und **14** unter diesen Bedingungen vergleichbare RU-Antworten von etwa 60 RU bereits bei Konzentrationen von 15 μ M respektive 125 μ M. Alle weiteren untersuchten Verbindungen zeigten keine oder insignifikant kleine RU-Antworten. Exemplarisch ist in Abbildung 19 rechts die Biacore-Kurve des Peptids **3** dargestellt. Diese zeigt bei einer dreifach so konzentrierten Lösung von $c = 3$ mM lediglich eine Antwort von 15 RU. Zudem gibt das erhaltene Sensorgramm keine typische Bindungskurve wieder. Einerseits fällt die Kurve nach der Injektion analog den nicht bindenden Peptiden stark in den negativen Bereich, andererseits findet keine vollständige

Dissoziation statt, vielmehr scheint das Peptid unspezifisch auf der Proteinoberfläche zu haften. Dieser Ligand wurde daher als Nichtbinder klassifiziert.

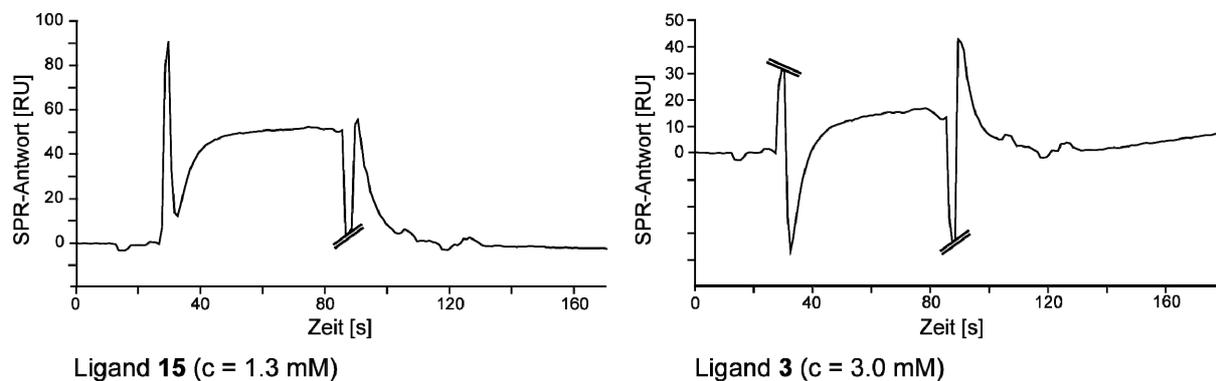


Abbildung 19: *links*: SPR-Sensorgramm des bindenden RBD-Peptids **15** bei einer Chip Belegung von 54 fmol ACE2, *rechts*: SPR-Sensorgramm des als Nichtbinder betrachteten Peptids **3** unter gleichen Chip-Bedingungen.

Abbildung 20 gibt eine Übersicht über die aus dem *screening* der Bibliothek **B1** hervorgegangenen Bindungsaffinitäten. Das Bindungsepitop der RBD konnte auf die zwei Regionen Y438-R449 sowie S474-V497 eingegrenzt werden.

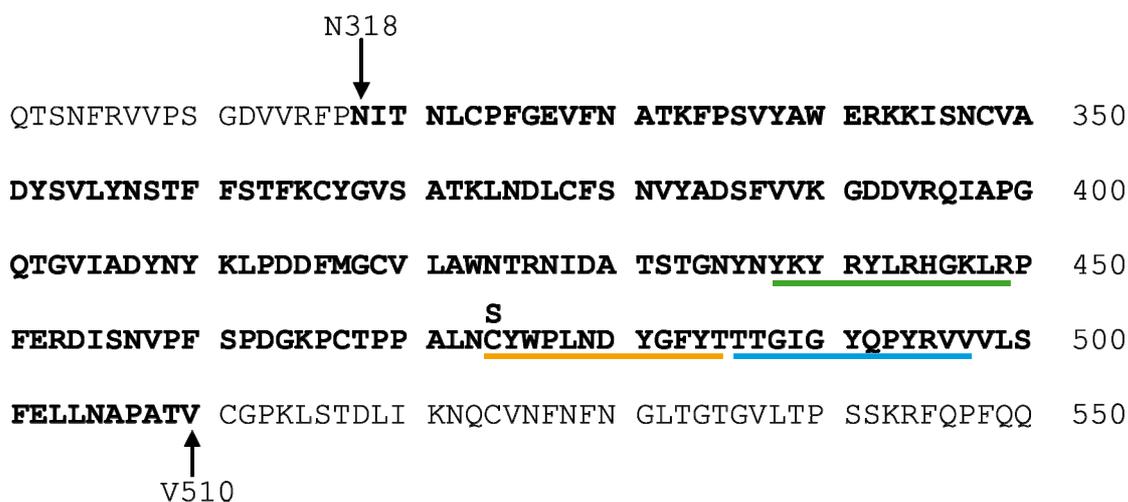


Abbildung 20: Bindungsepitop der untersuchten RBD Peptidbibliothek **B1**: die stärkste Bindungsaffinität gegenüber ACE2 zeigt Peptid **11** (Y438-R449, YKYRYLRHGKLR, grün unterstrichen), gefolgt von den Liganden **14** (S474-T485, SYWPLNDYGFYT, gelb unterstrichen) und **15** (T486-V497, TTGIGYQPYRVV, blau markiert), wobei letzterer die geringste Affinität aufweist. Bei allen anderen RBD-Peptiden konnte keine signifikante Wechselwirkung zu ACE2 beobachtet werden.

Nach der Identifizierung der bindenden Liganden **11**, **14** und **15** sollten diese in konzentrationsabhängigen SPR-Messungen charakterisiert werden. Allgemein zeichnet sich eine spezifische Wechselwirkung mit einem Rezeptor dadurch aus, dass sich die beobachtbare Interaktion mit steigender Ligandkonzentration einem maximalen Gleichgewichtswert entsprechend der Dissoziationskonstanten K_D annähert. Wird das Bindungsereignis mit dem *one-site-binding* Modell beschrieben, entspricht im Fall des SPR-Experiments dem theoretischen Gleichgewichtszustand der RU_{max} -Wert bei unendlich hoher Ligandkonzentration (Gleichung 3). Um einen thermodynamischen *fit* durchführen zu können, werden die im *steady state* abgelesenen RU-Antworten als Funktion der entsprechenden Ligandkonzentration aufgetragen.

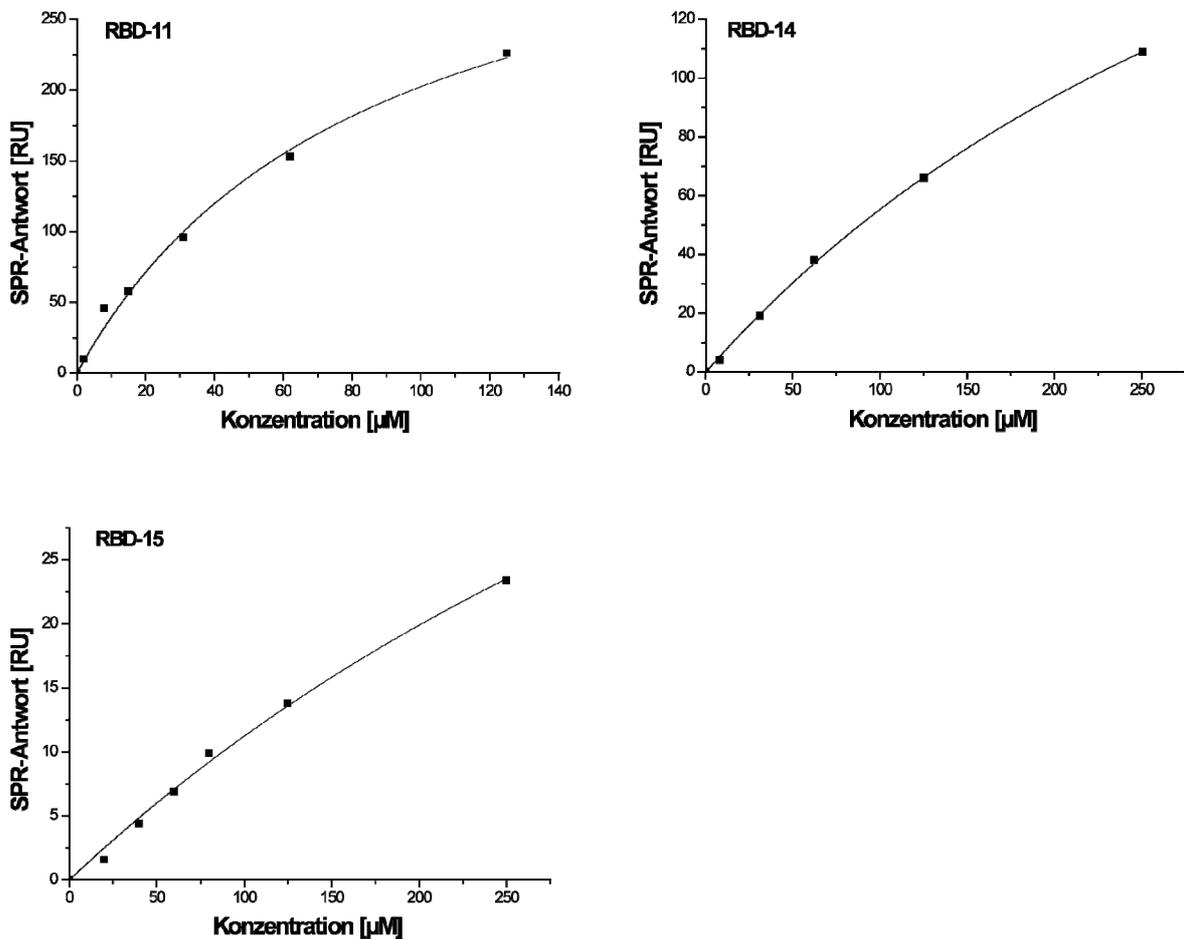


Abbildung 21: SPR-Differenz Antworten der identifizierten RBD Liganden als Funktion der Konzentrationen im Messpuffer. Die Datenpunkte wurden mit Hilfe der Software Origin 7.5 (Origin Lab) an das *one-site-binding* Modell angepasst. **links oben:** Peptid **11** zeigt eindeutig die stärkste Bindung im Vergleich zu den annähernd gleich affinen Peptiden **rechts oben:** Peptid **14** und **links unten:** Peptid **15**.

Die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen SPR Untersuchungen der Peptide **11**, **14** und **15** sind in der Abbildung 21 gezeigt. Für Peptid **11** ergibt sich aus dem *fit* eine Dissoziationskonstante $K_D = 85 \pm 14 \mu\text{M}$ und der Ligand weist demnach eine fünffach höhere Affinität als Peptid **14** auf. Dessen Dissoziationskonstante beträgt $K_D = 450 \pm 36 \mu\text{M}$. Mit einer Konstante $K_D = 672 \pm 168 \mu\text{M}$ zeigt Peptid **15** eine leicht geringere Bindungsaffinität als Verbindung **14**.

Neben der thermodynamischen Analyse der erhaltenen SPR-Antworten lassen sich anhand der Sensorgramme auch Aussagen über die Kinetik ableiten. Durch Anpassung an die Langmuir-Gleichung mit Hilfe der Software BiaEvaluation 3.0 (Biacore) lassen sich entsprechend Gleichung 1 die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation $k_{\text{on}} [\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}]$ sowie der Dissoziation $k_{\text{off}} [\text{s}^{-1}]$ ermitteln.

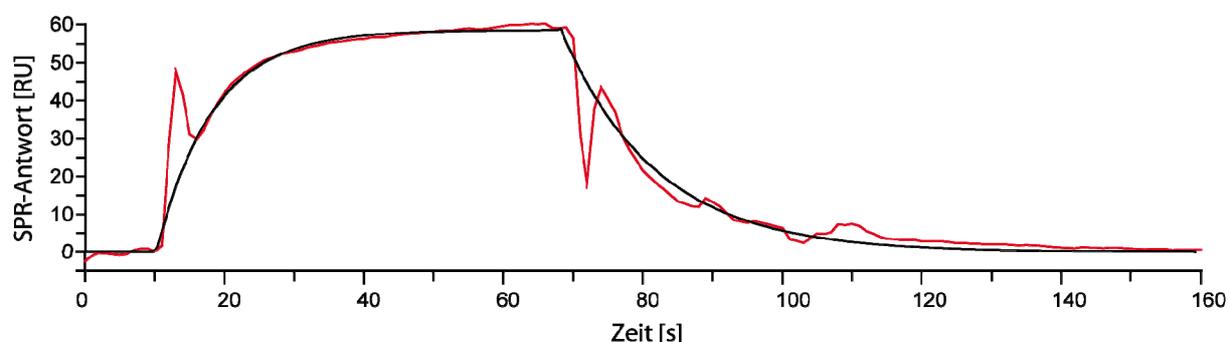


Abbildung 22: Exemplarisch gezeigte Kinetikanalyse: Sensorgramm des Peptids **11** (rot), das bei einer Konzentration von $c = 15 \mu\text{M}$ erhalten wurde, und die Anpassung an die Langmuir-Gleichung (schwarz).

Für das Peptid **11** beträgt die gemittelte Geschwindigkeitskonstante der Assoziation $k_{\text{on}} = 1.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Die Peptide **14** und **15** zeigen mit den Konstanten $k_{\text{on}} = 3.7 \times 10^2 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bzw. $3.2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ eine etwa fünffach niedrigere Assoziationsrate. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ist für alle drei Peptide mit $k_{\text{off}} = 0.12 \text{ s}^{-1}$ (**11**), 0.16 s^{-1} (**14**) und 0.15 s^{-1} (**15**) vergleichbar. Die aus den erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten resultierenden Dissoziationskonstanten $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ sind $K_D = 67 \mu\text{M}$ (**11**), $430 \mu\text{M}$ (**14**) und $450 \mu\text{M}$ (**15**). Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, stimmen diese Werte mit den aus der thermodynamischen Analyse erhaltenen Daten sehr gut überein.

Tabelle 3: Übersicht über die Bindungsparameter der Verbindungen **11**, **14** und **15**: K_D (RU_{max}) entspricht der Dissoziationskonstanten erhalten aus dem thermodynamischen fit mit RU_{max} als extrapoliertem RU -Wert, K_D (k_{off}/k_{on}) wurde aus den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} erhalten. Diese wurden jeweils aus mehreren fits bei unterschiedlicher Ligandkonzentration gemittelt: für Peptid **11** (8, 15, 31, 62, 125 μM), **14** (62, 125, 250 μM) und **15** (80, 125, 250 μM).

Peptid	Aminosäuresequenz	K_D [μM]	RU_{max}	K_D [μM] (k_{off}/k_{on})	k_{off} [s^{-1}] / k_{on} [$s^{-1}M^{-1}$]
11	YKYRYLRHGKLR	85	374	67	$0.12 / 1.8 \times 10^3$
14	SYWPLNDYGFYT	450	305	430	$0.16 / 3.7 \times 10^2$
15	TTGIGYQPYRVV	670	87	450	$0.15 / 3.3 \times 10^2$

Die hier vorgestellten Ergebnisse des SPR-screenings der RBD Peptidbibliothek **B1** stehen in Einklang mit den Daten einer Röntgenkristallstrukturanalyse, die etwa zeitgleich von der Forschungsgruppe um M. Farzan veröffentlicht wurde.⁷⁹ Anhand eines Kristallstrukturkomplexes (Abbildung 3), bestehend aus der Rezeptorbindungsdomäne des SARS-CoV (Aminosäuren 323-502, mit Ausnahme von 376-381) und der N-terminalen Peptidasedomäne (Sequenz 19-615) von ACE2, wurde innerhalb der RBD ein so genanntes Rezeptorbindungsmotiv (RBM) definiert. Dieses besteht aus einer exponierten Schleife, die die Aminosäuresequenz 424-494 umfasst und sämtliche Kontakte zu ACE2 ausbildet. Insbesondere scheinen sechs Tyrosine einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung der RBD zum Rezeptor zu haben. Die in dieser Arbeit identifizierten Peptide **11**, **14** und **15** enthalten 60% der Aminosäuren, die in dem kristallisierten Proteinkomplex direkte Wechselwirkungen mit dem Rezeptor aufweisen. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Y440, Y442, Y475, N479, Y484, T486, T487, G488 und Y491. Ebenso wie in dem Kristallkomplex fällt das hier identifizierte RBD Bindungsepitop, wie in Abbildung 20 gezeigt, durch den hohen Anteil an Tyrosinen auf. In Peptid **11** sind die Tyrosine Y438, Y440 und Y442 enthalten, wobei letztere in der Kristallstruktur direkte Kontakte zu ACE2 aufweisen. Der Ligand **14** beinhaltet die Tyrosine Y475, Y481 und Y484, von denen das N- und C-terminale Tyrosin mit ACE2 wechselwirken und Peptid **15** umfasst die Tyrosine Y491 und Y494, wobei Y491 sich in unmittelbarer Nähe zum Rezeptor befindet. Ferner enthalten die Peptide **14** und **15** diejenigen Aminosäuren, die verantwortlich für die Adaption des Virus an den Menschen gemacht werden, d.h. die Mutationen, die notwendig waren, damit das Virus humane Zellen infizieren konnte (K479N und S487T).⁸⁰⁻⁸²

4.3.3 Synthese der Peptidbibliothek **B2**

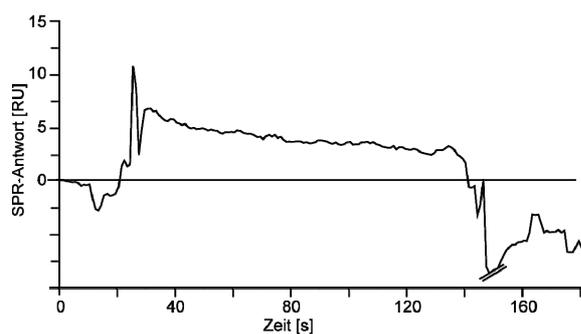
Das im Rahmen des ersten SPR-*screenings* identifizierte Bindungsepitop der RBD des SARS-CoV sollte näher charakterisiert und eingegrenzt werden. Dazu wurde eine neue Bibliothek aus Hexapeptiden konzipiert, die die Primärstrukturen der Verbindungen **11**, **14** und **15** erfassen sowie sich in ihrer Sequenz jeweils um drei Aminosäuren überlappen. Dies führte zu der in Tabelle 4 aufgeführten Bibliothek **B2** mit insgesamt 14 Hexapeptiden, die die RBD Regionen N453-E452 (**17-21**) und A471-S500 (**22-30**) abdecken. Diese wurden erfolgreich mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese entsprechend der Durchführung aus 7.4.2 und 7.4.3 hergestellt. Die Reinigung der jeweilig erhaltenen Rohprodukte erfolgte durch Ausfällen mit *tert*-Butylmethylether (AAV 5) und anschließende RP-HPLC (AAV 6). Die Identifizierung der von der Säule eluierten Produkte erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach der in 7.4.5 beschriebenen Durchführung.

*Tabelle 4: Aminosäuresequenzen der synthetisierten RBD Peptidbibliothek **B2**, sowie die entsprechenden mit MALDI-TOF-MS identifizierten Masse-zu-Ladungs Quotienten (M+H)⁺.*

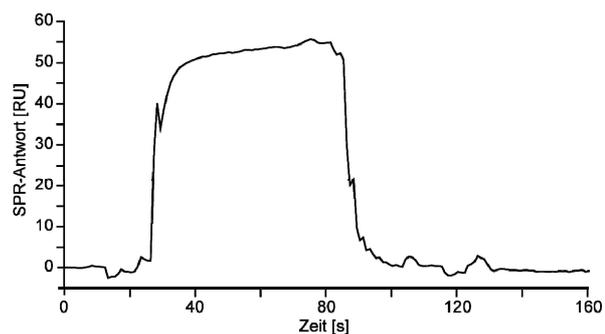
Peptid	Sequenz	Fragment	Molmasse [g/mol]	MALDI-TOF-MS (M+H) ⁺ [m/z]
17	NYNYKY	N435-Y440	862.4	863.6
18	YKYRYL	Y438-L443	903.5	904.5
19	RYLRHG	R441-G446	799.5	800.6
20	RHGKLR	R444-R449	764.5	765.4
21	KLRPFE	K447-E452	787.5	788.4
22	ALNSYW	A471-W476	751.4	752.2
23	SYWPLN	S474-N479	777.4	778.3
24	PLNDYG	P477-G482	676.3	677.5
25	DYGFYT	D480-T485	763.3	764.2
26	FYTTTG	F483-G488	687.3	688.5
27	TTGIGY	T486-Y491	609.3	610.4
28	IGYQPY	I489-Y494	738.4	739.8
29	QPYRVV	Q492-V497	759.4	760.5
30	RVVVLS	R495-S500	670.4	671.5

4.3.4 SPR-*screening* der RBD-Peptide aus der Bibliothek **B2**

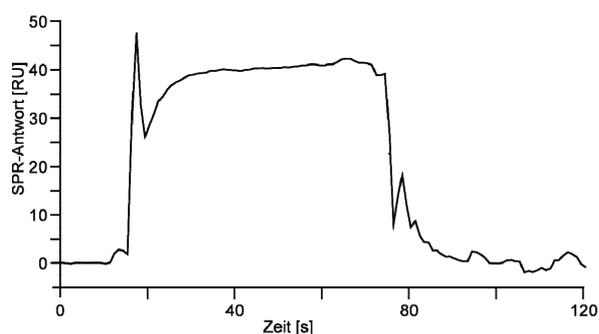
Durch die Überlappung in den jeweiligen Sequenzen sollte es möglich sein, mit Hilfe eines erneuten SPR-*screenings* diejenigen Regionen innerhalb des identifizierten Bindungs epitops zu lokalisieren, die an der Wechselwirkung mit ACE2 stark beteiligt sind. Das erste *screening* der Bibliothek **B2** wurde bei einer Immobilisierung des SPR-Chips von 48 fmol Rezeptor durchgeführt. Dies entspricht bei einer durchschnittlichen Molmasse der Liganden von etwa 900 g/mol einem theoretisch maximal zu erwartenden RU-Signal von 43 RU. Die Ligandkonzentrationen wurden bis maximal 2 mM in TBS eingestellt. Von den 14 untersuchten Peptiden zeigten die Verbindungen **17** (N435-Y440; NYNYKY), **18** (Y438-L443; YKYRYL), **19** (R441-G446; RYLRHG), **22** (A471-W476; ALNSYW) und **23** (S474-N479; SYWPLN) Affinität zum Rezeptor. Die SPR-Antwort der Verbindung **28** legte die Vermutung auf eine sehr schwache Wechselwirkung nahe. Wie in Abbildung 23 zu sehen, ergab Peptid **18** bei einer Ligandkonzentration von 250 μ M die eindeutig stärkste SPR-Antwort von etwa 50 RU. Die angrenzenden Peptide **17** und **19** zeigten ebenso eine signifikante Wechselwirkung von 5 RU ($c = 250 \mu\text{M}$) und 34 RU ($c = 500 \mu\text{M}$). Die SPR-Antworten der Verbindungen **22** und **23** waren mit 5 und 7 RU vergleichbar mit der von Peptid **17**. Bei den Peptiden **17**, **22**, **23** und **28** war ein leichtes Absinken der Basislinie festzustellen. Unter Berücksichtigung dieser Basislinienverschiebung ergab sich für Ligand **28** eine geringe SPR-Antwort von 2 RU bei einer Konzentration von 250 μ M. Die übrigen Hexapeptide ergaben in diesem ersten SPR-*screening* der Bibliothek **B2** keine nennenswerten Bindungskurven. Zur Wiederholung des *screenings* wurden 74 fmol ACE2, entsprechend einem zu erwartenden theoretischen maximalen RU-Wert für die Peptide von 67 RU, auf einer neuen Flusszelle immobilisiert und anschließend die Liganden der Bibliothek mit Konzentrationen von bis zu 2 mM darüber geleitet. Hierbei konnten die Affinitäten der identifizierten Bindungspartner bestätigt werden und wiederum zeigte Peptid **18** eindeutig die stärkste Wechselwirkung mit dem Rezeptormolekül mit einem SPR-Signal von etwa 50 RU bei einer Konzentration von 125 μ M. Die schwache Affinität von Peptid **28** bestätigte sich in dieser Untersuchung und ergab eine SPR-Antwort von etwa 35 RU bei einer 8fach höheren Ligandkonzentration von 1 mM. Eine etwa doppelt so große Antwort ergab bei gleicher Konzentration Peptid **20** mit 80 RU. Darüber hinaus konnten auch sehr schwache Wechselwirkungen (Antwort < 30 RU) einiger anderer Verbindungen aus der Bibliothek beobachtet werden, wobei es sich um die Peptide **21** (13 RU, $c = 1 \text{ mM}$), **25** (18 RU, $c = 1 \text{ mM}$), **26** (28 RU, $c = 1 \text{ mM}$), **29** (25 RU, $c = 1 \text{ mM}$) und **30** (18 RU, $c = 1 \text{ mM}$) handelte.



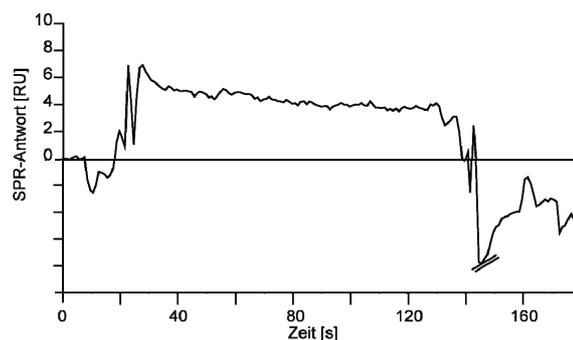
Ligand 17 (c = 250 µM)



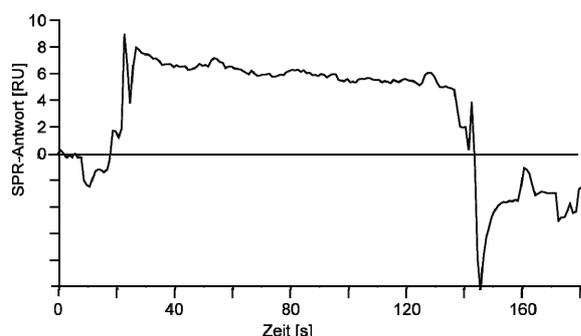
Ligand 18 (c = 250 µM)



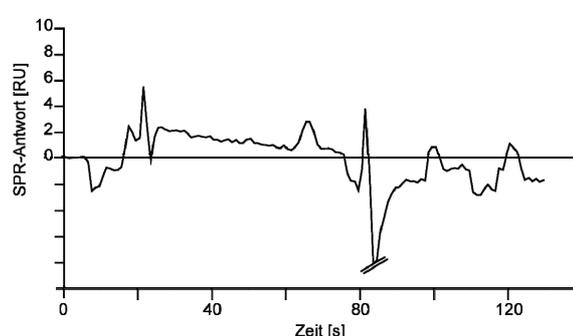
Ligand 19 (c = 500 µM)



Ligand 22 (c = 250 µM)



Ligand 23 (c = 250 µM)



Ligand 28 (c = 250 µM)

Abbildung 23: Sensorgramme der bindenden Hexapeptide 17, 18, 19, 22, 23 und des schwach wechselwirkenden Liganden 28. Für die Liganden 17, 22, 23 und 28 wurde aufgrund des Absinkens der Basislinie zur besseren Veranschaulichung eine Nulllinie hinzugefügt.

Das in Abbildung 20 gezeigte Bindungszeptor Y438-R449 sowie S474-V497 konnte durch die SPR-Bindungsstudien der Hexapeptidbibliothek **B2** näher eingegrenzt werden und ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

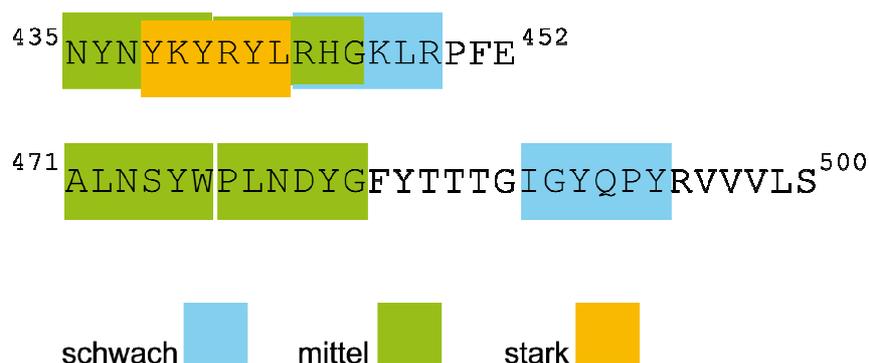


Abbildung 24: Verfeinertes Bindungsepitop, das durch die SPR-Studien der Peptidbibliothek **B2** erhalten wurde. Die eindeutig stärkste Wechselwirkung konnte mit dem Peptid **18** (YKYRYL) beobachtet werden. Eindeutige Affinitäten finden sich ferner in den N-terminalen Regionen der gezeigten Aminosäuresequenzen, das sind Liganden **17** und **19** bzw. **22** und **23**. Die sehr schwachen Wechselwirkungen von < 30 RU wurden in dieser Grafik nicht berücksichtigt. Die Einteilung in schwach (hellblau), mittel (grün) und stark (gelb) bezieht sich auf die beobachtete SPR-Antwort in [RU].

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, eine Leitstruktur zu identifizieren, die als Ausgangsstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors des SARS-CoV dient. Mit Hilfe der durchgeführten SPR-Bindungsstudien von den Bibliotheken **B1** und **B2** konnte ein minimales Bindungsepitop der RBD aufgezeigt werden. Dieses umfasst die Aminosäuresequenz Y438-L443, die in dem beschriebenen SPR-*screening* eindeutig die stärkste Wechselwirkung mit dem Rezeptor ACE2 zeigte. Die konzentrationsabhängigen SPR-Untersuchungen sowie die im folgenden Abschnitt 4.3.5 beschriebene Bestimmung des Bindungsepitops mit Hilfe von STD NMR-Spektroskopie beschränken sich daher auf das Peptid **18**. Die anderen bindenden Hexapeptide wurden nicht näher charakterisiert. In Abbildung 25 ist das konzentrationsabhängige Bindungsverhalten von Peptid **18** gezeigt. Eine Anpassung der Datenpunkte an das *one-site-binding* Modell gemäß Gleichung 3 ergibt eine Dissoziationskonstante von $K_D = 46 \pm 14 \mu\text{M}$, was einer 2fach höheren Affinität gegenüber Verbindung **11** entspricht. Mit Hilfe der Software BIAevaluation 3.0 wurde anhand der Sensorgramme, die bei den Konzentrationen 10, 15, 20, 25, 30, 35 μM aufgenommen wurden, zusätzlich eine kinetische Analyse des Bindungsverhaltens durchgeführt. Die darüber gemittelte Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} beträgt $3.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, die der Dissoziation ergibt einen Wert für k_{off} von 0.17 s^{-1} . Die daraus resultierende Dissoziationskonstante $K_D = k_{off}/k_{on}$ beträgt ebenfalls $46 \mu\text{M}$ und stimmt mit den Ergebnissen der thermodynamischen Analyse hervorragend überein.

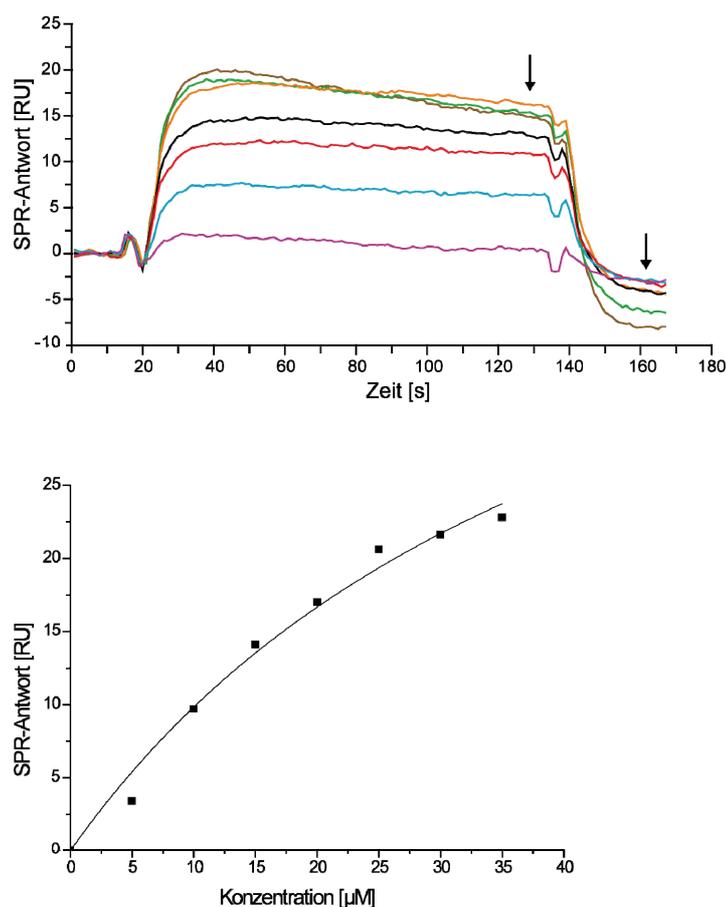


Abbildung 25: **oben**: Übereinander gelegte Sensorgramme von **18** (YKYRYL) aufgenommen bei einer Chipbelegung von 110 fmol Rezeptorprotein und folgenden Ligandkonzentrationen, von unten: violett $c = 5 \mu\text{M}$, hellblau $c = 10 \mu\text{M}$, rot $c = 15 \mu\text{M}$, schwarz $c = 20 \mu\text{M}$, orange $c = 25 \mu\text{M}$, grün $c = 30 \mu\text{M}$, hellbraun $c = 35 \mu\text{M}$. Die Pfeile markieren die Regionen, in denen jeweils die Differenz RU-Werte bestimmt wurden. **unten**: Aus den Sensorgrammen erhaltene SPR-Differenz Antworten als Funktion der Ligandkonzentrationen im Messpuffer. Die Datenpunkte wurden mit Hilfe der Software Origin 7.5 (Origin Lab) an das one-site-binding Modell angepasst.

4.3.5 STD NMR Bindungsepitop des Liganden **18**

Die aus den in 4.3.2 und 4.3.4 beschriebenen SPR-Untersuchungen hervorgegangene Peptidsequenz **18** (Y438-L443, YKYRYL) zeigte von den insgesamt 30 RBD-Peptiden die stärkste spezifische Wechselwirkung mit humanem ACE2. Es lag daher nahe, die Verbindung als potentielle Leitstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors der SARS-CoV Infektion genauer zu untersuchen. Zunächst sollte der Bindungsmodus des Peptids auf molekularer Ebene charakterisiert und mit den Daten der Röntgenkristallstrukturanalyse verglichen

werden. Dafür ist STD NMR-Spektroskopie eine ideale Methode, da die Experimente unter nahezu physiologischen und dynamischen Bedingungen durchgeführt werden können und die erhaltenen STD-Spektren eine Aussage über das Bindungsepitop des Liganden erlauben. Um möglichst wenig Intensitätseinbußen aufgrund des Wassersignals zu erhalten, wurde versucht, das Rezeptor-Ligand System bestehend aus ACE2 und Peptid **18** in einem deuterierten Puffersystem zu etablieren. Die dazu verwendete Proteincharge wurde von der Firma R&D Systems bezogen und enthielt 10 µg (83 pmol bei $M = 120$ kDa) rekombinantes humanes ACE2 gelöst in TBS (Tabelle 8). Entsprechend der in 7.6.2 beschriebenen Durchführung wurde der mitgelieferte Puffer mit Hilfe von Dialyseeinheiten durch deuterierten Puffer mit der gleichen Zusammensetzung und entsprechendem pH-Wert (*d*-TBS, s. Tabelle 8) ausgetauscht. Aus Vorsicht hinsichtlich der Stabilität und Aktivität des Proteins wurden sämtliche Schritte der Umpufferung, die über einen Zeitraum von mindestens 20 Stunden verlief, bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Vom Liganden wurde eine entsprechende Stammlösung in *d*-TBS hergestellt. Aufgrund der geringen Proteinmenge von 83 pmol wurden die NMR-Experimente in Shigemi NMR-Röhrchen mit einem Probenvolumen von 100 µL durchgeführt. Werden Ausbeuteverluste während der Umpufferung vernachlässigt, führte das zu einer Proteinkonzentration in den Proben von 0.8 µM. Die Peptidkonzentration in der NMR-Probe wurde auf 33 µM eingestellt, was einem 40fachen Ligandüberschuss entspricht. Die erhaltene Lösung in der NMR-Probe war klar und zeigte weder Trübung noch Niederschlag, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass eine homogene Lösung des Rezeptor-Ligand Systems in deuteriertem Puffer bei pH 8 vorlag. In Abbildung 26 sind die STD NMR-Spektren der durchgeführten Experimente gezeigt. Das STD-Spektrum von ACE2 mit Peptid **18** (**A**) zeigt eindeutig, dass Sättigung vom Protein auf den Peptidliganden übertragen wird. Darüber hinaus wird bei Vergleich mit dem Referenzspektrum (**C**) des Peptids sofort ersichtlich, dass erstens nicht alle Protonen und zweitens diese relativ zueinander unterschiedlich stark Sättigung erhalten. Dies ist z.B. besonders gut zu erkennen, wenn die auffälligen STD-Effekte der Aromaten der Tyrosine zwischen 6.6 und 7.1 ppm und die δ -Protonen von L443 zwischen 0.7 und 0.8 ppm in ihrer relativen Intensität zueinander verglichen werden. Weitere eindeutige STD-Effekte sind für die Protonen H δ/δ' von R441 (2.99 ppm), H β/β' der Tyrosine (2.7-2.95 ppm) und H ϵ/ϵ' von K439 (2.84 ppm) zu beobachten. Das gezeigte STD-Spektrum einer Probe nur mit Peptid **18** (**B**) unter ansonst identischen Bedingungen zeigt keinerlei STD-Artefakte und entspricht der Negativkontrolle.

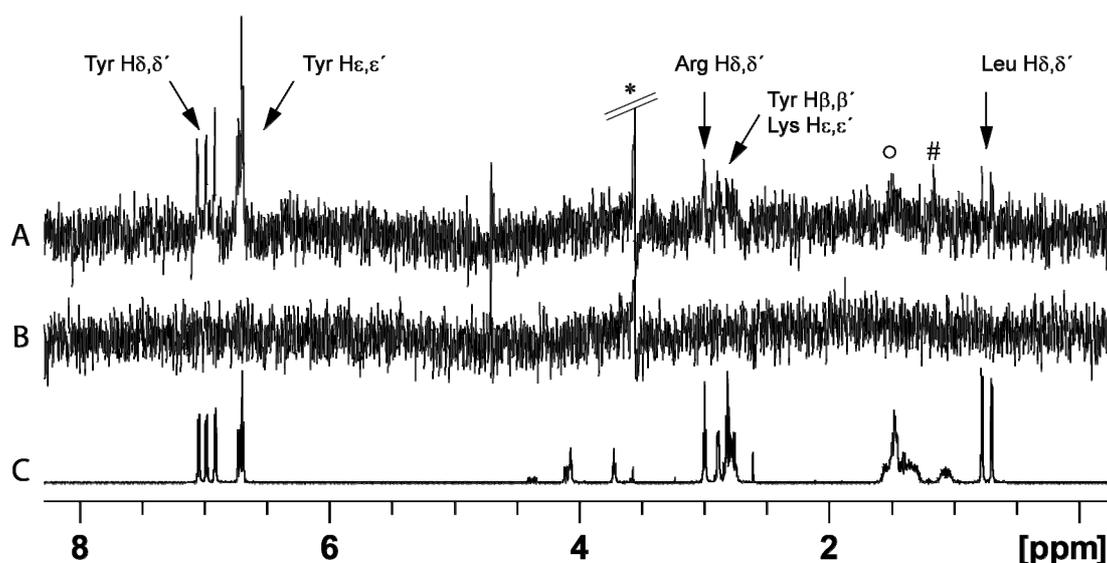
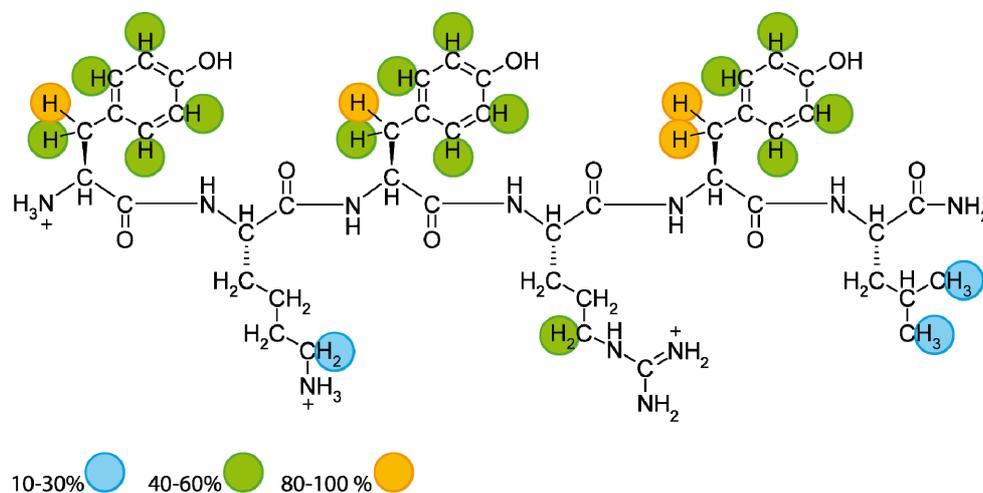


Abbildung 26: Sättigungstransfer von ACE2 auf den Liganden **18** (Y438-L443, YKYRYL):
 A) ^1H -STD NMR-Spektrum einer Probe mit $0.8\ \mu\text{M}$ ACE2 zusammen mit $33\ \mu\text{M}$ Peptid **18** bei 700 MHz und 3K scans. B) ^1H -STD NMR Spektrum einer Probe mit nur Peptid **18** unter den ansonst gleichen Bedingungen (Negativkontrolle). C) ^1H NMR-Spektrum einer $3.3\ \text{mM}$ Lösung von **18**. In allen Spektren wurde eine Wasserunterdrückung durch die WATERGATE Puls Sequenz (w5) erreicht. Die Spektren wurden in deuteriertem Puffer (d-TBS) bei 295 K in einem $100\ \mu\text{L}$ Shigemi NMR-Röhrchen aufgenommen; (* = TRIS, # = Proteinverunreinigung, o = Signale konnten aufgrund von Überlappungen nicht eindeutig dem Peptid zugeordnet werden).

Die Ergebnisse dieser STD NMR-Experimente bestätigen die mit Hilfe der SPR-Untersuchungen identifizierte Interaktion des Peptids YKYRYL mit dem Rezeptorprotein ACE2. Durch quantitative Auswertung der beobachteten STD-Effekte für die jeweiligen Protonenresonanzen konnte anhand des STD-Spektrums das Bindungs epitop des Liganden bestimmt werden (Abbildung 27). Das Bindungs epitop zeigt, dass alle sechs Aminosäuren mit dem Rezeptormolekül wechselwirken. Insbesondere zeigen jedoch die Tyrosine einen besonders dichten Kontakt zu ACE2. Der höchste STD-Effekt mit 9.3% (absolut) kann den β -Protonen von Y442 zugeordnet werden. Ebenso erhalten die aromatischen Protonen einen signifikanten Sättigungsgrad. Dabei kann für die Protonen H δ/δ' von Y438 mit 4.5% (absolut) ein geringfügig größerer STD-Effekt beobachtet werden, als für die Protonen H δ/δ' von Y440 und Y442 mit einer absoluten Sättigung von 4.1 und 3.9%. Ferner zeigen die Protonen H ε/ε' der drei Tyrosine eine Sättigung von 5.6 (Y438), 4.6 (Y440) und 4.9 (Y442) absoluten STD%. Der eindeutig beobachtete STD-Effekt für die Seitenkettenprotonen H δ/δ'

von R441 mit 4.6% deutet auf eine ionische Interaktion der Guanidinogruppe mit dem Rezeptor hin, etwa mit einer negativ geladenen Carboxylfunktion in der Seitenkette eines Aspartats oder Glutamats.



	Y442 H β	Y440 H β	Y438 H β	Y442 H β'	Y438 H ϵ/ϵ'	Y438 H β' H δ Y440 H β' H ϵ/ϵ' R441 H δ/δ' Y442 H ϵ/ϵ'	Y442 H δ/δ' Y440 H δ/δ'	L443 H δ K439 H ϵ/ϵ'	L443 H δ'
abs. STD%	9.3	8.6	8.3	7.6	5.6	4.5 - 4.9	3.9/4.1	2.4/2.7	1.5
rel. STD%	100	92	89	82	60	~ 50	~ 40	~ 30	16

Abbildung 27: STD NMR Bindungsepitop von Peptid **18** (Y438-L443, YKYRYL): Die farbigen Kreise zeigen die Bereiche der relativen STD% für die Protonen, die entsprechend ihrer Nähe zum Rezeptor ACE2 viel, wenig oder keine Sättigung erhalten. Der höchste Sättigungsgrad mit 9.3 STD% (absolut, vgl. Tabelle oben und Tabelle 21) konnte für die β -Protonen von Y442 beobachtet werden. Dieser Wert wurde als Referenz (100%) der gezeigten relativen STD% definiert.

Eine vergleichbare aber deutlich schwächere Wechselwirkung zeigt K439, deren Protonen H ϵ/ϵ' einen STD-Effekt von 2.7% zeigen. Die Protonen der Methylgruppen von L443 erfahren ebenfalls einen signifikanten Sättigungstransfer von 1.5 bzw. 2.4 STD%. Dies indiziert, dass eine der beiden Methylgruppen näher zur Proteinoberfläche steht als die andere. Zum Vergleich des STD-Bindungsepitops mit den Daten der Röntgenkristallstrukturanalyse⁷⁹ ist in Abbildung 28 ein Ausschnitt daraus gezeigt, der das Peptid YKYRYL im Komplex mit ACE2 darstellt. Dabei zeigt das Peptid die räumliche Lage, die es, eingebettet in die gesamte RBD, in der Kristallstruktur einnimmt. Hierin weisen die Tyrosine 440 und 442 direkte Kontakte zum Rezeptormolekül auf (vgl. auch Abbildung 3).

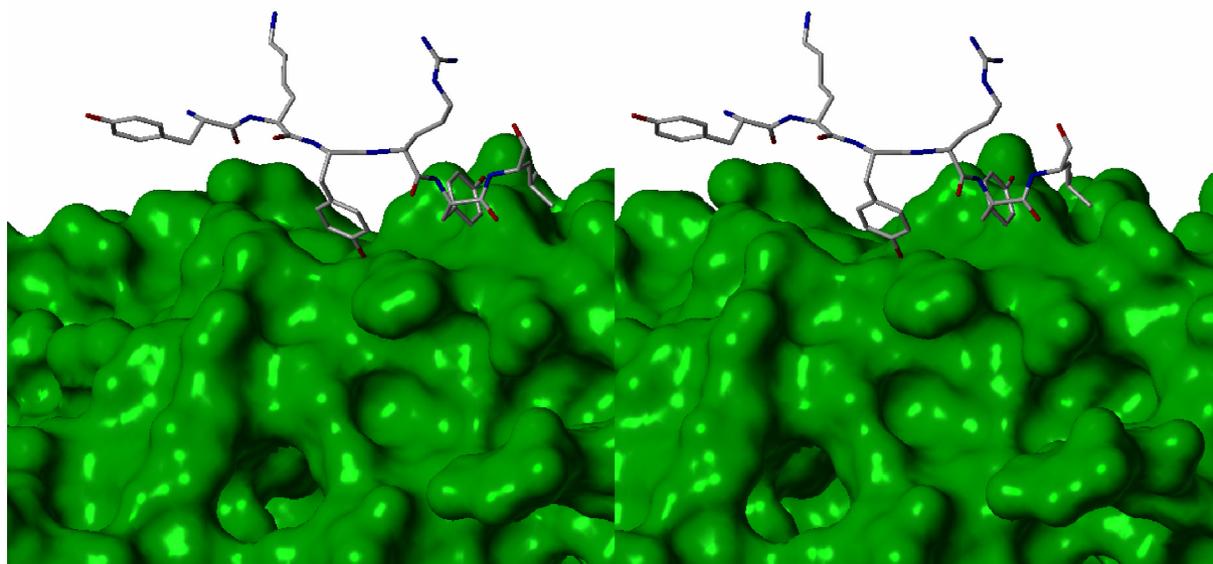


Abbildung 28: Röntgenkristallstruktur von ACE2 (grün) und der Sequenz Y438-L443 (YKYRYL) in *crossed-eye* Darstellung. Das Peptid zeigt die räumliche Lage, die es, eingebettet in die gesamte Rezeptorbindungsdomäne, in der Kristallstruktur einnimmt.

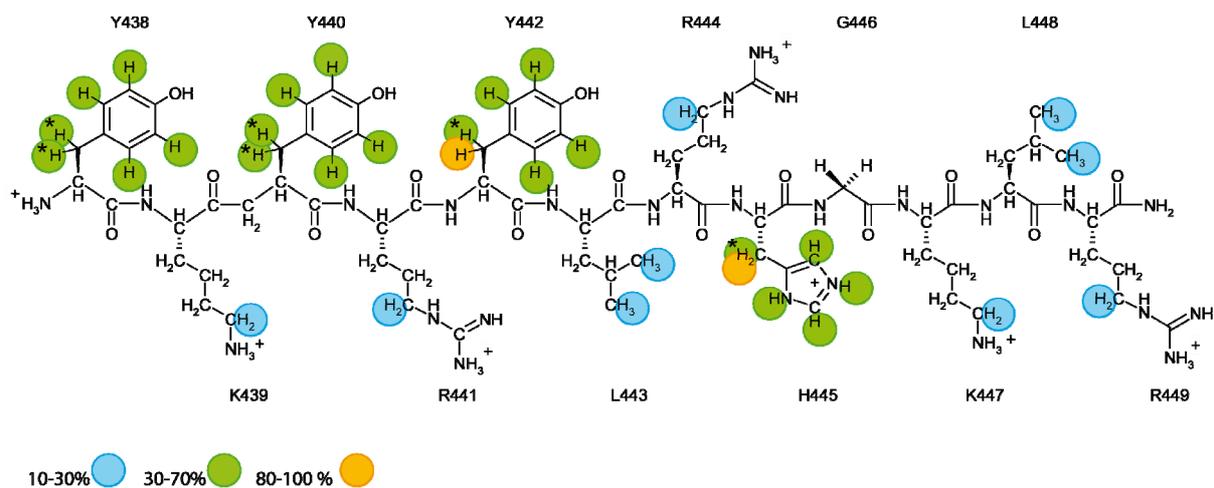
Diese räumliche Nähe spiegelt das STD-Bindungs epitop sehr gut wieder, jedoch wird zusätzlich eine Interaktion von Y438 mit ACE2 beobachtet. Der STD-Effekt für die Methylgruppen von L443 deckt sich mit den Daten der Röntgenkristallstrukturanalyse, in der die beiden Gruppen ebenfalls zur Rezeptoroberfläche gerichtet stehen. Die beobachteten STD-Effekte der Seitenkettenprotonen für K439 und R441 sind nicht in Einklang zu bringen mit der Konformation, wie sie für das Peptid in Abbildung 28 gezeigt ist. Die Seitenketten der beiden Aminosäuren weisen vom Rezeptor weg und sollten hiernach keine Sättigung im STD-Experiment erhalten. Das beobachtete Bindungs epitop zeigt daher, dass für das isolierte Peptid ein anderer Bindungsmodus gegeben ist, als für diesen Sequenzabschnitt, eingebettet in die RBD. Vor dem Hintergrund, dass für den Sequenzabschnitt Y438-L443 innerhalb der RBD im S-Protein wahrscheinlich eine andere Sekundärstruktur ausgebildet wird, als in dem flexiblen Hexapeptidliganden in Lösung, ist dieses Ergebnis jedoch nicht verwunderlich.

4.3.6 STD NMR Bindungs epitop des Liganden **11**

Aus dem *SPR-screening* der Bibliothek **B1** ging Verbindung **11** Y438-R449 (YKYRYLRH GKLR) als Ligand mit der größten Affinität zum Rezeptor ACE2 hervor. Da dieses Peptid die Sequenz der postulierten Leitstruktur **18** Y438-L443 (YKYRYL) beinhaltet und darüber hinaus um weitere sechs Aminosäuren in Richtung C-Terminus verlängert ist, sollte versucht werden, ebenfalls ein Bindungs epitop mit Hilfe von STD NMR-Spektroskopie

zu charakterisieren. Dadurch könnten eventuelle Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden, die dann für die Synthese eines Peptidomimetikums der Leitstruktur mitberücksichtigt würden. Wie auch bei den STD-Experimenten mit Peptid **18** wurde das Rezeptor-Ligand System bestehend aus ACE2 und Peptid **11** in einem deuterierten Puffersystem hergestellt (Durchführung in 7.6.2.). Die Proteinkonzentration in der NMR-Probe betrug 0.8 μM . Die Peptidkonzentration wurde auf 30 μM eingestellt, was einem etwa 40fachen Ligandüberschuss entspricht. Die STD NMR-Spektren wurden bei 295 K auf einem 700 MHz NMR-Spektrometer mit Cryoprobekopf und insgesamt 3k *scans* aufgenommen. In den ^1H STD NMR-Spektren (Ausschnitte in Abbildung 30) ist eindeutig zu sehen, dass Sättigung vom Rezeptormolekül ACE2 auf den Liganden übertragen wurde. Das aus den Spektren gewonnene signifikante Bindungsepitop ist in Abbildung 29 gezeigt. Die Spektren der Negativkontrolle (nicht gezeigt), die nur Ligand in *d*-TBS enthielt, wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen und enthielten keine STD-Artefakte.

Das aus dem STD-Experiment gewonnene Bindungsepitop für Peptid **11** unterstützt die Aussagen über das Bindungsverhalten der Leitstruktur **18**. Darüber hinaus liefert es weitere Erkenntnisse über den Bindungsmodus hinsichtlich der verlängerten C-terminalen Domäne. Wie bei der Verbindung **18** zeigen die Tyrosine Y438, Y440 und Y442 die stärksten STD-Effekte, wobei auch hier die β -Protonen von Y442 mit 28.7 STD% (absolut) mehr Sättigung erhalten als die entsprechenden Protonen von Y438 und Y440. Die Resonanzen H ϵ/ϵ' von K439, H δ/δ' von R441 sowie L443 können eindeutig zugeordnet werden und zeigen signifikante absolute STD-Effekte mit 7.9%, 6.5% und etwa 5%. Im Gegensatz zum Bindungsepitop von Peptid **18** bestätigt das Epitop hier nicht die vermutete stärkere Wechselwirkung von R441 im Vergleich zu K439. Dagegen ist in dem um sechs Aminosäuren erweiterten C-Terminus neben Y442 die stärkste Wechselwirkung zwischen H445 und ACE2 zu beobachten. Die Protonen H ϵ/ϵ' von K447, H δ/δ' von L448 sowie R449 zeigen absolute STD-Effekte von 6.9%, 4.5% und 7.5%. Die hier beobachteten STD-Effekte stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass das Peptid **19** (R441-G446, RYL RHG) im SPR-*screening* eine signifikant positive RU-Antwort zeigte (vgl. dazu Abschnitt 4.3.4, Abbildung 23).



	Y442 H β	H445 H β	Y438 H β/β' Y440 H β/β' Y442 H β' H445 H β'	Y438 H ϵ/ϵ' Y440 H δ/δ' Y442 H ϵ/ϵ'	Y438 H δ/δ' Y442 H δ/δ' H445 H δ/δ' H445 H ϵ/ϵ'	K439 H ϵ/ϵ' R441 H δ/δ' R444 H δ/δ' K447 H ϵ/ϵ' R449 H δ/δ'	L443 H δ/δ' L448 H δ/δ'
abs. STD%	28.7	27.5	20*	10.4	8.7 - 9.1	6.5 - 7.9	4.5 - 5.2
rel. STD%	100	96	70*	36	~ 30	~ 25	~ 20

Abbildung 29: STD NMR Bindungs epitop von Peptid **11** (Y438-R449, YKYRYLRH GKLR): Die farbigen Kreise zeigen die Bereiche der relativen STD% für die Protonen, die entsprechend ihrer Nähe zum Rezeptor ACE2 viel, wenig oder keine Sättigung erhalten. Der höchste Sättigungsgrad mit 28.7 STD% (absolut, vgl. Tabelle oben und Tabelle 20) konnte für die β -Protonen von Y442 beobachtet werden. Dieser Wert wurde als Referenz (100%) der gezeigten relativen STD% definiert. Der STD-Effekt der mit einem Stern (*) gekennzeichneten Protonen wurde aus einer hypothetischen Hüllkurve (vgl. Abbildung 30 (A)) abgeschätzt. Die STD-Effekte von nicht differenzierbaren Protonen wurden in Abbildung 30 (B) und (C) gesondert aufgeführt.

Aus den STD NMR-Spektren für Verbindung **11** konnten aufgrund von Signalüberlagerungen nicht alle Protonen und deren STD-Effekte differenziert werden. In Abbildung 30 (B) und (C) sind diese Resonanzen gesondert aufgeführt. Auffällig ist das Signal bei etwa 1.7 ppm, das mit 84 rel. STD% (Tabelle 20) den β -Protonen von K447 und oder R449 zugeordnet werden kann. Bei den aufgeführten Signalen kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit sich die beobachtete Sättigung auf die unterschiedlichen Protonen verteilt. Das Signal bei 1.6 ppm zeigt 68 rel. STD%, die sich auf die β - bzw. β' -Protonen von R444, K447 und R449 verteilen. Für die Resonanzen bei 1.5, 1.4 und 1.3 ppm konnte eine Sättigung von 40, 53 respektive 48 rel. STD% beobachtet werden, die sich jeweils jedoch auf 7-9 Protonen verteilen.

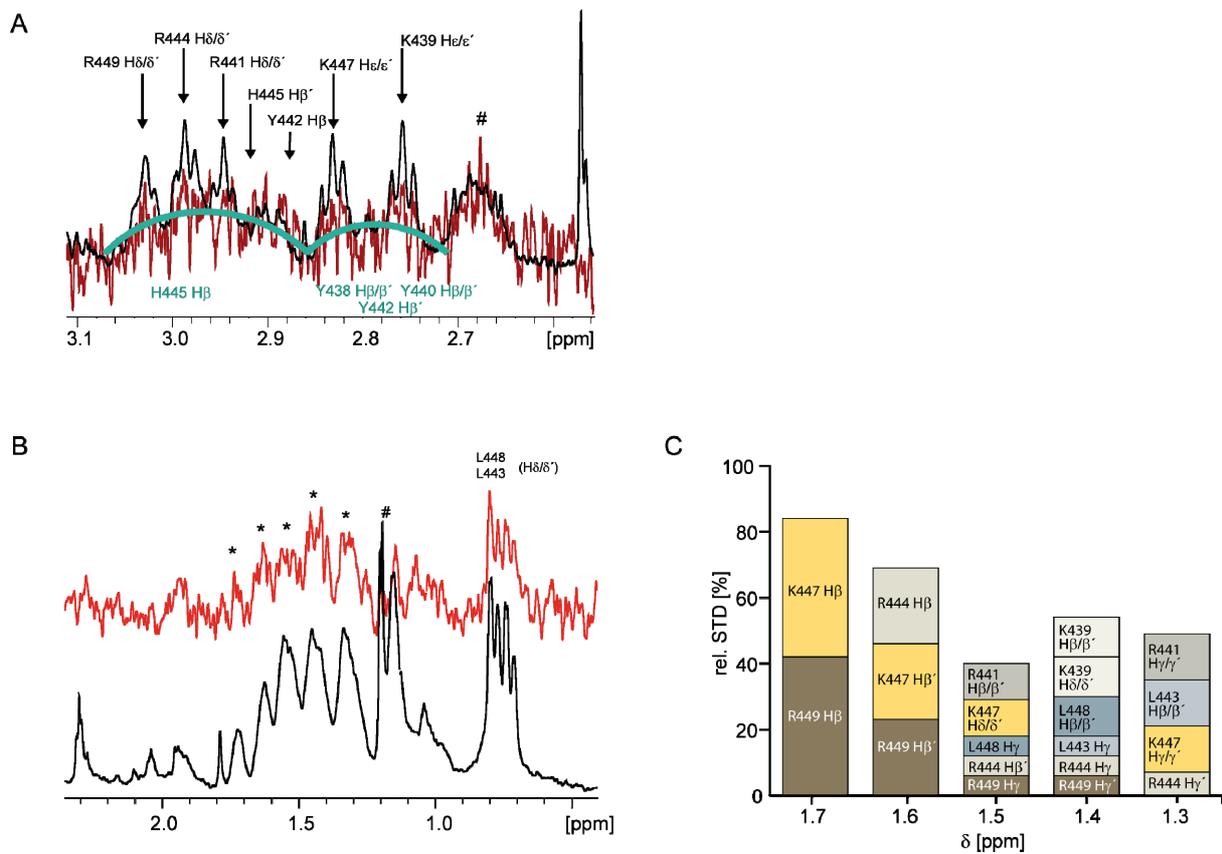


Abbildung 30: (A) Ausschnitt aus dem ^1H STD NMR-Spektrum (rot) und das entsprechende off-resonance Spektrum (schwarz). Die mit Pfeilen gekennzeichneten STD-Signale können den jeweiligen Protonen zugeordnet werden. Die Signale überdecken die Resonanzen der Protonen H445 H β , Y438 H β/β' , Y440 H β/β' sowie Y442 H β' , deren STD-Effekte anhand der Intensität der angezeigten Hüllkurve (grün) abgeschätzt wurden (# Proteinverunreinigung). (B) Signifikanter Sättigungstransfer im STD NMR-Spektrum (rot) der überlagerten NMR-Signale (*) bei etwa 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 und 1.7 ppm (off-resonance Spektrum in schwarz, # Verunreinigung). (C) Die Höhe der jeweiligen Säule entspricht dem relativen STD-Effekt in [%] bezogen auf Y442 H β der in (B) gezeigten überlagerten STD NMR-Signale (Tabelle 20). Die Unterteilung der Säulen entspricht dem Verhältnis der bei der jeweiligen chemischen Verschiebung δ überlagerten Protonenresonanzen. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern sich die beobachtete Sättigung auf die unterschiedlichen Protonen verteilt.

4.3.7 Synthese des Fusionspeptids **31**

Mit Hilfe der SPR-Bindungsstudien der Hexapeptidbibliothek **B2** konnte ein verfeinertes und minimales Bindungsepitop der RBD des SARS-CoV erhalten werden (Abbildung 24). Dabei wurden neben der Sequenz mit der höchsten Affinität zu ACE2 (Peptid **18**, Y438-L443) auch Hexapeptide mit einer geringeren Affinität identifiziert. So zeigte das Peptid **17** (N435-Y440, NYNYKY), welches in der Sequenz mit dem N-Terminus von **18** überlappt, eine signifikante SPR-Antwort. Ferner ergab die in der RBD-Sequenz weiter in Richtung C-Terminus liegende Verbindung **28** (I489-Y494, IGYQPY) eine schwache SPR-Antwort. Die aus der Röntgenkristallstrukturanalyse gewonnene dreidimensionale Struktur des Komplexes aus RBD und ACE2 ermöglicht es, die räumliche Lage der genannten Epitope zueinander und zum Rezeptor *in silico* zu analysieren. Dies sollte vor dem Hintergrund untersucht werden, die Epitope gegebenenfalls durch einen *linker* miteinander zu verknüpfen, um so einen Liganden mit einer potentiell größeren Affinität im Vergleich zu Peptid **18** zu erhalten. Es stellt sich heraus, dass die Epitope I489-Q492 (IGYQ) und N435-L443 (NYNYKYRYL) einerseits engen Kontakt zum Rezeptor zeigen andererseits der Abstand zwischen der Carboxylfunktion von Q492 und der Aminogruppe von N435 lediglich etwa 10 Å beträgt. Es sollte daher versucht werden, die beiden Sequenzen zunächst *in silico* durch einen *linker* von 3-4 Aminosäuren Länge miteinander zu verbinden, wobei die Torsionswinkel Φ und Ψ der neu geknüpften Bindungen gemäß des Ramachandran-Plots erlaubte Werte einnehmen sollten.¹¹⁰ Wie in Abbildung 31 gezeigt, stellte sich heraus, dass die Verknüpfung mit einem Glycin-Serin-Glycin-Serin-Linker realisiert werden kann, ohne dass die Lage der beiden Epitope eine nennenswerte Verschiebung im Vergleich zu der, wie sie in der Kristallstruktur zu beobachten ist, erfährt. Tabelle 5 gibt eine Übersicht der manuell am Computer eingestellten Torsionswinkel.

*Tabelle 5: Eingestellte Diederwinkel für den GSGS-Linker in Verbindung **31** mit Hilfe der Software Sybyl (Tripos).*

Aminosäure	Φ -Winkel in Grad	Ψ -Winkel in Grad
Q492	-95.5	15.1
Gly1	-84.2	66.0
Ser1	-75.0	167.4
Gly2	-59.4	106.1
Ser2	-73.6	60.0
N435	-94.4	54.6

Die Struktur IGYQSGSNYNYKYRYL wurde mit Hilfe des Programms Sybyl (Tripos) erstellt. Anschließend wurde damit in einer Energieminimierung geprüft, dass plausible Bindungslängen, relative Atomlagen, etc. eingehalten wurden und die Möglichkeit besteht, dass ein synthetisiertes Peptid diese Struktur und damit eine vergleichbare Lage zum Rezeptor einnehmen kann.

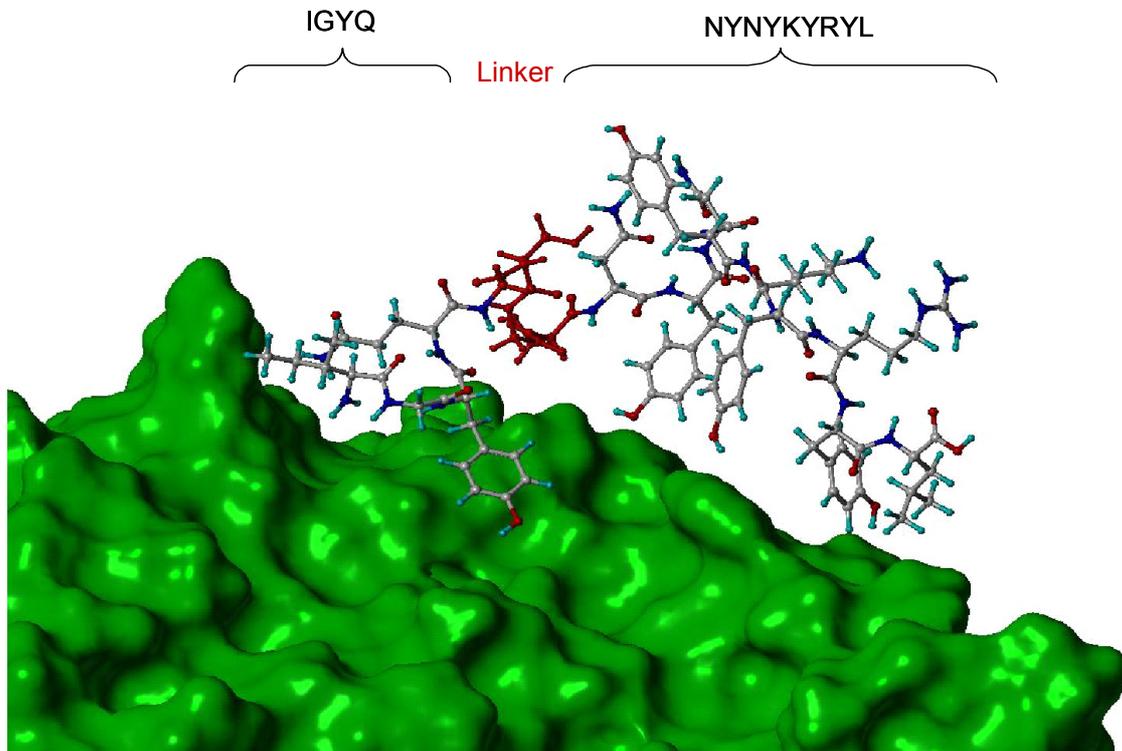


Abbildung 31: Die *in silico* Verknüpfung der RBD-Epitope I489-Q492 und N435-L443 durch einen GSGS-Linker (rot) zeigt das später synthetisierte Peptid **31** in Wechselwirkung mit dem Rezeptor ACE2 (grün). Die Epitope behalten die räumliche Lage bei, die sie, eingebettet in die gesamte Rezeptorbindungsdomäne, in der Kristallstruktur einnehmen.

Nach der computersimulierten Verknüpfung der Epitope wurde die Struktur mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese entsprechend der in 7.4.3, AAV 6 und 7.4.5 beschriebenen Durchführungen hergestellt, gereinigt und identifiziert. Das Peptid sollte anschließend auf eine Affinität gegenüber dem Rezeptor ACE2 mit Hilfe von SPR untersucht und ein Bindungsepitop mit Hilfe von STD NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Dieses ist interessant, da es im Gegensatz zu dem Bindungsepitop von Peptid **11** (YKYRYLRHGKLR, Abbildung 29) Aussagen über die Wechselwirkungen der Aminosäuren jenseits des N-Terminus der Leitstruktur **18** (YKYRYL) ermöglicht.

4.3.8 SPR-Bindungsstudien des Fusionspeptids **31**

Die SPR-Affinitätsmessungen des Fusionspeptids wurden an einem Biacore T100 Gerät entsprechend der in 7.5.2 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Die konzentrationsabhängige Aufnahme der Sensorgramme erfolgte bei einer Immobilisierung von 110 fmol ACE2 (vgl. 7.5.1), was bei einer Molmasse des Liganden von 2048 g/mol einem theoretisch maximal zu erwartenden RU-Signal ($RU_{\text{theor.}}$) von 225 RU entspricht. Die Ergebnisse der SPR-Experimente sind in Abbildung 32 (A) und (B) thermodynamisch und kinetisch analysiert.

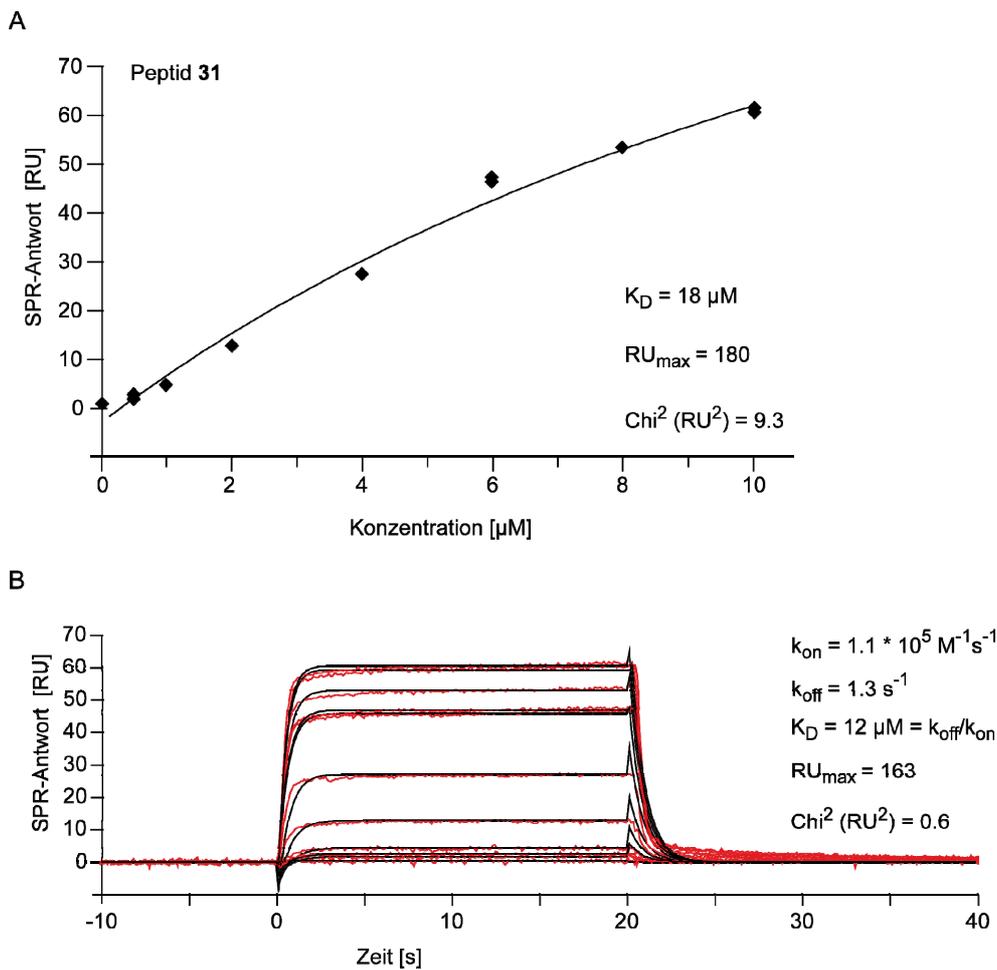


Abbildung 32: **A** Thermodynamische und **B** kinetische Analyse der SPR – Wechselwirkung zwischen Peptid **31** und ACE2 mit Hilfe der Software BIAevaluation T100 (Biacore).

Die Anpassung der bei einer unterschiedlichen Ligandkonzentration erhaltenen RU-Antworten (abgelesen im *steady state* Bereich des Sensorgramms) an das *one-site-binding* Modell ergibt eine spezifische Bindungskurve, die gegen einen Sättigungswert RU_{max} von 180 RU strebt. Dieser Wert ist angesichts von $RU_{\text{theor.}}$ vernünftig (Abbildung 32 A). Aus dem *fit*

ergibt sich ferner eine Dissoziationskonstante von 18 μM , die auf eine geringfügig stärkere Wechselwirkung des Fusionspeptids **31** im Vergleich zu der Leitstruktur **18** mit $K_D = 46 \mu\text{M}$ hindeutet. Die in Abbildung 32 (**B**) gezeigte kinetische Analyse bestätigt diesen Trend, die für die Sensorgramme bei Ligandkonzentrationen zwischen 0.005-10 μM durchgeführt wurde. Die darüber gemittelte Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} beträgt $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (für Peptid **18** $3.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), die der Dissoziation ergibt einen Wert für k_{off} von 1.3 s^{-1} (für Peptid **18**, 0.17 s^{-1}). Daraus ergibt sich eine Dissoziationskonstante $K_D = k_{off}/k_{on}$ von 12 μM . Sowohl dieser Wert als auch der extrapolierte RU_{max} – Wert von 163 RU stimmen mit den Daten, die aus der thermodynamischen Analyse erhalten wurden, sehr gut überein.

Die im SPR-Experiment beobachtete Affinität des Fusionspeptids **31** zu dem Rezeptor ACE2 unterstützt das Konzept von der Verknüpfung der zwei Bindungsepitope I489-Q492 (IGYQ) und N435-L443 (NYNYKYRYL). Eine leichte Verbesserung der Dissoziationskonstante sowie eine um den Faktor 100 größere Assoziationsrate lassen vermuten, dass beide RBD-Epitope im Peptid **31** mit dem Rezeptormolekül wechselwirken. Ferner scheint in diesem Molekül mit einer mehr als doppelt so großen Molmasse die aktive Konformation in Lösung weiter ausgeprägt zu sein als in dem Hexapeptid **18** mit der Sequenz YKYRYL. Die erwünschte signifikante Erniedrigung der Dissoziationskonstante konnte durch diese Verbindung jedoch nicht realisiert werden. Um für ein zukünftiges Design einer veränderten Leitstruktur der Sequenz YKYRYL auch Aussagen über die Wechselwirkungen der Aminosäuren jenseits des N-Terminus treffen zu können, wurde ein Bindungsepitop des Liganden mit Hilfe der STD NMR-Spektroskopie ermittelt.

4.3.9 STD NMR Bindungsepitop des Fusionspeptids **31**

Entsprechend den STD-Experimenten mit Peptid **11** und **18** wurde das Rezeptor-Ligand System bestehend aus ACE2 und Peptid **31** in einem deuterierten Puffersystem hergestellt (Durchführung 7.6.2.). Die Proteinkonzentration in der NMR-Probe betrug bei einer angenommenen quantitativen Umpufferung 0.8 μM . Die Peptidkonzentration wurde auf 20 μM eingestellt, was einem 25fachen Ligandüberschuss entspricht. Die STD NMR-Spektren wurden bei 295 K auf einem 700 MHz NMR-Spektrometer mit Cryoprobekopf und insgesamt 3k *scans* aufgenommen. In den ^1H STD NMR-Spektren (Abbildung 33) ist eindeutig zu sehen, dass Sättigung vom Rezeptormolekül ACE2 auf den Liganden übertragen wurde. Die Spektren der Negativkontrolle, die nur Ligand in *d*-TBS enthielt, wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen und enthielten keine STD-Artefakte.

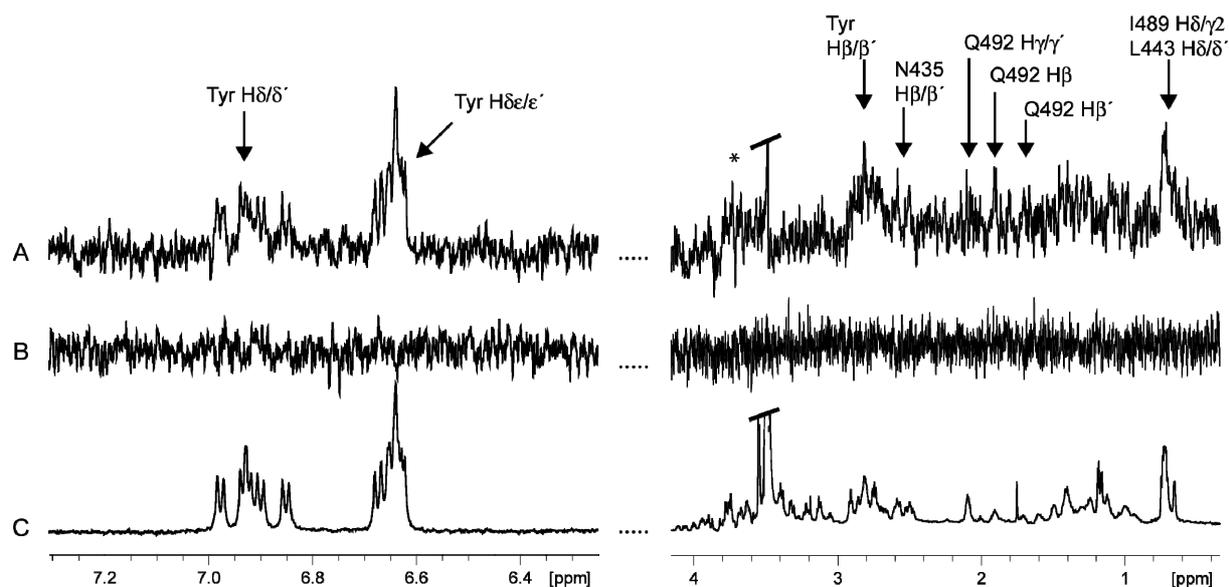
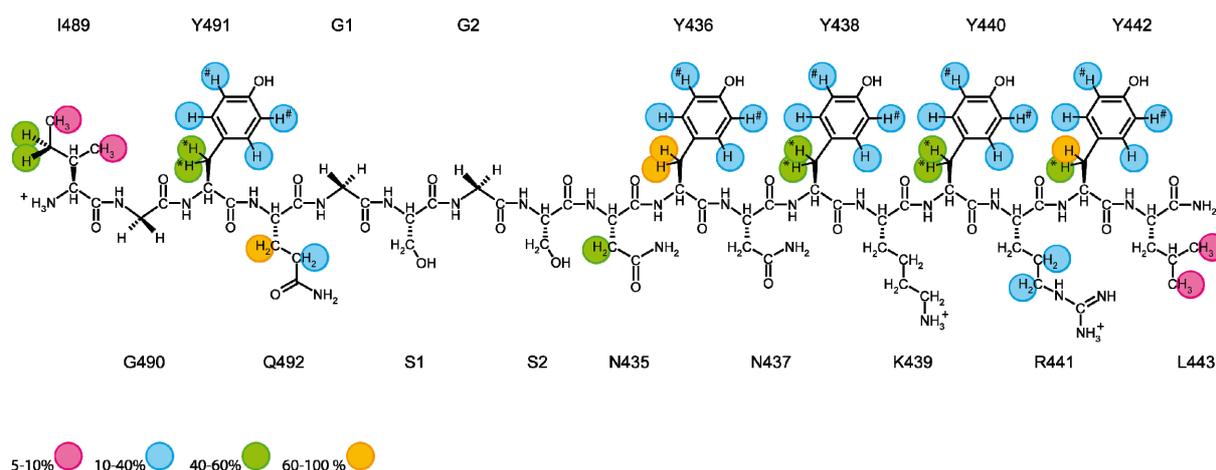


Abbildung 33: Jeweils zwei Ausschnitte aus dem ^1H STD NMR-Spektrum (A) des Fusionspeptids **31**, der Negativkontrolle von nur Ligand (B) und das entsprechende off-resonance Spektrum (C). Die mit (*) gekennzeichneten Signale zwischen 3.6 und 3.8 ppm können nicht eindeutig dem Peptid zugeordnet werden.

Das aus den Spektren gewonnene signifikante Bindungsepitop in Abbildung 34 zeigt, dass beide miteinander verknüpften Epitope Kontakt zu dem Rezeptor haben. Den höchsten Sättigungstransfer erfahren die β -Protonen von Q492, gefolgt von den β -Protonen der Tyrosine 436 und 442. Darüber hinaus lässt ein signifikanter STD-Effekt für die β -Protonen von N435 vermuten, dass die Aminosäuren N435 und Y436 in der Sequenz jenseits des N-Terminus der Leitstruktur YKYRYL einen nennenswerten Beitrag zur Affinität dieses Peptids beitragen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der SPR-Untersuchungen der Hexapeptidbibliothek **B2**, in der auch die Verbindung **17** (N435-Y440; NYNYKY) eine eindeutige Wechselwirkung zum Rezeptor zeigte. Wie auch für die Peptide **11** und **18** ist eine deutliche Wechselwirkung aller aromatischen Ringsysteme mit dem Rezeptor ACE2 zu beobachten. Ferner scheint der C-Terminus des Fusionspeptids über die Protonen γ_{12} und γ_{13} von I489 in direktem Kontakt mit dem Protein zu stehen. Die im STD-Spektrum zwischen 3.6 und 3.8 ppm erkennbaren Signalintensitäten können nicht eindeutig dem Peptid zugeordnet werden. Ein signifikanter STD-Effekt für die Protonen des Linkers konnte daher nicht festgestellt werden.



	Q492 H β / β'	Y436 H β / β' Y442 H β	I489 H γ / γ' N435 H β / β' Y440 H β'	Y491 H β / β' Y438 H β / β' Y442 H β'	Y491 H ϵ / ϵ' Y436 H ϵ / ϵ' Y440 H ϵ / ϵ' Y442 H ϵ / ϵ'	Y491 H δ / δ' Y436 H δ / δ' Y438 H δ / δ' Y440 H δ / δ' Y442 H δ / δ'	Q492 H γ / γ' R441 H γ / γ' R441 H δ / δ'	I489 H γ_2 H δ L443 H δ / δ'
abs. STD%	19.0	12.0	9.7 - 10.2	9.0*	6.6#	4.7 - 5.9	3.5 - 3.8	1.7 - 1.9
rel. STD%	100	63	~ 50	47*	35#	~ 30	~ 20	~ 10

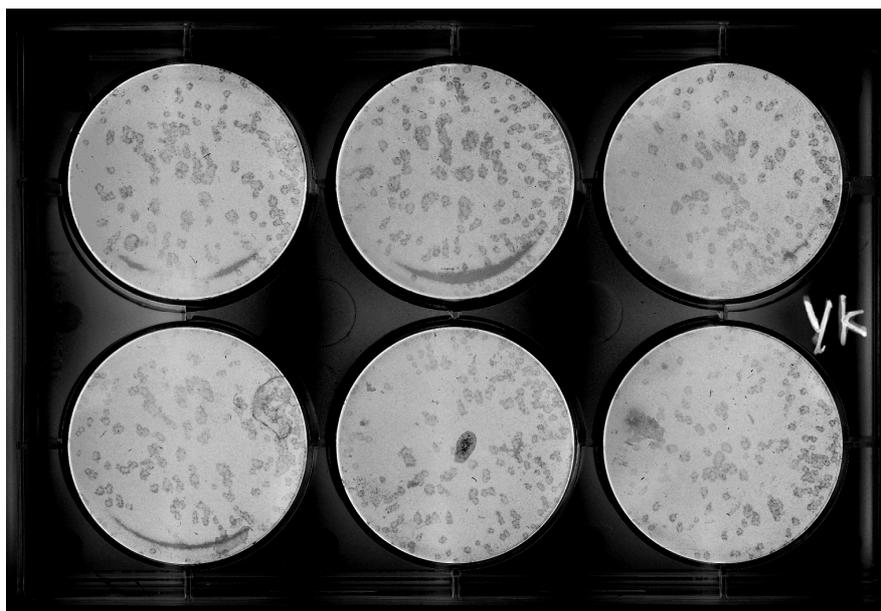
Abbildung 34: STD NMR Bindungsepitop von Peptid **31** (IY438-R449, YKYRYLRHGHGKLR): Die farbigen Kreise zeigen die Bereiche der relativen STD% für die Protonen, die entsprechend ihrer Nähe zum Rezeptor ACE2 viel, wenig oder keine Sättigung erhalten. Der höchste Sättigungsgrad mit 19.0 STD% (absolut, vgl. Tabelle oben und Tabelle 22) konnte für die β -Protonen von Q492 beobachtet werden. Dieser Wert wurde als Referenz (100%) der gezeigten relativen STD% definiert. Der STD-Effekt der mit einem Stern (*) gekennzeichneten Protonen wurde aus der Hüllkurve im Bereich zwischen 2.6 – 3.0 ppm (Abbildung 33) ermittelt, die mit (#) markierten Resonanzen können nicht differenziert zugeordnet werden.

4.4 SARS-CoV Inhibitionsassay mit Peptid 18 (YKYRYL)

4.4.1 Plaque-Assay

Das Peptid **18** (YKYRYL, Y438-L443) aus der RBD des SARS-CoV sollte als mögliche Leitstruktur für das Design eines *entry*-Inhibitors auf seine biologische Aktivität getestet werden. Dazu wurde in der Arbeitsgruppe von C. Drosten am Bernhard-Nocht-Institut zunächst ein so genannter Plaque-Assay durchgeführt. Für diesen Test wurden VeroE6-Zellen, die den Rezeptor ACE2 exprimieren und eine geeignete Wirtszelle für das SARS-CoV darstellen, ausgesät und mit dem Virus infiziert (5×10^6 PFU/ml). Vor und während der Zugabe der infektiösen Lösung wurden die Zellen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen der Peptidlösung (0 bis 7 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

gewaschen, mit Nähr- und Methylcellulose-Medium überschichtet und bei 37 °C für mehrere Tage stehen gelassen. Sollte das Virus eine Zelle infizieren, kann es sich in dieser Zeit replizieren und weitere Nachbarzellen infizieren. Es entstehen Infektionsherde, welche als Löcher (Plaques) im Zellrasen erscheinen oder mittels Immunfärbung als Immunfoci dargestellt werden können und makroskopisch auszählbar sind. In Abbildung 35 ist das Ergebnis des Plaque-Assays abgebildet.



*Abbildung 35: SARS-CoV Plaque-Inhibitionsassay mit dem Peptid **18** (Y439-L443, YKYRYL): In den wells wurden, von links oben nach rechts unten, folgende zunehmenden Peptidkonzentrationen in der Inkubationslösung eingestellt: 0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 3 mM und 7 mM. Die Plaques erscheinen als farblose Flecken auf violetterem Hintergrund, jedoch ist hier aus Sichtbarkeitsgründen ein mit der Software Adobe Photoshop erzeugtes Negativbild dargestellt.*

Wie anhand der Anzahl der Plaques leicht abzuschätzen ist, konnte in diesem Versuch keine signifikante inhibitorische Wirkung des Peptids **18** nachgewiesen werden. In allen sechs wells erscheinen im Rahmen der Genauigkeit dieses Tests gleich viele Plaques, was bedeutet, dass durch die Behandlung der Zellen mit dem Peptid nicht verhindert werden konnte, dass das Virus in die Wirtszellen eindringt, sich repliziert und weitere Zellen infiziert.

4.4.2 *real-time* RT-PCR Reduktionsassay

Zusätzlich zu dem Plaque-Assay wurde in der gleichen Arbeitsgruppe ein weiterer biologischer Inhibitionstest mit Verbindung **18** durchgeführt. In diesem *real-time* RT-PCR

Reduktionsassay wird mit Hilfe des biochemischen Verfahrens der Reversen-Transkriptase (RT)-Polymerasekettenreaktion (PCR) (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) die Menge viraler RNA direkt aus dem Überstand einer infizierten Zellkultur bestimmt. Die Quantifizierung der RNA lässt sich mit dem Virustiter korrelieren und gibt darüber Auskunft, wie stark sich das Virus in einer bestimmten Zeit vermehrt hat.^{104;105} Die Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit aus und bietet im Gegensatz zu dem Plaque-Assay den Vorteil, dass das Peptid während des gesamten Lebenszyklus des Virus in der Zellkultur anwesend sein kann. In Abbildung 36 ist die gemessene Anzahl RNA in Kopien/ml als Funktion der Inkubationszeit mit Virus für verschiedene Peptidkonzentrationen (0 bis 7 mM) aufgetragen.

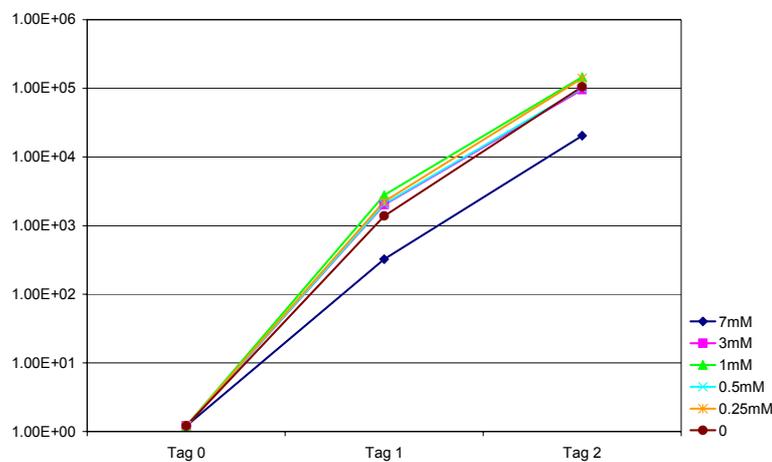


Abbildung 36: SARS-CoV real-time RT-PCR Reduktionsassay mit dem Peptid **18** (Y439-L443, YKYRYL): Dabei ist die Anzahl der RNA [Kopien/ml] als Funktion der Inkubationszeit mit dem Virus aufgetragen. Bei einer Peptidkonzentration von 7 mM ist eine signifikante Reduzierung der viralen RNA um den Faktor 10 zu beobachten (Tag1 und Tag2).

Im Gegensatz zu dem Plaque-Assay ist in diesem Biotest eine signifikante Reduzierung der Virusreplikation bei einer Peptidkonzentration von 7 mM zu beobachten. Nach 1 bzw. 2 Tagen Inkubationszeit konnte die Anzahl der RNA-Kopien um den Faktor 10 verringert werden. Vor dem Hintergrund eines deutlich sensitiveren RT-PCR-Assays, im Vergleich zu dem Plaque-Inhibitionstest, beruht die beobachtete Reduktion vermutlich nicht auf einer experimentellen Schwankung. Darüber hinaus konnte kein zytotoxischer Effekt des Peptids festgestellt werden. Im Rahmen der Diplomarbeit von Anna-Winona Struck, Universität Hamburg, wurden zur Bestätigung der hier gemessenen inhibitorischen Wirkung des Peptids **18** (YKYRYL) der Assay wiederholt und dabei Peptidkonzentrationen von 7, 10.5 und

14 mM eingestellt. Die Ergebnisse dieses zweiten Tests sind in Abbildung 37 graphisch dargestellt.

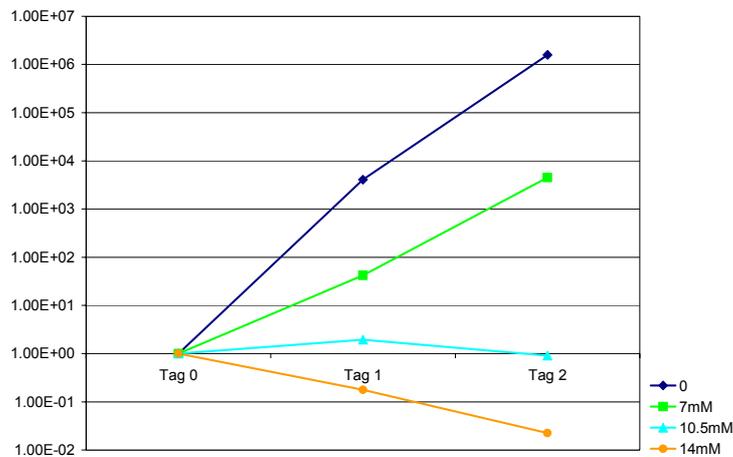


Abbildung 37: Wiederholung des SARS-CoV real-time RT-PCR Reduktionsassays mit dem Peptid **18** (Y439-L443, YKYRYL): Die Auftragung der RNA in Kopien/ml, als Funktion der Inkubationstage, zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion der Virusreplikation. Bei einer Peptidkonzentration von 10.5 mM konnte die Virusvermehrung vollständig unterdrückt werden. Bei einer Konzentration von 14 mM wurde sogar ein Absterben des Virus beobachtet.

Die im ersten Test gezeigte inhibitorische Wirkung des Peptids **18** wird in dem zweiten RT-PCR-Reduktionsassay eindeutig bestätigt. In diesem Fall wird bei einer Peptidkonzentration von 7 mM eine Reduktion der viralen RNA um den Faktor 100 erreicht. Darüber hinaus zeigen die Daten eine konzentrationsabhängige Verminderung der Virusreplikation, die bei einer Peptidkonzentration von etwa 10 mM zu einer vollständigen Unterdrückung der Virusvermehrung führt (Reduktion um 6 log₁₀ Stufen). Darüber hinaus kann bei einer noch höheren Peptidkonzentration von 14 mM ein Rückgang der RNA-Kopien im Vergleich zu Testbeginn verzeichnet wird. Scheinbar wird von der ursprünglich dazugegebenen Viruslast ein erheblicher Anteil abgebaut. Ein signifikanter zytotoxischer Effekt konnte auch bei diesen hohen Peptidkonzentrationen nicht festgestellt werden.

In den beiden RT-PCR-Assays wurde die inhibitorische Wirkung des RBD-Peptids **18** (Y438-L443, YKYRYL) eindeutig gezeigt. In Anbetracht der in den SPR-Studien ermittelten Dissoziationskonstanten von 46 µM (Abbildung 25), wird bei einer Peptidkonzentration von etwa 5 mM eine fast vollständige Belegung der Bindungsregion von ACE2, und damit verbunden, eine signifikante Inhibition der Virusreplikation erwartet. Jedoch liegt in den Reduktionsassays der Konzentrationsbereich, für den eine biologische Aktivität festzustellen

ist, mit 7-14 mM deutlich höher. Eine vernünftige Erklärung dafür ist die geringe Stabilität des Peptids gegenüber Proteasen. Da es sich bei Verbindung **18** um ein Peptid handelt, bei dem natürlich vorkommende Aminosäuren durch Peptidbindungen verknüpft vorliegen, ist die Struktur gegenüber einem Abbau durch Proteasen, die zahlreich in biologischen Zellsystemen vorliegen, nicht geschützt. Vermutlich wird eine große Menge des zugegebenen Peptids auf diese Weise inaktiviert. Dies könnte ebenso der Grund dafür sein, dass in dem in 4.4.1 beschriebenen Plaque-Assay kein Effekt zu beobachten ist. In dem, im Vergleich zu dem RT-PCR-Assay, deutlich weniger sensitiven Test wurde mit einer maximalen Konzentration von 7 mM gearbeitet, bei vermutlich ähnlicher Menge an vorhandenen Proteasen. Die peptidhaltige Lösung wurde darüber hinaus, nach Inkubation der Zellen mit dem Virus, bedingt durch die Durchführung, von dem Zellrasen gewaschen. Dieser wurde während der Virusreplikation mit einem Methylcellulose-Medium überschichtet, um zu gewährleisten, dass sich neu gebildete Viren nicht frei im Zellüberstand bewegen können. Um quantifizierbare Plaques zu erhalten, ist es notwendig, dass lediglich die Nachbarzellen der Wirtszellen infiziert werden. Zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung anhand des Plaque-Assays wäre eine Wiederholung des Tests mit deutlich höheren Peptidkonzentrationen nötig. Gleichzeitig könnte versucht werden, eine entsprechende Peptidkonzentration im Methylcellulose-Medium einzustellen und damit zu gewährleisten, dass das Peptid während des Viruseintritts anwesend ist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis dafür, dass das Peptid **18** (YKYRYL) um die virale Bindungsstelle auf dem Rezeptor ACE2 konkurriert und somit in der Tat als *entry*-Inhibitor wirkt.

4.5 SPR-Bindungsstudien von Peptidanaloga der Leitstruktur Y438-L443

4.5.1 Synthese der Peptidbibliothek **B3**

Wie aus dem STD-Bindungsepitop der Leitstruktur **18** (Abbildung 27) zu vermuten ist, trägt die Aminosäure R441 zur Bindung des Liganden an den Rezeptor bei. Ferner zeigt der aus der Röntgenkristallstrukturanalyse erhaltene Komplex aus RBD und ACE2 direkte Wechselwirkung der Tyrosine Y440 und Y442 mit dem Rezeptor. Zusätzlich wird in den in dieser Arbeit durchgeführten STD NMR-Bindungsstudien ein signifikanter Kontakt zwischen Y438 und ACE2 beobachtet (Abbildung 27). Das Peptid **18** bewirkt in den durchgeführten *real-time* RT-PCR Reduktionsassays bei einer Konzentration von etwa 10 mM eine vollständige Reduktion der Virusproliferation. Bei einer Erhöhung der Proteolysestabilität des

Peptids kann die aktive Konzentration vermutlich deutlich verringert werden. Vor diesem Hintergrund und um den Einfluss der oben erwähnten Aminosäuren R441, Y438, Y440 und Y442 zu untersuchen, wurde die in Tabelle 6 aufgeführte Peptidbibliothek **B3** entworfen.

Tabelle 6: Bibliothek **B3** mit den Aminosäuresequenzen der synthetisierten Peptidanaloga des RBD Peptidfragments Y438-L443 sowie die entsprechenden mit MALDI-TOF-MS identifizierten Masse-zu-Ladungs Quotienten ($M+H$)⁺ [m/z].

Peptid	Sequenz	Molmasse [g/mol]	MALDI-TOF [$M+H$] ⁺
32	FKFRFL	855.5	856.5
33	WKWRWL	972.5	973.4
34	F_fKF_fRF_fL	909.5	910.4
35	YKY Cit YL	904.5	905.6
36	Bpa KYR Cha L	981.6	982.7
37	W KYR Cha L	916.6	917.8
38	Bpa K Cha R Cha L	971.6	972.6
39	W K Cha R Cha L	906.6	907.5
40	Bpa K Cha RYL	981.6	982.4
41	W K Cha RYL	916.6	917.4

Darin sind zehn Hexapeptidanaloga enthalten, in denen die Tyrosine durch aliphatische und aromatische natürliche sowie nicht natürliche Aminosäuren ersetzt wurden (Peptide **32-34** und **36-41**). In Verbindung **35** wurde R441 durch die unnatürliche Aminosäure Citrullin substituiert. Die Peptide konnten erfolgreich entsprechend der Durchführungen in 7.4.1-7.4.5 synthetisiert, gereinigt und identifiziert werden. Die Peptidanaloga sollten anschließend mit Hilfe der SPR-Sensorchiptechnologie auf eine Affinität gegenüber ACE2 untersucht werden.

4.5.2 SPR-Bindungsstudien der Peptidanaloga aus der Bibliothek **B3**

Die folgenden SPR-Experimente wurden auf einem Biacore T100 bei Immobilisierungen des SPR-Chips von 78 und 110 fmol Rezeptor wie in 7.5.1 und 7.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Menge Rezeptor entspricht bei einer angenommenen Molmasse der Liganden von etwa 900 g/mol einem theoretisch maximal zu erwartenden RU-Signal von 70 respektive 100 RU. Bei einem zunächst durchgeführten *screening* der Liganden ($c = 250 \mu\text{M}$) zeigten alle Peptide der Bibliothek **B3** mit Ausnahme der Verbindung **35** (YKYCitYL) eine eindeutige SPR-Antwort. Die Verbindung **18** (YKYRYL) wurde als Positivkontrolle ebenfalls erneut

vermessen. Es wurden anschließend konzentrationsabhängige Affinitätsuntersuchungen der Liganden durchgeführt.

Die Sensorgramme des Peptids **32** (FKFRFL), in dem die Tyrosine durch Phenylalanine ersetzt wurden, zeigen ein ungewöhnlich schnelles Assoziations- und Dissoziationsverhalten (Abbildung 38 **oben**).

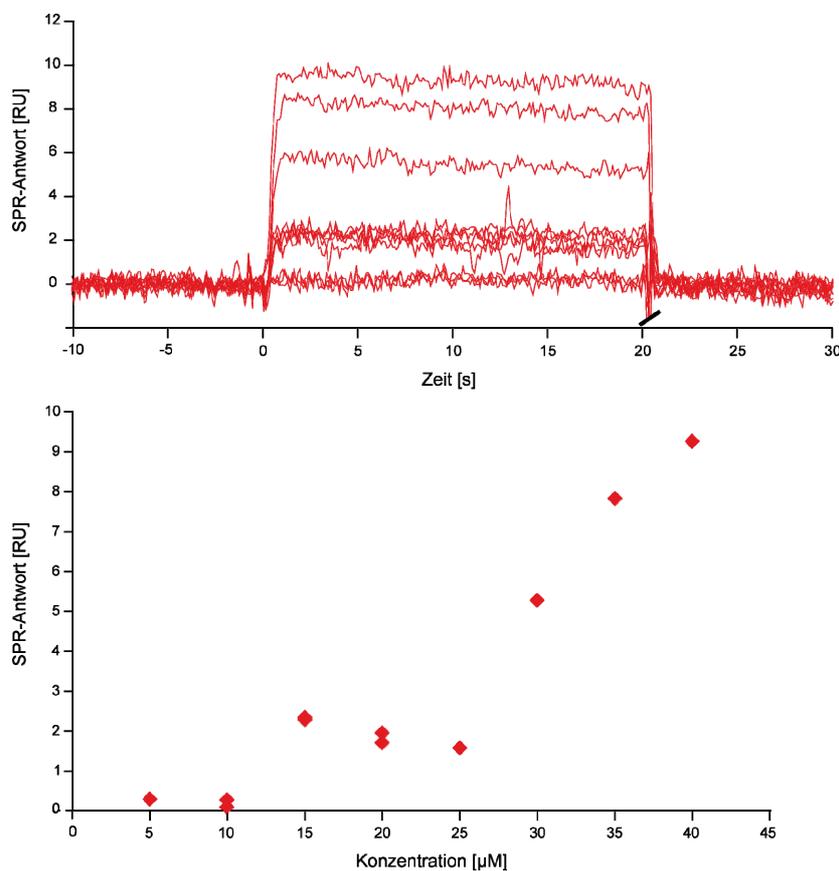


Abbildung 38: **oben** Sensorgramme der Verbindung **32** und **unten** RU-Antworten als Funktion der Konzentration, bei einer Immobilisierung von 78 fmol ACE2.

Allerdings wurde für das Peptid **32** bei einer Konzentration von 40 µM mit etwa 10 RU eine dreifach geringere RU-Antwort als für die Leitstruktur **18** unter gleichen Bedingungen (30 RU) beobachtet. Abbildung 38 unten zeigt die Auftragung der RU-Antworten als Funktion der Ligandkonzentration. Eine Anpassung der Datenpunkte an das *one-site-binding* Modell liefert keinen vernünftigen *fit* und eine spezifische Wechselwirkung kann in diesem Experiment nicht eindeutig beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Hydroxylfunktion wenigstens von einem der drei Tyrosine direkt an der Wechselwirkung mit dem Rezeptor beteiligt ist. Darüber hinaus könnte das Fehlen der funktionellen Gruppen einen erheblichen Einfluss auf die aktive Konformation des Peptides haben und sich hinsichtlich der Bindungsaffinität ungünstig auswirken.

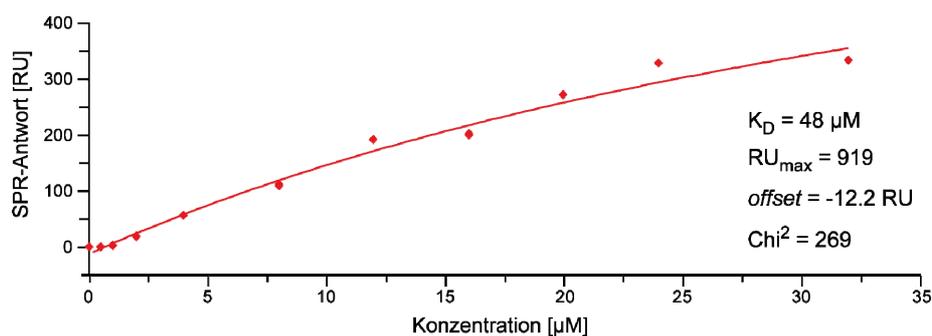


Abbildung 39: Anpassung der RU-Antworten (bei 110 fmol ACE2) des Peptids **33** (WKWRWL) an das one-site-binding Modell mit Hilfe der Software Biacore T100 Evaluation.

In Abbildung 39 ist das konzentrationsabhängige Bindungsverhalten des Peptids **33** gezeigt, in dem sämtliche Tyrosine durch die natürlich vorkommende Aminosäure Tryptophan ersetzt wurden. Die Verbindung zeigt im Vergleich zu der Leitstruktur **18** (YKYRYL) eine deutlich höhere SPR-Antwort von 300 RU zu 50 RU bei einer Konzentration von 32 μM . Der *fit* errechnet eine Dissoziationskonstante von 48 μM bei einem Wert für $R_{U_{\max}}$ von 919 RU. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die vorgenommenen Substitutionen zwar ein vergleichbarer K_D -Wert erhalten wird (vgl. **18** $K_D = 46 \mu\text{M}$), die Wechselwirkung jedoch vermutlich erhebliche unspezifische Anteile hat. Ein durch derartige Interaktion beeinflusstes Bindungsverhalten zeigte auch die Verbindung **34**, in der die Tyrosine durch 4-Fluorphenylalanin substituiert wurden. Hier konnten allerdings etwa gleich hohe SPR-Antworten wie für Peptid **18** erhalten werden, die sich jedoch nicht an das *one-site-binding* Modell anpassen ließen, sondern einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und SPR-Antwort lieferten (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 40 sind die beobachteten SPR-Antworten der Verbindung **35** (YKYCitYL) als Funktion der jeweilig untersuchten Ligandkonzentration aufgetragen. Der Austausch von R441 durch die nicht natürlich vorkommende Aminosäure Citrullin führt zu einem vollständigen Verlust der Bindungsaffinität. Zum einen sind die beobachteten SPR-Antworten von im Mittel 2 RU insignifikant gering zum anderen streuen die Datenpunkte scheinbar willkürlich über den Konzentrationsbereich.

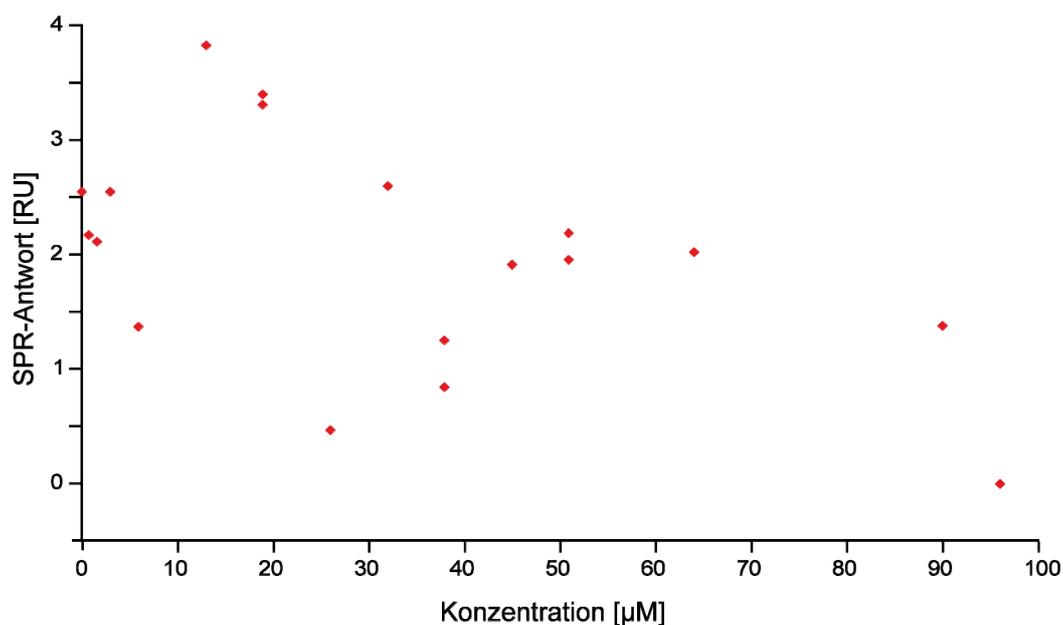


Abbildung 40: Die Substitution von R441 durch Citrullin führt in der Verbindung **35** (YKYCitYL) zu einem Verlust der Bindungsaffinität gegenüber ACE2.

In Abbildung 41 sind die SPR-Sensorgramme der Peptide **36-41** bei einer Immobilisierung von 110 fmol ACE2 und Ligandkonzentrationen zwischen 0.005 und 32 µM gezeigt. Die größte SPR-Antwort mit etwa 700 RU (bei $c = 32$ µM) zeigte Peptid **35** (BpaKChaRChaL), in dem all drei Tyrosine ersetzt wurden. Aufgrund des hohen RU-Wertes ist davon auszugehen, dass die beobachtete Wechselwirkung erheblich von unspezifischer Wechselwirkung geprägt ist. Verbindung **37** (WKYRChaL) zeigt unter den gleichen Bedingungen dagegen die geringste Antwort mit etwa 25 RU. Für das Referenzpeptid **18** (YKYRYL) wurde unter diesen Bedingungen eine SPR-Antwort von etwa 50 RU erhalten (Sensorgramme nicht gezeigt).

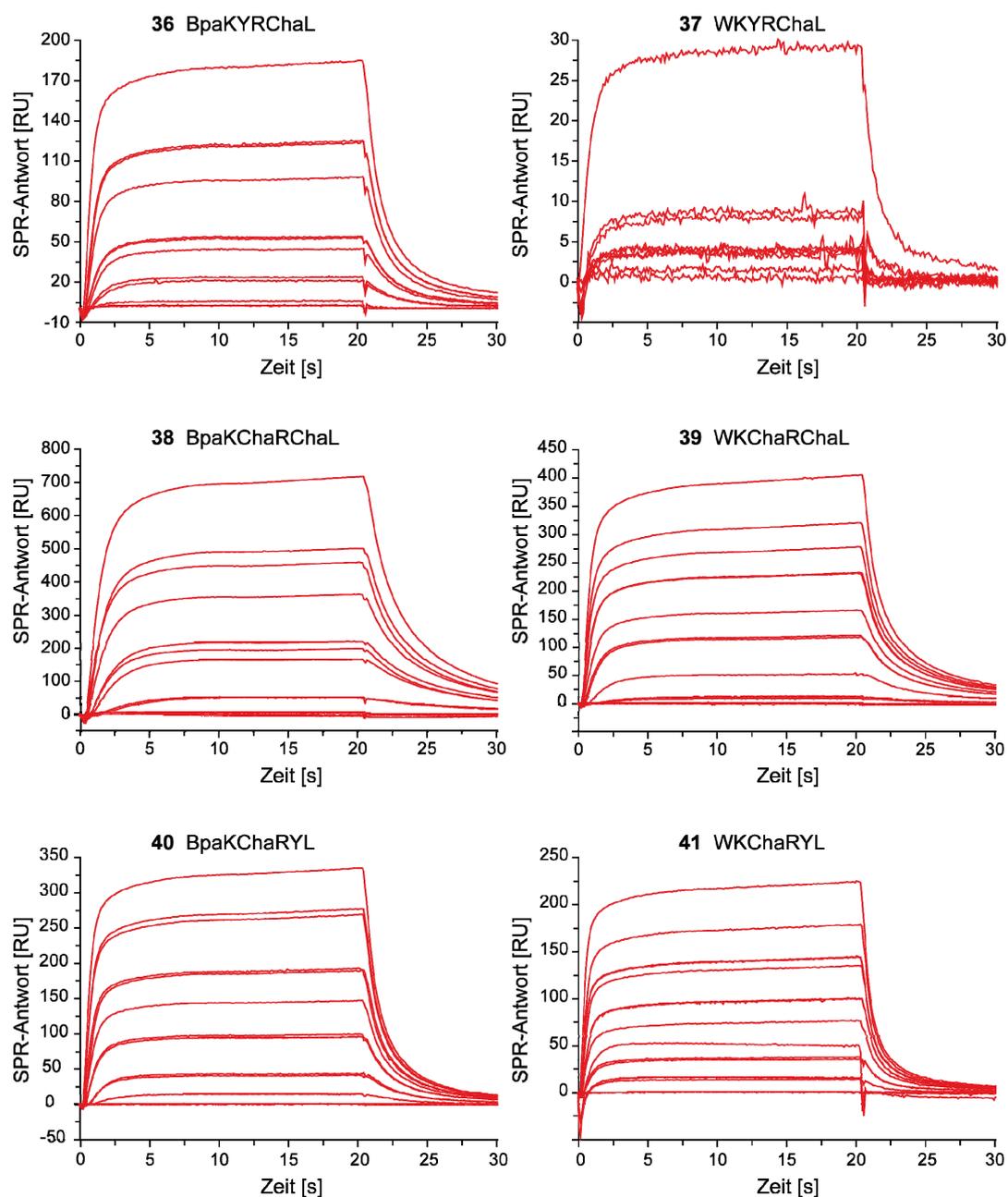


Abbildung 41: SPR-Sensorgramme der Peptide **36-41** bei einer Immobilisierung von 110 fmol ACE2 und Ligandkonzentrationen zwischen 0.005 und 32 μ M.

Für eine quantitative Beschreibung des Bindungsverhaltens der Peptide **36-41** wurde eine thermodynamische und kinetische Analyse der Sensorgramme durchgeführt. Exemplarisch sind die Analysen der Verbindungen **37** und **41** in Abbildung 42 und Abbildung 43 dargestellt.

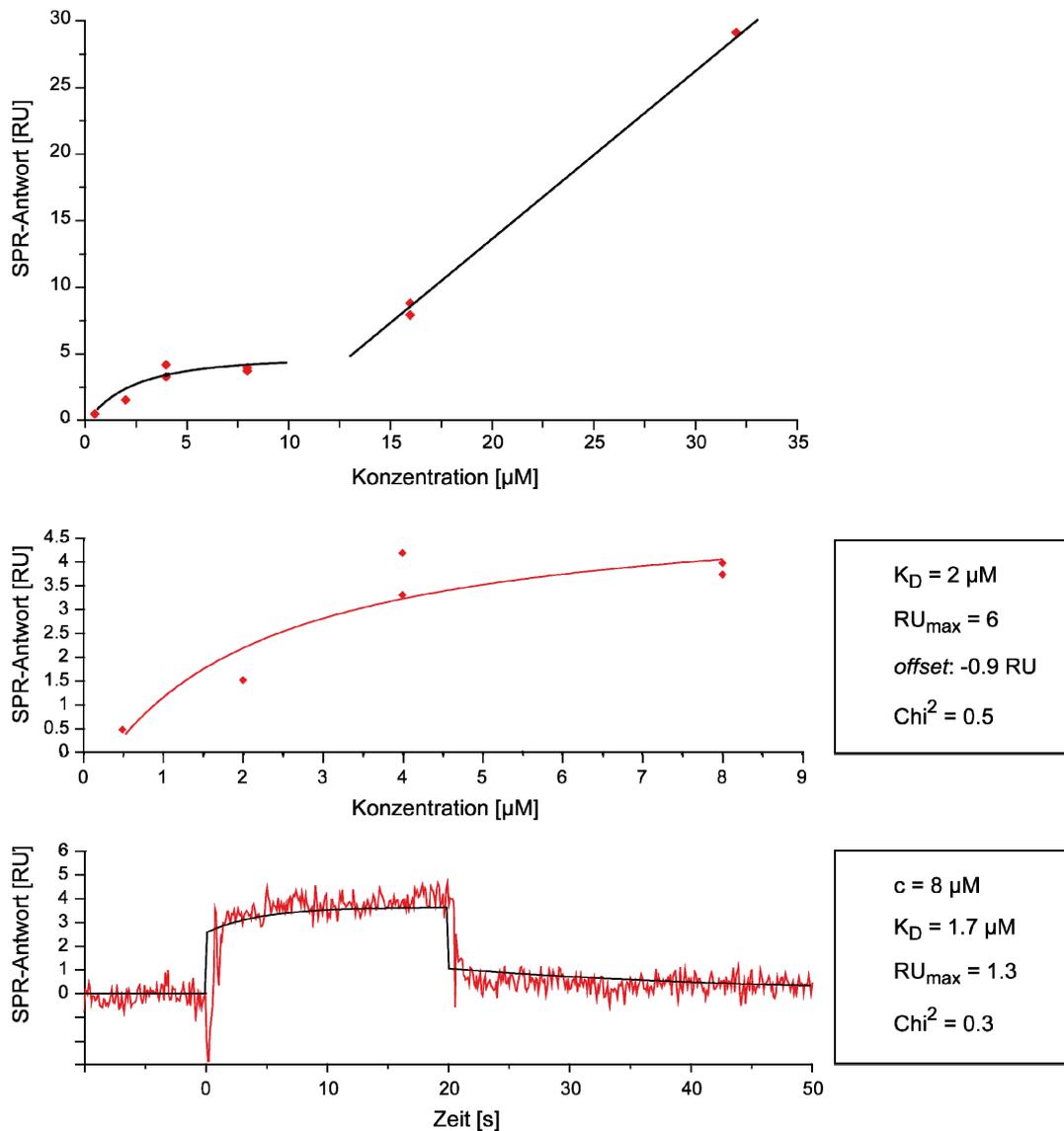


Abbildung 42: SPR-Analyse von Peptid 37 (WKYRChaL).

In den Abbildungen sind jeweils die SPR-Antworten als Funktion aller untersuchten Ligandkonzentrationen (oben) und niedrigerer Konzentrationen (Mitte) aufgetragen sowie das Sensorgramm ($c = 8 \mu\text{M}$) mit dem entsprechenden kinetischen *fit* (unten). Wie durch die schwarzen Graphen in Abbildung 42 **oben** angedeutet, lässt sich in diesem Fall die Wechselwirkung mit dem Rezeptor ACE2 für das Peptid 37 als Überlagerung einer spezifischen und unspezifischen Bindung interpretieren. Die Anpassung der RU-Antworten bis zu einer Ligandkonzentration von $8 \mu\text{M}$ an das *one-site-binding* Modell (**Mitte**) ergibt eine Dissoziationskonstante von $K_D = 2 \mu\text{M}$. Allerdings beträgt der RU_{max} -Wert mit 6 RU lediglich 6% der theoretisch zu erwartenden SPR-Antwort. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der kinetischen Analyse (**unten**), die eine Dissoziationskonstante von $1.7 \mu\text{M}$ und einen noch geringeren RU_{max} -Wert von 1.3 RU liefert. Der Widerspruch zwischen der

relativ niedrigen Dissoziationskonstanten und den viel zu geringen RU_{\max} -Werten kann an dieser Stelle nicht aufgelöst werden.

Die Analysen für das Peptid **41**, welches sich im Vergleich zu Verbindung **37** lediglich darin unterscheidet, dass anstelle von Y442 die Aminosäure Y440 durch Cyclohexylalanin ersetzt wurde, ergeben ein anderes Bindungsverhalten (Abbildung 43). Die erhaltenen RU-Antworten sind im Vergleich zu **37** um das 10fache erhöht und wie die Anpassung der Datenpunkte an das Bindungsmodell über den gesamten Konzentrationsbereich zeigt, streben sie mit 1535 RU gegen einen 15fach erhöhten RU_{\max} -Wert (Abbildung 43 **oben**). Daraus ergibt sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 205 \mu\text{M}$. In Abbildung 43 (**Mitte**) sind lediglich die Antworten der Konzentrationen zwischen $0.005 - 20 \mu\text{M}$ und ohne die Datenpunkte für $c = 0.5$ und $1 \mu\text{M}$ an das *one-site-binding* Modell angepasst.

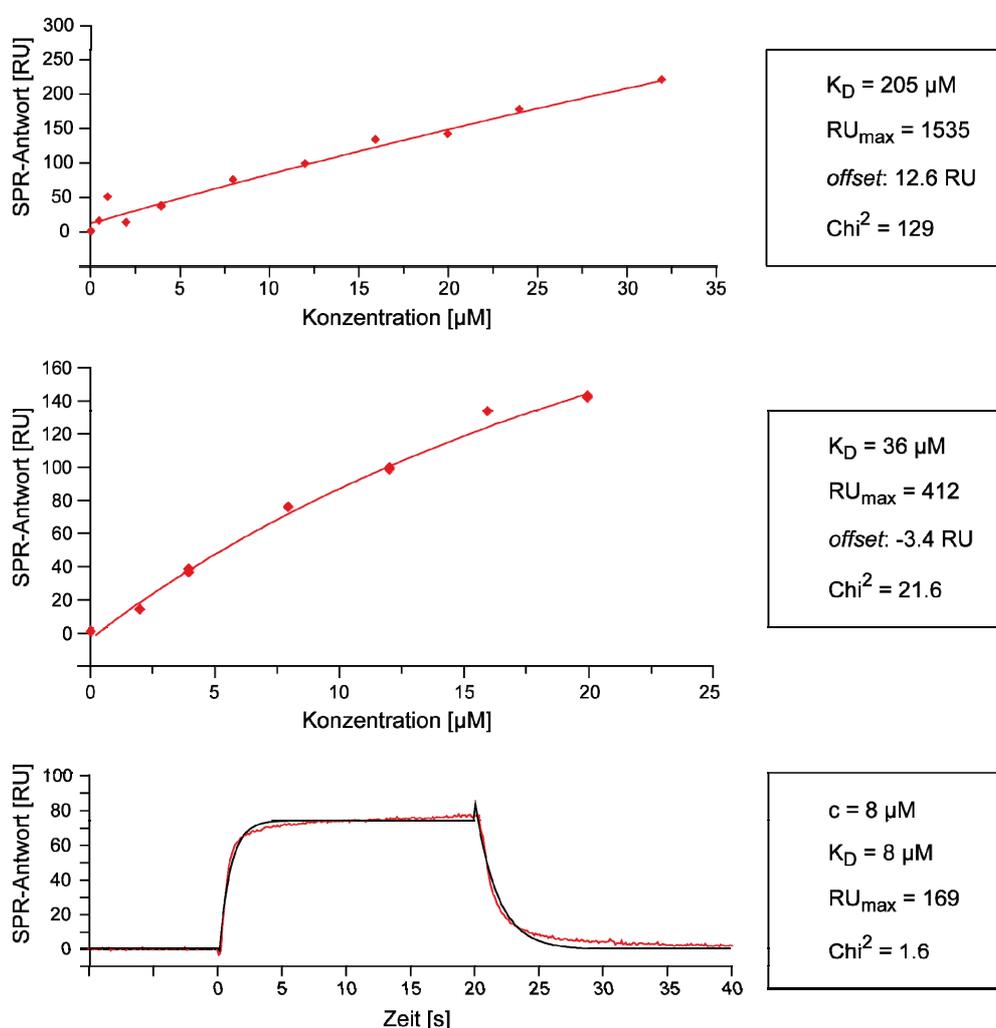


Abbildung 43: SPR-Analyse von Peptid **41** (WKChARYL). **Mitte:** Im Vergleich zu dem fit im oberen Bild wurden hier die RU-Antworten für die Peptidkonzentrationen 0.5 und $1 \mu\text{M}$ nicht berücksichtigt, da die Werte deutliche Abweichungen zu den übrigen Datenpunkten zeigten.

Es ergibt sich eine mit der der Leitstruktur vergleichbare Dissoziationskonstante von 36 μM bei einem 4fach erhöhten RU_{max} -Wert von 412 RU. Die kinetische Analyse des Sensorgramms bei einer Ligandkonzentration von 8 μM ergibt einen K_{D} -Wert in gleicher Höhe bei einem RU_{max} -Wert von 169 RU. Dieser Wert befindet sich in einem akzeptablen Bereich und vermutlich ließ sich der Einfluss der unspezifischen Bindung dadurch minimieren, dass bei den jeweiligen Analysen stärker die SPR-Antworten im unteren Konzentrationsbereich des Liganden berücksichtigt wurden.

Tabelle 7 gibt eine Übersicht der erhaltenen Parameter aus den thermodynamischen sowie kinetischen SPR-Analysen der untersuchten Hexapeptidanaloga **36-41**.

Tabelle 7: Thermodynamische (affinity) und kinetische (kinetics) Auswertung der in Abbildung 41 gezeigten SPR-Sensorgramme mit Hilfe der Software Biacore T100 Evaluation.

Peptid und analysierte Konzentrationsbereiche	K_{D} [μM] (affinity)	RU_{max}	offset (RU)	K_{D} [μM] (kinetics)	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	RU_{max}
36 BpaKYRChaL							
0.01-32 μM	461	2915	-4	48	9.9×10^3	0.5	451
2-10 μM	13	151	-15	19	2.0×10^4	0.4	171
2 μM	-	-	-	14	6.4×10^4	0.9	67
8 μM	-	-	-	10	3.7×10^4	0.4	113
37 WKYRChaL							
0.5-32 μM	-	-	-	252	2.9×10^3	0.7	231
0.5-8 μM	2	6	-1	84	1.6×10^4	1.4	77
8 μM	-	-	-	2	2.3×10^4	0.04	1
38 BpaKChaRChaL							
0.01-32 μM	369	9437	-32	42	5.6×10^3	0.2	1469
4-10 μM	13	773	136	16	1.0×10^4	0.2	509
8 μM	-	-	-	0.01	2.9×10^7	0.3	188
4 μM	-	-	-	3	3.7×10^4	0.1	97
10 μM	-	-	-	6	2.6×10^4	0.2	373
39 WKChaRChaL							
0.005-32 μM	95	1643	-12	25	1.4×10^4	0.4	627
2-12 μM	17	500	-41	15	1.8×10^4	0.3	337
8 μM	-	-	-	5	4.7×10^4	0.2	202
2 μM	-	-	-	2	7.4×10^4	0.1	22
40 BpaKChaRYL							
0.005-32 μM	83	1261	-10	32	1.6×10^4	0.5	683
8 μM	-	-	-	7	5.2×10^4	0.4	202
2 μM	-	-	-	3	8.4×10^4	0.3	44
41 WKChaRYL							
0.005-32 μM	205	1535	13	25	2.8×10^4	0.7	387
0.005-20 μM	36	412	-3	18	3.6×10^4	0.7	295
8 μM	-	-	-	8	7.3×10^4	0.6	169
2 μM	-	-	-	5	1.0×10^4	0.5	61

Wie hieraus zu entnehmen ist, konnten durch die vorgenommenen Substitutionen keine signifikanten Verbesserungen der Dissoziationskonstanten im Vergleich zu der Leitstruktur

18 ($K_D = 46 \mu\text{M}$) erreicht werden. Die Wechselwirkung der Peptidanaloga mit dem Rezeptor ACE2 ist mit Ausnahme der Verbindung **37** durch starke unspezifische Bindung geprägt. Insbesondere die Bpa-haltigen Analoga zeigen sehr hohe RU-Antworten. So ist z.B. der aus der thermodynamischen Analyse erhaltene RU_{max} -Wert des Peptids **38** (BpaKChaRChaL) mit 9437 RU um etwa den Faktor 100 höher als in der Theorie erwartet. Ohne Berücksichtigung dieser Wechselwirkungen, die jede spezifische Bindung überdecken, kann die Substitution optimistisch bewertet werden. Da unter dieser Annahme keine Verschlechterung der Bindungskonstanten zu beobachten ist, gleichzeitig aber bis zu drei nicht natürliche Aminosäuren in dem untersuchten Fragment enthalten sind, ist eine Untersuchung der Analoga hinsichtlich einer biologischen Aktivität, wie sie für die Leitstruktur **18** durchgeführt wurde, eine viel versprechende Aussicht. Durch eine potentiell höhere Stabilität gegenüber Proteasen bei etwa gleich bleibender Bindungsaffinität könnte die aktive Konzentration, bei der der Eintritt des SARS-CoV in die Wirtszelle unterdrückt wird, erheblich gesenkt werden. Dieses wäre hinsichtlich einer medizinischen Anwendung sehr wünschenswert.

4.6 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

In diesem Abschnitt sollen die aus den SPR- und STD NMR-Studien gewonnenen Strukturmerkmale der wichtigsten Liganden im Kontext der Leitstruktur **18** in Beziehung zu ihren Bindungseigenschaften diskutiert werden.

Der aus dem SPR-*screening* der Bibliothek **B1** als stärkster Binder von ACE2 hervorgegangene Ligand **11** (YKYRYLRHGKLR) zeigt im STD-Bindungsepitop (Abbildung 29) die intensivsten Kontakte zu ACE2 über die drei Tyrosine Y438, Y440, Y442 und das Histidin H445 sowie über K447 bzw. R449 (Abbildung 30). Vermutlich handelt es sich dabei um ein lineares Bindungsepitop, dessen Wechselwirkungsschwerpunkt am N-Terminus liegt. Die daraus hervorgehenden Hexapeptide **18** (YKYRYL), **19** (RYLRHG) und **20** (RHGKLR) zeigen separat ebenfalls eine Interaktion mit ACE2, wobei Peptid **18** mit einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 46 \mu\text{M}$ eine zweifach höhere Affinität als **11** ($K_D = 85 \mu\text{M}$) zeigt. Verbindungen **19** und insbesondere **20** zeigen eine erheblich schwächere Bindung in ihren SPR-Antworten. Obwohl die Aminosäuren H445, K447 und R449 in Verbindung **11** zusätzliche Wechselwirkungen zu ACE2 ausbilden, im Vergleich zu Peptid **18**, wird eine verminderte Affinität von Peptid **11** gegenüber der Verbindung **18** beobachtet. Dies könnte zum einen darauf beruhen, dass einige Aminosäuregruppen des Sequenzabschnitts R444-R449 ungünstige Wechselwirkungen mit ACE2 ausbilden und einer hohen Bindungsaffinität entgegenwirken. Andererseits wäre es denkbar, dass in dem Dodecapeptid **11** bei Assoziation

an den Rezeptor erheblich mehr Konformationsfreiheitsgrade verloren gehen als in dem Hexapeptid **18** und das Bindungsereignis durch entropische Effekte geschwächt wird.

In Übereinstimmung mit dem STD-Bindungsepitop von **11** zeigt das entsprechende Epitop für **18** eine große Nähe der Tyrosine zum Rezeptor. Inwieweit die jeweiligen Tyrosine an der Bindung genau beteiligt sind, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, da keine Einzelsubstitutionen der Positionen Y438, Y440 und Y442 durchgeführt wurden. Bei Austausch aller drei Tyrosine durch Phenylalanin konnte in SPR-Studien zwar eine Wechselwirkung zu ACE2 beobachtet werden, diese wurde jedoch nicht eindeutig als spezifische Wechselwirkung identifiziert (Abbildung 38). Für Verbindung **33** (WKWRWL) ergibt sich, im Vergleich zu **18**, eine identische Dissoziationskonstante mit $K_D = 48 \mu\text{M}$. Allerdings scheint die Interaktion bei Einführung derart großer aromatischer Seitenketten durch einen erheblichen Anteil an Unspezifität bestimmt zu sein (Abbildung 39). Der Austausch von Y438 durch Benzoylphenylalanin führte ebenfalls zu starken unspezifischen SPR-Antworten. Ein auffälliges Bindungsverhalten konnte für Verbindung **37** (WKYRChaL) beobachtet werden (Abbildung 42). Die in diesem Molekül eingeführten Mutationen Y438W und Y442Cha wirken sich – unter Vorbehalt – positiv auf das Bindungsverhalten aus. Unberücksichtigt der sehr niedrigen RU-Antworten, ergibt die Anpassung der Datenpunkte bis zu einer Ligandkonzentration von $8 \mu\text{M}$ an das *one-site-binding* Modell eine Dissoziationskonstante von $K_D = 2 \mu\text{M}$ und stellt demnach eine leichte Verbesserung im Vergleich zu Peptid **18** dar.

Der beobachtete Sättigungstransfer auf die Seitenkettenprotonen H δ , δ' von R441 deutet auf eine ionische Interaktion der Guanidinogruppe mit dem Rezeptor hin. Wird diese Aminosäure, wie in Verbindung **35**, durch Citrullin ersetzt, bricht die Bindung vollständig zusammen. Ähnlich wie in dem in der Einleitung in 1.1.4 beschriebenen Beispiel eines Thermolysin-Inhibitors (Abbildung 1), könnte die Substitution einer NH-Gruppe in der Guanidinogruppe durch ein Sauerstoffatom hier zu einer erheblichen elektrostatischen Abstoßung der Verbindung YKYCitYL und ACE2 führen. Dies ist leicht zu verstehen, wenn angenommen wird, dass R441 eine Salzbrücke zu einem Glutamat oder Aspartat im Rezeptormolekül ausbildet.

In dem Bindungsepitop des Fusionspeptids **31** (Abbildung 34) wird ersichtlich, dass jenseits des N-Terminus des Hexapeptids **18** die beiden Aminosäuren N435 und Y436 in räumlicher Nähe zum Rezeptorprotein stehen. Eine Erweiterung des Epitops von **18** um diese Aminosäuren könnte durchaus eine weitere Verbesserung der Affinität gegenüber ACE2 bewirken.

4.7 Diskussion

Das von Li *et al.* identifizierte Rezeptorbindungsmotiv (RBM) ist komplementär zu einer etwa 1700 Å² großen Fläche des Rezeptors und bindet dementsprechend mit hoher Affinität an ACE2 ($K_D \sim 10^{-8}$).⁷⁹ Aus der Röntgenkristallstrukturanalyse geht hervor, dass insgesamt 18 Aminosäuren des Rezeptors in Kontakt mit 14 Aminosäuren des viralen S Proteins stehen (Abbildung 3). Zeitgleich zu der Veröffentlichung des Strukturkomplexes aus ACE2 und RBD konnte im Rahmen dieser Arbeit ein verfeinertes Bindungsepitop der RBD des SARS-CoV erhalten werden (Abbildung 20). Die in den SPR-Bindungsstudien identifizierten ACE2-Liganden **11** (Y438-R449, YKYRYLRHGKLR), **14** (S474-T485, SYWPLNDYGFYT) und **15** (T486-V497, TTGIGYQPVRVV) sind Bestandteil des Bindungsmotivs und enthalten 60% der Aminosäuren, die in direktem Kontakt zu ACE2 stehen. In der Literatur können weitere Hinweise dafür gefunden werden, dass die hier identifizierten Peptide tatsächlich mit der Bindungsregion des SARS-CoV interagieren. In einem *screening* einer in der Sequenz überlappenden Decapeptidbibliothek, die zur Bestimmung von linearen B-Zell Epitopen des SARS-CoV synthetisiert wurde, konnten Hu *et al.* ein 33 Aminosäuren umfassendes Peptid (S471-503) identifizieren, dass die Bindung der RBD an ACE2 hemmt.¹¹¹ Die Gruppe zeigte, dass das Peptid, welches in der Sequenz mit **14** und **15** überlappt, die Plaque-Bildung in Vero-Zellen mit einem EC₅₀-Wert von 46 µM hemmt. Ho *et al.* beobachteten eine biologische Aktivität mehrerer kurzer S-Peptide hinsichtlich der Inhibition der S-ACE2-Interaktion.¹¹² Von den untersuchten Verbindungen zeigte Peptid SP-8 (F483-Y494, FYTTTIGIGYQPY), welches ebenso mit der Sequenz von **14** und **15** überlappt, eine inhibitorische Aktivität bei einem millionenfachen Überschuss des Peptids gegenüber dem Rezeptor ACE2. Im Gegensatz zu den biologisch aktiven Peptiden von Hu und Ho *et al.*, konnte für das 20 Aminosäuren umfassende Peptid P4 (P470-I489, PALNCYWPLNDYGFYTTSGI) von Zheng *et al.*, das im Wesentlichen mit der Sequenz von **14** überlagert, in einem so genannten *cytopathic effect* (CPE)-basierten Assay keine Inhibition beobachtet werden.¹¹³ In der Literatur ist bis zu diesem Zeitpunkt keine biologisch relevante Verbindung beschrieben worden, die den Sequenzabschnitt von Peptid **11** beinhaltet.

Durch die Synthese und das SPR-*screening* der Hexapeptidbibliothek **B2** konnte Verbindung **18** (Y438-L443, YKYRYL) als minimales Bindungsmotiv des SARS-CoV *spike* Proteins identifiziert werden. Innerhalb der Sequenz befindet sich die Aminosäure R441, die in der RBD eine Art Schlüsselrolle einnimmt. Wie Yi *et al.* zeigten, bewirkt die Substitution von Arg 441 durch Alanin (R441A) in einem DNA Impfstoff, basierend auf der kompletten

Aminosäure Sequenz von *S*, dass keine neutralisierenden Antikörper mehr erzeugt werden.¹¹⁴ Ebenso konnte in einem Assay mit Pseudoviren und mutiertem S-Protein (R441A) kein Viruseintritt in die Wirtszellen beobachtet werden. In den Versuchen von He *et al.* zeigte das Fusionsprotein RBD-Fc, das ebenfalls die Mutation R441A enthielt, keine Affinität gegenüber ACE2 und das Proteinkonstrukt war nicht in der Lage den *S*-vermittelten Eintritt von Pseudoviren zu blockieren.¹¹⁵ In der Literatur ist allerdings nicht beschrieben, ob eine direkte Beteiligung von R441 an der Protein-Rezeptor-Wechselwirkung oder ein indirekter Einfluss, etwa durch Stabilisierung der Sekundärstruktur der RBD, dafür verantwortlich ist. Im Gegensatz zu der Röntgenstrukturanalyse von Li *et al.*, deutet das hier vorgestellte STD-Bindungsepitop von Peptid **18** (Abbildung 27) sowie das SPR-Bindungsverhalten von Peptid **35** (YKYCitYL, Abbildung 40) auf eine direkte Wechselwirkung zwischen R441 und ACE2 hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von C. Drosten am Bernhard-Nocht-Institut biologische Inhibitionassays mit Peptid **18** durchgeführt (Abschnitt 4.4). Im *real-time* RT-PCR-Reduktionsassay konnte bei einer Peptidkonzentration von etwa 10 mM die Virusreplikation vollständig gehemmt werden. Bei einer Dissoziationskonstanten von 46 μ M kann bereits bei einer Konzentration von 5 mM eine signifikante Inhibition der Virusvermehrung erwartet werden und hinsichtlich einer medizinischen Anwendung erscheint die tatsächlich beobachtete aktive Konzentration sehr hoch. Vor dem Hintergrund jedoch, dass für die Bekämpfung einer akuten SARS-Infektion eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration im respiratorischen Trakt erforderlich ist, erscheint es vorstellbar, das Peptid entsprechend konzentriert in Form eines Aerosols zu verabreichen. Das Peptid könnte so auf direktem Wege zum Wirkort gelangen und ein Abbau durch Proteasen wäre vermutlich begrenzt. An dieser Stelle sei zum Vergleich das 36 Aminosäuren umfassende synthetische Peptid T-20 (Enfuvirtide, FUZEON[®], Roche) erwähnt, das als *entry*- bzw. *fusion*-Inhibitor der HIV-1 Infektion wirkt und in der Therapie erfolgreich eingesetzt wird. Dazu werden etwa 90 mg in 1 mL Lösung, entsprechend einer Konzentration von 20 mM, zweimal täglich subkutan injiziert. Die mittlere Halbwertszeit im Plasma wird mit 3.8 ± 0.6 h angegeben.¹¹⁶ In T-Zell-Linien zeigte das Peptid zuvor eine Virusinhibition mit einem $IC_{50} = 1.7$ ng/ml (~ 0.4 nM).^{117;118} In einer Phase I/IIB-Studie an sechzehn Patienten wurde T-20 intravenös in vier unterschiedlichen Dosierungsgruppen über vierzehn Tage verabreicht (3, 10, 30 und 100 mg zweimal täglich). In der Gruppe, die zweimal täglich 100 mg verabreicht bekam, konnte mit Hilfe eines sensitiven RT-PCR-Assays (Detektionslimit 40 Kopien/ml) am Tag 15 nach Beginn der Behandlung eine Reduktion der viralen RNA im Plasma um $1.96 \log_{10}$ Stufen

beobachtet werden.¹¹⁹ Die Wirkung des in dieser Arbeit identifizierten Inhibitors **18** erscheint auch angesichts dieser Daten sehr vielversprechend. Die inhibitorische *in vitro* Konzentration des Peptids **18** liegt zwar deutlich höher als die für Verbindung T-20, jedoch kann bei der einmaligen Gabe des Peptids im Zellsay, eine Reduktion der viralen RNA um 6 log₁₀ Stufen bereits nach einem Tag erreicht werden. Sollte das Peptid *in vivo* ein annähernd gleiches Inhibitionspotential besitzen, so würde sich die benötigte Substanzmenge im Vergleich zu FUZEON erheblich relativieren. Aus der Menge einer einzigen T-20 Injektion von 90 mg, wären für Peptid **18** 10 mL einer 10 mM Lösung herstellbar.

Ein weiterer Vorteil des Peptids **18** liegt in seiner kurzen Sequenz von lediglich sechs Aminosäuren. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität gegenüber mutierten Virusstämmen, wie sie bei einem Wiederausbruch von SARS zu erwarten wären, erheblich, wenn angenommen wird, dass es sich bei dem Epitop um ein essenzielles Bindungsmotiv des SARS-CoV handelt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Teil A

Aufbauend auf den von R. Meinecke durchgeführten Bindungsstudien des zyklischen Peptids cyclo(RGDfV) an das membranständige Rezeptorprotein Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in lebenden Thrombozyten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die die direkte Beobachtung der Bindung des Peptids an das Membranprotein auf Thrombozyten erlaubt. Das neue Verfahren basiert auf der *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie und beinhaltet einen weiteren Differenzfilter. Es wird daher als *saturation transfer double difference* (STDD) NMR-Spektroskopie bezeichnet. Die Wechselwirkung von cycloRGDfV an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten konnte durch starke Signalüberlagerungen in den STD NMR-Spektren von R. Meinecke nicht näher charakterisiert werden.

Die für die NMR-Experimente nötigen Zellsuspensionen wurden aus Thrombozytenkonzentraten präpariert, indem die Zellen in mehreren Schritten in deuterierten Puffer (TBS) überführt wurden. In den aufgenommenen STD NMR-Spektren sollten zunächst die störenden Signale, die durch Zellbestandteile und andere Bindungsprozesse verursacht wurden, durch die Anwendung eines *spinlock*-Feldes ($T_{1\rho}$ -Filter) eliminiert werden. Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis, so dass die Idee des doppelten Differenzfilters verfolgt wurde. Dafür wurden die Zellsuspension auf zwei NMR-Röhrchen aufgeteilt, zu einer der Proben der Ligand hinzugegeben und anschließend von beiden Suspensionen möglichst zeitnah hintereinander ein STD NMR-Spektrum aufgenommen. Anschließend wurde das prozessierte STD-Spektrum der Probe mit nur Zellsuspension von dem Spektrum der Probe, die die gleiche Zellsuspension plus den Liganden enthielt, abgezogen. Es resultierte das STDD-Spektrum, in dem fast ausschließlich STD-Signale des Liganden cycloRGDfV zu beobachten waren. Sämtliche störenden Signale konnten auf diese Weise erfolgreich eliminiert werden, so dass die Bestimmung des Bindungsepitops des Peptids leicht zugänglich war. Das gefundene Epitop bestätigte die Ergebnisse von R. Meinecke, zeigte jedoch einen etwas veränderten Bindungsmodus von cycloRGDfV an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Thrombozyten als an das Protein, eingebettet in Liposomen. Darüber hinaus wurde für das native Protein in den Zellmembranen eine gesteigerte Aktivität beobachtet, die sich in etwa fünffach höheren STD-Prozenten äußerte. Das hier entwickelte STDD-Experiment ist von großer Bedeutung, da es eine direkte Beobachtung von Ligandbindung an membranständige Rezeptoren in lebenden Zellen erlaubt. Eine Untersuchung von Bindungsereignissen, z.B. an den pharmakologisch wichtigen GPCRs, ist mit dieser neuen Technik ohne weiteres möglich.

Teil B

Das SARS Coronavirus (SARS-CoV) ist der Erreger des Schweren Akuten Atemwegssyndroms (SARS), das im Winter 2002/03 als alarmierende Epidemie mit insgesamt mehr als 8000 infizierten Menschen und 800 Toten bekannt wurde. Für die Infektion vermittelt die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des viralen S-Proteins den ersten Kontakt des Virus zum humanen Rezeptor, dem *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2). In dieser Arbeit sollte das Bindungsepitop der RBD mit Hilfe der *surface plasmon resonance* (SPR)-Technik sowie der *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie auf molekularer Ebene untersucht werden. Das Ziel der Bindungsstudien war die Identifizierung einer Leitstruktur, die als Grundlage für die Entwicklung von *entry*-Inhibitoren der SARS-CoV Infektion dienen sollte.

Es wurde zunächst die Peptidbibliothek **B1** synthetisiert, die sechzehn Dodecapeptide enthielt, die die Sequenz der 193 Aminosäuren umfassenden RBD in direkter Abfolge wiedergeben. Die gereinigten Peptide wurden anschließend in einem SPR-Bindungsassay auf eine Affinität gegenüber ACE2 untersucht. Dazu wurde rekombinant hergestelltes, lösliches, humanes ACE2 auf einem CM5-Biacorchip immobilisiert und die Peptidliganden, gelöst in TBS, über das Protein geleitet. In diesem ersten *screening* konnten die drei Peptide **11** (Y438-R449, YKYRYLRHGKLR), **14** (S474-T485, SYWPLNDYGFYT) und **15** (T486-V497, TTGIGYQPVRVV) als bindende Liganden identifiziert werden, wobei Verbindung **11** mit einem K_D von 85 μM im Vergleich zu **14** ($K_D = 450 \mu\text{M}$) und **15** ($K_D = 670 \mu\text{M}$) die stärkste Affinität zu ACE2 zeigte. Eine detaillierte Untersuchung dieser Sequenzen wurde mit einer zweiten Bibliothek **B2** mit insgesamt vierzehn Hexapeptiden durchgeführt, die sich in ihrer Sequenz um jeweils drei Aminosäuren überlappen. Die SPR-Bindungsstudien dieser Verbindungen identifizierte Peptid **18** (Y438-L443, YKYRYL) mit einer Dissoziationskonstanten von 46 μM als eindeutig besten Liganden. Das Bindungsepitop des Peptids **18** für die Bindung an ACE2 wurde mit STD NMR-Spektroskopie bestimmt. Ebenso wurde das Epitop von Peptid **11** charakterisiert, das im Vergleich zu **18** um sechs Aminosäuren in Richtung C-Terminus verlängert ist. Aus beiden Epitopen konnten wertvolle Informationen zum Bindungsmodus gewonnen werden. Insbesondere zeigen die Tyrosine Y438, Y440, Y442 sowie R441 und zusätzlich H445 in **18** große Nähe zum Rezeptor.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das so genannte Fusionspeptid **31** (I489-Q492-*linker*-N435-L443, IGYQ-GSGS-NYNYKYRYL) zunächst am Computer modelliert und anschließend synthetisiert. Dieses geschah vor dem Hintergrund, zwei in der Sequenz voneinander entfernt, räumlich aber nahe beieinander liegende Bindungsepitope durch einen

linker miteinander zu verknüpfen, um so einen Liganden mit einer potentiell größeren Affinität im Vergleich zu Peptid **18** zu erhalten. Die Verknüpfung beider Epitope konnte durch den gewählten GSGS-*linker* erfolgreich realisiert werden und im SPR-Experiment zeigte Peptid **31** mit einer Dissoziationskonstanten von 18 μM etwas stärkere Wechselwirkungen mit ACE2 als die postulierte Leitstruktur **18**. Das STD-Bindungs epitop von **31** zeigt eindeutig, dass beide Epitope mit dem Rezeptorprotein interagieren. Die Aminosäuren N435 und Y436, die in der Sequenz jenseits des N-Terminus von **18** lokalisiert sind, scheinen im Fusionspeptid wichtige Kontakte zu ACE2 auszubilden.

Damit eine Verbindung als potentielle Leitstruktur für die Entwicklung von *entry*-Inhibitoren in Frage kommt, ist es notwendig, dass sie biologisch aktiv und tatsächlich in der Lage ist, um die virale Bindungsstelle zu konkurrieren. Die Aktivität von **18** wurde daher in Form eines SARS-CoV Plaque-Inhibitionstests sowie eines *real-time* RT-PCR-Reduktionsassays untersucht. Während im Plaque-Assay keine inhibitorische Wirkung festgestellt werden konnte, zeigte sich im deutlich sensitiveren RT-PCR-Test eine etwa 10fache Reduktion der Viren bei einer Ligandkonzentration von 7 mM. In der Diplomarbeit von A.-W. Struck konnte in einer Wiederholung des Assays die inhibitorische und konzentrationsabhängige Wirkung eindeutig bestätigt werden. Bei einer Peptidkonzentration von etwa 10 mM konnte eine vollständige Inhibition der Virusproliferation in VeroE6 Zellen erreicht werden. Die biologischen Testergebnisse lassen den Schluss zu, dass Verbindung **18** (Y438-L443, YKYRYL) die entscheidende Bindungsstelle für das Virus auf dem Rezeptor ACE2 blockiert und eine Infektion der Zellen durch SARS-CoV verhindert. Ein zytotoxischer Effekt konnte nicht beobachtet werden.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit wurde die dritte Peptidbibliothek **B3** synthetisiert, mit dem Ziel, den Einfluss der Aminosäuren R441, Y438, Y440 und Y442 zu untersuchen. Es sollten dabei Peptidanaloga der Leitstruktur **18** identifiziert werden, die im Vergleich dazu gegebenenfalls bessere Bindungseigenschaften sowie eine höhere Stabilität gegenüber Proteasen aufwiesen. Es zeigte sich, dass bei Substitution von R441 gegen die unnatürliche Aminosäure Citrullin in Verbindung **35** die Bindung zu ACE2 erlischt. Der Austausch der Tyrosine Y438, Y440 und Y442 durch Tryptophan, Benzoylphenylalanin bzw. Cyclohexylalanin führte bei teilweise gleich bleibender Bindungsaffinität zu einer potentiell höheren Stabilität gegenüber Proteasen. Derartige Abbau-Studien waren jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit, sind aber vor dem Hintergrund einer medizinischen Anwendung des Wirkstoffs durchaus sehr sinnvoll.

6 SUMMARY

Part A

On the basis of R. Meinecke's binding studies of the pentapeptide cycloRGDFV to the surface glycoprotein integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ of intact human blood platelets, a new method was developed to detect the direct binding of the peptide to the membrane-bound protein in living cells. The new technique is a further development of the saturation transfer difference (STD) NMR experiment as it implies a second difference filter and therefore is called saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy. The interaction of cycloRGDFV with integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ of intact human blood platelets could not be specified on an atomic level in the work of R. Meinecke due to a large portion of signal overlap in the STD spectra.

Cell suspensions necessary for the NMR experiments were prepared from human platelet concentrates that were resuspended in deuterated TRIS buffered saline (TBS) in several cycles. In the beginning some attempts were made to suppress the STD signals originating from other cell proteins and binding events, which contaminated the spectra to a large extent, by applying spinlock fields ($T_{1\rho}$ -filter) during spectra acquisition. This did not lead to a satisfying result and consequently the idea of a double difference filter was pursued. Therefore, a cell suspension was split up into two NMR tubes, to one tube ligands were added and STD spectra of both samples were recorded one after the other. The STD spectrum of the sample containing only the cell suspension was then subtracted from the STD spectrum of the cell suspension with additionally added ligands. This resulted in the STDD spectrum which revealed mainly signals from the ligand receptor interaction. Thus, all the disturbing signals could be canceled out and an assignment of the ligand's signals as well as an epitope mapping of cycloRGDFV became easily possible. The binding epitope is largely in agreement with the data found by R. Meinecke for the interaction with the integrin embedded in liposomes but reflects a slightly different binding mode to the native receptor integrated in platelet membranes compared to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ reintegrated into liposome membranes. In addition, a higher activity was found for the native integrin, leading to STD effects five times larger in their intensity when compared to the studies with integrin in liposome membranes. This shows the importance of the new STDD technique which allows a direct observation of ligand binding to membrane proteins in their natural environment, i.e. in living cells. Studying binding events that involve the pharmacologic important GPCRs, for example, becomes easily feasible.

Part B

The SARS coronavirus (SARS-CoV) is the agent of severe acute respiratory syndrome (SARS), which emerged as an alerting epidemic in the winter of 2002/03, with over 8000 infected cases and about 800 deaths. As initial interaction of the SARS-CoV infection a defined receptor-binding domain (RBD) on the viral spike protein (S) mediates the attachment of the virus to its cellular receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)

In this work the binding epitope of the RBD was characterized in detail by means of the surface plasmon resonance (SPR) technique and saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy at an atomic level. The intention of the binding studies was to identify a lead structure as a basis for the design of entry inhibitors of the SARS-CoV infection.

As a start the linear peptide library **B1** was synthesized containing sixteen 12mer peptides which together comprised the 193 residues of the RBD. The purified peptides were used to identify binding motifs with the human receptor ACE2 in a SPR affinity assay. Therefore, recombinant, soluble, human ACE2 was immobilized on a CM5-Biacorechip and peptide ligands, dissolved in TBS, were passed over the protein. In this first screening the three compounds **11** (Y438-R449, YKYRYLRHGKLR), **14** (S474-T485, SYWPLNDYGFYT) and **15** (T486-V497, TTGIGYQPVRVV) were identified as binding ligands, whereas peptide **11** clearly showed the strongest binding with a dissociation constant of $K_D = 85 \mu\text{M}$, compared to **14** ($K_D = 450 \mu\text{M}$) and **15** ($K_D = 670 \mu\text{M}$). To further characterize the binding epitope of these ligands a second peptide library **B2** of fourteen 6mer peptides with an overlap of three amino acids in each sequence was synthesized. A SPR screening clearly identified peptide **18** (Y438-L443, YKYRYL) with a dissociation constant of $K_D = 46 \mu\text{M}$ as best binding ligand. The binding epitope of **18**, when interacting with ACE2, was characterized by STD NMR spectroscopy. Likewise an epitope mapping of peptide **11** was performed, which sequence is extended beyond the C-term by six amino acids in contrast to **18**. Both binding epitopes gave valuable information about the binding mode of the compounds, especially residues Y438, Y440, Y442 as well as R441 and additionally H445 show close contact to the receptor molecule ACE2.

In the further course of this work the so-called fusion peptide **31** (I489-Q492-linker-N435-L443, IGYQ-GSGS-NYNYKYRYL) was at first modeled *in silico* and then synthesized. This was done in order to link two identified binding epitopes, which are apart in sequence but close in space, as gathered from X-ray analysis, with the intention to obtain a ligand with higher affinity than the lead structure **18**. The linkage could be realized successfully by an GSGS-linker. In the SPR experiment peptide **31** showed a dissociation constant of $18 \mu\text{M}$,

which indicates a slightly stronger interaction with the receptor ACE2 than ligand **18**. The STD binding epitope clearly reveals that both epitopes interact with the receptor. Residues N435 and Y436, which are located beyond the N-term of **18**, seem to make close contacts to ACE2 within the fusion peptide.

A chemical compound can only be considered as a lead structure for the development of entry-inhibitors, if it shows biological activity and therefore is capable to compete with the binding site of the virus. The biological properties of **18** were studied in terms of a SARS-CoV plaque inhibition as well as a real-time RT-PCR reduction assay. Whereas in the plaque assay no inhibitory effect was observed, peptide **18** showed a 10fold reduction of the virus in the much more sensitive RT-PCR assay at a ligand concentration of 7 mM. A repeated test within the diploma thesis of A. Struck clearly confirmed the inhibitory and concentration dependent effect of peptide **18**. At a concentration of about 10 mM a complete reduction of virus replication in VeroE6 cells was observable indicating truly that the identified lead structure **18** (Y438-L443, YKYRYL) blocks the critical binding site on the receptor molecule ACE2 and an infection of the cells becomes impossible for the SARS-CoV. There was no indication for a cytotoxic effect of the compound.

In the concluding part of the work the peptide library **B3** was synthesized in order to study the influence of the residues R441, Y438, Y440 and Y442 on the binding affinity. The aim of the following binding assays was to identify analog peptides with stronger affinity towards ACE2 and a potentially higher stability towards proteases. The substitution of R441 by the unnatural amino acid citrulline abolished the binding of compound **35**. The mutation of the tyrosine residues Y438, Y440 and Y442 with tryptophan, benzoylphenylalanine or cyclohexylalanine lead to potentially higher stability towards proteases at similar binding affinity of the analog peptides to the receptor ACE2. Degradation studies of the synthesized compounds were not part of this work, however, in respect of future medicinal applications of the agent it seems very reasonable to do so.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Chemikalien

Hersteller/Lieferant	Chemikalien
Acros	Acetonitril (HPLC for gradient analysis), Triisopropylsilan 99%
Lancaster	Triisopropylsilan 99%
Advanced ChemTech	Fmoc-L-Bpa-OH, Fmoc-L-Cha-OH, Fmoc-L-Cit-OH
Applied Biosystems	Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
Bachem	cycloRGDfV
Biacore	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS), <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC), Ethanolamin (EA), CM5-Chip, Acetatpuffer
Cambridge Isotope Lab	Tris- <i>d</i> ₁₁
Deutero	Deuteriumoxid, 99.9%
Fluka	di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat, Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei)
Iris Biotech	DIPEA, DMF, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Piperidin, TBTU
J.T. Baker	Natriumchlorid
Merck	AEBSF-HCl, tert-Butylmethylether, Calciumchlorid, Dichlormethan, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, EDTA-Na ₂ , Essigsäureanhydrid, Kaliumchlorid, Natriumazid, Trifluoressigsäure, Tris, Zinkchlorid
R&D Systems	rhACE2
Sigma	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure

Zellen und Proteine

Thrombozyten: Die Thrombozytenkonzentrate wurden vom Blutspendedienst Hamburg Eilbek zur Verfügung gestellt. Diese enthielten die von fünf Vollblutspenden vereinigten Thrombozyten, die in *citrate-phosphate-dextrose* (CPD)-Plasma suspendiert vorlagen. Die Zellzahl wurde vom Hersteller mit mindestens 2.5×10^{11} angegeben. Bei einem Volumen des Transfusionsbeutels von 310 – 320 mL entspricht dies einem Gehalt von $\sim 8 \times 10^8$ Thrombozyten/mL. Das CPD-Plasma enthielt pro 0.8 ml Blutplasma 0.2 ml CPD Stabilisierungslösung. Die im Plasma verbleibenden Mengen an Erythrozyten und Leukozyten wurden mit weniger als 5×10^8 und 1×10^6 spezifiziert.

rhACE2: Sowohl für die SPR- als auch für die STD NMR-Messungen wurde das rekombinante humane *angiotensin converting enzyme 2* (rhACE2) der Firma R&D Systems eingesetzt. Das Protein umfasst die Aminosäuren 1-740 und wurde als lösliches Protein in einer murinen Myeloma Zelllinie (NS0) mit einem C-terminalen His *tag* und einer Molmasse von 120 kDa exprimiert. Geliefert wurde das Protein in einer 0.2 μ m filtrierten Lösungen von 25 mM Tris, 0.2 M NaCl, 5 μ M ZnCl₂, pH 8 und einer Proteinkonzentration von 1mg/ml.

Tabelle 8: Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>d</i> -TBS-AEBSF	150 mM NaCl, 10 mM TRIS- <i>d</i> ₁₁ , 4 mM NaN ₃ , 3 mM KCl, und 1 mM AEBSF-HCl in D ₂ O, pH 7.4
<i>d</i> -TBS-AEBSF-EDTA	150 mM NaCl, 10 mM TRIS- <i>d</i> ₁₁ , 4 mM NaN ₃ , 3 mM KCl, 1 mM EDTA-Na ₂ und 1 mM AEBSF-HCl in D ₂ O, pH 7.4
<i>d</i> -TBS-AEBSF-CaCl ₂	150 mM NaCl, 10 mM TRIS- <i>d</i> ₁₁ , 4 mM NaN ₃ , 3 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ und 1 mM AEBSF-HCl in D ₂ O, pH 7.4
TBS	0.2 μ m filtriert, 25 mM Tris, 0.2 M NaCl und 5 μ M ZnCl ₂ in H ₂ O, pH 8
<i>d</i> -TBS	0.2 μ m filtriert, 25 mM Tris- <i>d</i> ₁₁ , 0.2 M NaCl und 5 μ M ZnCl ₂ in D ₂ O, pH 8
PBS	40 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, 0.1 M NaCl, 5 μ M ZnCl ₂ , pH 7.4

7.2 Verwendete Geräte und Software

Automatisierte Peptidsynthese

Advanced Chemtech MOS 496 Ω: Der Syntheseroboter MOS 496 Ω der Firma Advanced ChemTech arbeitet nach dem *batch* Verfahren und verfügt über einen Reaktionsblock mit 96 Kammern, in denen parallel synthetisiert werden kann.

Chromatographie

BioCAD 700E Perfusion Chromatography Workstation: Die HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems war zur Aufreinigung der Peptide mit folgenden Säulen und einem Fraktionssammler bestückt:

präparative Säule: VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid 5μ column (Macherey&Nagel)

analytische Säule: EC 250/4 Nucleodur C18 Pyramid 5μ column (Macherey&Nagel)

Fraktionssammler: Gilson 203B, Gilson, Middleton, WI, USA.

Merck Hitachi La Chrom: Die HPLC-Anlage der Firma Merck Hitachi war zur Aufreinigung der Peptide mit folgenden Säulen bestückt:

semipräparative Säule: Protein & Peptide C18 (Vydac)

MALDI-TOF Massenspektrometrie

Biflex III: Die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren erfolgte an einem Biflex III Spektrometer der Firma Bruker.

Surface Plasmon Resonance (SPR)

Biacore3000/T100: Die SPR-Untersuchungen wurden an Biacore3000 und BiacoreT100 Geräten der Firma Biacore durchgeführt. Dabei wurde das Protein auf Sensorchips des Typs CM-5 (Biacore) immobilisiert. Zur Auswertung der Messdaten wurden die Programme BIAevaluation 3.0, T100 Evaluation sowie OriginPro 7.5G (OriginLab Corporation) verwendet.

NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der NMR-Spektren standen zwei Spektrometer der Firma Bruker zur Verfügung:

Avance DRX 500: Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87MHz für Protonen. Das Spektrometer ist mit

einem inversen 5mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet.

Avance DRX 700: Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 16.35 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 700.13MHz für Protonen. Das Spektrometer ist wahlweise mit einem inversen 5mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen oder mit einem TXI-Probenkopf ohne Cryo-Technologie ausgestattet.

Prozessierung: Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR (Bruker, Version 3.1) auf Silicon-Graphics Workstations (O₂, Octane) und TOPSPIN (Bruker, Version 1.3) am PC.

Verschiedenes

Photometer: Die photometrischen Reaktionsverfolgungen wurden an einem *UV-mini1240*-Photometer der Firma *Shimadzu* vorgenommen.

Lyophylle: Die Gefriertrocknungen erfolgten an den Geräten Alpha 1-2 bzw. Alpha 1-4 der Firma Christ.

Speedvac: Zur Gefriertrocknung von wässrigen Lösungen diente die SpeedVac SC110 der Firma Savant. TFA-haltige Peptidlösungen wurden mit der SpeedVac SPD121P der Firma Savant eingeeengt.

Eppendorffzentrifuge 5804R: Das Zentrifugieren der Thrombozytensuspensionen sowie des Peptidrückstandes nach Ausfällen mit tert-Butylmethylether erfolgte mit der Eppendorffzentrifuge 5804R der Firma Eppendorf.

Eppendorffzentrifuge 5415C: Nicht lösliche Rückstände in Proben für die HPLC oder für die NMR-Spektroskopie wurden mit Hilfe der Eppendorffzentrifuge 5415C zentrifugiert und durch Abnehmen des Überstandes abgetrennt.

Dialysemembran: Zum Umpuffern von rhACE2 dienten Slide-A-Lyzer MINI Units mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 3500 von der Firma Pierce Biotechnology.

7.3 NMR Experimente mit humanen Thrombozyten

7.3.1 Umpufferung der humanen Thrombozyten in TBS-Puffer

Die Umpufferung der Thrombozyten erfolgte bei Raumtemperatur direkt nach der Abholung der Konzentrate am sechsten Tag nach der Blutentnahme.

In ein zuvor gewogenes 50-mL-Zentrifugenröhrchen wurden 16 mL ($\sim 14 \times 10^9$ Zellen) Thrombozytenkonzentrat (CPD-Plasma) gegeben und 20 min bei $1600 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das Pellet mit dem anhaftenden Überstand wurde ausgewogen und hatte ein Volumen von 300 μL bis 600 μL . Dieses wurde in 2 mL *d*-TBS-AEBSF-EDTA-Puffer resuspendiert und die Suspension in ein zuvor gewogenes 15-mL Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen durch 15 min Zentrifugation bei $1600 \times g$ sedimentiert und der Überstand vom Pellet dekantiert. Die drei letzten Schritte (Resuspendierung, Sedimentierung und Dekantierung) wurden insgesamt zehnmal wiederholt. Bei der siebten Wiederholung wurde allerdings mit *d*-TBS-AEBSF-Puffer resuspendiert und bei der achten bis zur zehnten Wiederholung wurde mit *d*-TBS-AEBSF- CaCl_2 -Puffer resuspendiert.

7.3.2 STD NMR Messungen mit Thrombozyten

Vorbereitung der NMR-Proben: Bei der oben beschriebenen Umpufferung wurden Pellets mit einem Volumen von etwa 500 μL erhalten. Diese wurden jeweils resuspendiert mit 500 μL bis 750 μL *d*-TBS-AEBSF- CaCl_2 -Puffer, so dass ein Volumen von $\sim 1100 \mu\text{L}$ erhalten und gleichmäßig auf zwei 5mm NMR-Röhrchen aufgeteilt wurde. Entsprechend enthielt damit jede NMR-Probe 550 μL Zellsuspension mit ungefähr 7×10^9 Thrombozyten. Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 3×10^{11} Thrombozyten pro Liter menschlichen Bluts entsprach diese Zahl einer Blutmenge von ca. 23 mL. Ferner enthielt jede NMR-Probe 100 bis 600 pmol Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, mit der Annahme, dass $1-5 \times 10^4$ Integrinmoleküle auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Zu einer der NMR-Proben wurden 50 μL einer 3 mM Stammlösung (150 nmol) cyclo(RGDfV) in *d*-TBS-AEBSF- CaCl_2 pipettiert. Als Negativkontrolle dienten Proben, die nur cyclo(RGDfV) in *d*-TBS-AEBSF- CaCl_2 enthielten.

Aufnahme der NMR Spektren: Alle NMR-Spektren wurden auf Bruker Avance DRX 500 und 700 NMR Spektrometern aufgenommen. Die STD NMR Spektren der Zellsuspensionen wurden bei einer Temperatur von 283 K und einer spektralen Weite von 10 ppm mit insgesamt 2k Datenpunkten aufgenommen (Pulsprogramm *stdw5sp2d.bc*). Die selektive

Sättigung erfolgte über eine Kaskade von 40 Gausspulsen über einen Zeitraum von 2.04 s mit einem Einstrahlpunkt der Sättigungspulse bei -1.1 ppm (on-resonance) und 114 ppm (off-resonance). Die Wasserunterdrückung wurde durch Anwendung der WATERGATE Pulssequenz (Pulsprogramm *w5gp.rm*) erreicht. Bei den aufgenommenen Spektren mit $T_{1\rho}$ -Filter (Pulsprogramm *stdw5slsp2d.bc*) wurden Spinlock-Pulse von 30 ms und 80 ms Länge verwendet.

Auswertung der NMR-Spektren: Vor der Fourier Transformation wurden die Spektren mit einer exponentiellen Linienverbreiterung von 0.5 Hz multipliziert. Die Bestimmung der absoluten STD% erfolgte durch den Vergleich des STD-Spektrums mit dem durch das Pseudo-2D-Experiment zugänglichen off-resonance Spektrum. Letzteres kann direkt als Referenzspektrum verwendet werden, da es unter exakt den gleichen Bedingungen wie das STD-Spektrum aufgenommen wurde.

7.3.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung von cycloRGDfV

Alle NMR-Spektren wurden auf Bruker Avance DRX 500 und 700 NMR Spektrometern aufgenommen. Die Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebungen von cyclo(RGDfV) erfolgte mit Hilfe von 1D- ^1H Experimenten, 2D- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY-Spektren (Pulsprogramm *mlevgpph19*) und 2D- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY Spektren (Pulsprogramm *noesygpph19*). Die Wasserunterdrückung wurde mittels Vorsättigung des Wassersignals (Pulsprogramm *zgpr*) oder durch Anwendung der WATERGATE Pulssequenz (Pulsprogramm *p3919gp*) erreicht. Die 2D-Spektren wurden mit 512 Inkrementen in der F1-Dimension aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm wurden 32 *scans* mit jeweils 4096 Datenpunkten pro Inkrement akkumuliert. Alle Spektren wurden mittels TPPI phasensensitiv aufgenommen.

In Tabelle 9 sind die chemischen Verschiebungen und die relativen STD% des Peptids cyclo(RGDfV) aufgeführt. Die STD-Effekte wurden aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien an nativem Integrin auf Thrombozyten und aus den Arbeiten von R. Meinecke an rekonstituiertem Integrin in Liposomen bestimmt.

Tabelle 9: Chemische Verschiebungen der Protonenresonanzen von cyclo(RGDfV) und deren relative STD-Effekte [STD%] bezogen auf den absoluten STD-Effekt von (*) Phe H ϵ , H ϵ' , H ζ mit 55.5% und 11%, die jeweils als 100% festgelegt wurden (n. b. = nicht bestimmbar).

	Chemische Verschiebung [ppm]	relative STD% Thrombozyten	relative STD% Liposomen
Arg H α	4.122	92.7	72.7
Arg H β	1.424	72.6	60.5
Arg H β'	1.306	48.6	60.5
Arg H γ	1.622	n. b.	n. b.
Arg H γ'	1.622	n. b.	n. b.
Arg H δ	2.951	16.9	40.0
Arg H δ'	2.951	16.9	40.0
Gly H α	3.903	65.9	39.4
Gly H α'	3.256	43.6	40.0
Asp H α	4.442	n. b.	n. b.
Asp H β	2.438	55.2	40.3
Asp H β'	2.278	58.8	54.5
Phe H α	4.442	n. b.	n. b.
Phe H β	2.837	74.4	66.5
Phe H β'	2.717	57.3	66.5
Phe H δ , δ'	7.134-7.086	92.7	100.0
Phe H ϵ , H ϵ' , H ζ	7.059-6.986	100.0*	100.0*
Val H α	3.431	78.9	n. b.
Val H β	1.620	n. b.	n. b.
Val H γ	0.452	46.0	57.1
Val H γ'	0.405	51.5	65.7

7.4 Peptidsynthesen

7.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Peptidsynthese

AAV 1: Fmoc-Abspaltung und Methylenfluoren-Monitoring (Fmoc-Wert)

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das betreffende Harz in einer Glasfritte zweimal mit je 2 mL eines Piperidin/DMF (1:4) Gemisches versetzt und über einen Zeitraum von je 15 min geschüttelt. Zur Bestimmung der Kupplungsausbeute wurde anschließend achtmal mit je 2 mL DMF gewaschen und die vereinigten Phasen je nach Ansatzgröße im Verhältnis 1:20 oder 1:10 verdünnt. Die Menge des abgespaltenen Methylenfluorens ließ sich photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm ($\epsilon = 7950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ermitteln. Anhand des so erhaltenen Fmoc-Werts konnte die Kupplungsausbeute am Harz bestimmt werden.

AAV 2: Acetylierung (Capping)

Zur Acetylierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen (capping) wurde das Harz zweimal in Folge mit einer 10%igen Lösung von Essigsäureanhydrid in DMF bedeckt und über einen Zeitraum von mindestens 15 min geschüttelt. Abschließend wird das Acetylierungsreagenz durch einen Stickstoffstrom aus der Fritte herausgedrückt und das Harz so oft mit DMF gespült, dass sämtliche Reste des Acetylierungsreagenzes entfernt wurden.

AAV 3: Manuelle Kupplung von Aminosäurederivaten

Die der gewünschten Ansatzgröße äquivalente Menge PAL-PEG-PS-Harz wurde in eine Glasfritte eingewogen und anschließend zum Quellen für mindestens 20 Minuten mit DMF bedeckt und geschüttelt und das Lösungsmittel anschließend durch einen Stickstoffstrom aus der Fritte herausgedrückt. Es folgte das Entschützen der Fmoc-Gruppe des Linkers bzw. des bereits vorhandenen Peptid-N-Terminus (AAV 1). Für die nachfolgende Kupplungsreaktion wurde das seitenkettengeschützte Fmoc-Aminosäurederivat im vierfachen Überschuss eingewogen. Der Aktivator TBTU und die Base DIPEA wurden im fünffachen Überschuss eingesetzt. Dazu wurde die Lösung aus Aktivator und DIPEA in DMF zum Lösen der Aminosäure verwendet und anschließend direkt auf das Harz gegeben. Es wurde dabei soviel DMF zum Lösen und Nachspülen der Gefäße verwendet, dass das Harz danach gerade mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Suspension aus Harz und Reaktionslösung wurde für mindestens eine Stunde auf einem automatischen Schüttelgerät durchmischt. Bei einer Mehrfachkupplung wurde die Reaktion mit frischer Reaktionslösung wiederholt. Nach Entfernen der

Reaktionslösung und Waschen mit DMF wurden die nicht umgesetzten Aminogruppen entsprechend der AAV 2 acetyliert. Der Syntheszyklus aus Fmoc-Abspaltung, Kuppeln und Acetylieren wurde für die gewünschte Anzahl an Aminosäuren wiederholt. Zur gegebenenfalls nötigen Aufbewahrung wurde das Harz nach der Synthese mit Dichlormethan gespült und nach Trocknen im Stickstoffstrom bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

AAV 4: Abspaltung der Peptide von der Festphase und Entschützung der Seitenketten

Nach beendeter Synthese wurde das Harz mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Zur gleichzeitigen Abspaltung des Peptids vom Harz und der Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen wurden etwa 4 mL Lösung von TFA/TIPS/H₂O im Verhältnis 95:5:2 auf das Harz gegeben und für mindestens eine Stunde geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend in einem Kolben aufgefangen und das Harz mit TFA nachgespült. Der Vorgang wurde einmal wiederholt und die Abspalllösung im Hochvakuum entfernt.

AAV 5: Fällung des Peptidrohprodukts mit tert-Butylmethylether

Das vom Harz abgespaltene Peptidrohprodukt wurde mit ter-Butylmethylether überschichtet und anschließend für mindestens 15 min im Ultraschallbad suspendiert. Die Suspension wurde stehen gelassen und der Feststoff sedimentierte. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde zentrifugiert und anschließend der überstehende Ether dekantiert und verworfen. Der an der Luft getrocknete Rückstand im Kolben und im Zentrifugenröhrchen wurde vereinigt und für die Aufreinigung mit Hilfe der HPLC verwendet.

AAV 6: Präparative HPLC

Mit Hilfe der HPLC wurden Produkt und Deletions- bzw. Abbruchpeptide voneinander getrennt. Dabei dienten semipräparative und präparative *reversed phase* Säulen als stationäre Phasen. Als mobile Phasen wurden unterschiedliche Gradientenprogramme zwischen Eluent A (95% H₂O/5% MeCN) und Eluent B (95% MeCN/5% H₂O), bzw. Eluent C (95% H₂O/5% MeCN/0.1% TFA) und Eluent D (95% MeCN/5% H₂O/0.1% TFA) über die Säulenvolumina (*column volume*, CV) ausgeführt. Eluiert wurde bei Raumtemperatur und einer Flussrate von 5 mL/min (semipräparative Säule) oder 20 mL/min (präparative Säule). Die Laufmittel waren für die HPLC Gradientenanalyse spezifiziert und wurden zuvor entgast. Die Proben wurden in ca. 1 mL des Eluentengemisches gelöst, welches dem Gradienten bei der Injektion entsprach. Ungelöste Rückstände wurden durch Filtration oder Zentrifugation

vor der Injektion abgetrennt. Die Detektion erfolgte photometrisch bei Wellenlänge von 215 und 280 nm. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden die *peaks* des erhaltenen Chromatogramms den Massen der Produkte zugeordnet. Die getrennt gesammelten Fraktionen der einzelnen Durchgänge, die das gleiche Produkt enthielten, wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeengt und abschließend gefriergetrocknet.

7.4.2 Automatisierte Festphasenpeptidsynthesen

Die Peptidsynthese der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Peptide erfolgte weitestgehend automatisiert am Syntheseroboter *Advanced ChemTech MOS 469 Ω* ausgehend vom C-Terminus an der Festphase nach Fmoc-Strategie. Die Arbeitsschritte, die dem jeweiligen Synthesezyklus zugrunde lagen, wurden vor Beginn der Synthese in sogenannten Syntheseprotokollen programmiert. Aus diesen wurde ein Hauptprogramm erstellt, das jeden einzelnen Syntheseschritt enthielt und den Syntheseroboter steuerte. Die Reaktionen fanden in kleinen Kammern im Syntheseblock des Synthesizers statt. Je nach Ansatzgröße wurde in die Reaktionskammer die entsprechende Menge Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz eingewogen. Zum Quellen wurde das Harz zweimal für jeweils 15 min in 1.5 mL DMF geschüttelt. Es folgte das Abspaltprogramm zum Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz. Dieses beinhaltete die Zugabe von 1.5 mL einer Lösung aus Piperidin und DMF im Verhältnis 1:4, fünfzehnminütiges Vortexen und die Wiederholung dieses Schritts. Durch mehrfaches Spülen mit DMF wurden Reste der Abspaltlösung im anschließenden Waschprogramm entfernt. Für jede Aminosäure wurde eine dreifache Kupplung programmiert. Die Durchführung begann damit, dass 150-300 μ L DMF zum Harz pipettiert wurden. Es folgten die 0.5 M Lösungen der entsprechenden Fmoc-L-Aminosäurederivate, von DIPEA und von TBTU in DMF. Dabei wurden die Verhältnisse so gewählt, dass während der Reaktion vier Äquivalente Aminosäure, fünf Äquivalente Aktivator und ein fünffacher Überschuss an Base bezogen auf die Ansatzgröße vorlagen. Die jeweiligen Lösungen wurden vor der Synthese hergestellt und an den vorgesehenen Plätzen im Synthesizer positioniert. Während der Kupplungsreaktion wurde durch Vortexen des Syntheseblocks für eine gute Durchmischung der Suspension aus Harz und Reaktionslösung gesorgt. Nach jedem Kupplungsschritt wurden die nicht abreagierten Aminofunktionen zweimal in Folge acetyliert. Dieses wurde durch Zugabe von jeweils 1.5 mL Essigsäureanhydrid in DMF im Verhältnis 1:9 und anschließendes zehnminütiges Schütteln erreicht. Eine Waschsequenz beendete den jeweiligen Zyklus und es folgte die Abspaltung der Fmoc-Gruppe am N-Terminus der nächsten Syntheseposition. Um gegebenenfalls die Ausbeute der automatisierten Peptidsynthese manuell durch

Methylenfluoren-Monitoring (AAV 1) bestimmen zu können, wurde dann am Ende der Synthese die Fmoc-Schutzgruppe der N-terminalen Aminosäure nicht automatisiert entfernt. Die Abspaltung der Peptide vom Harz und die Entschützung der Aminosäureseitenketten wurde in einer Lösung von TFA/TIPS/H₂O im Verhältnis 95:5:2 durchgeführt.

7.4.3 Automatisierte Synthese der Peptide 1-31 und 35-41

Die Peptide **1-16**, **17-30**, **31**, **35-41** (Tabelle 10 und Tabelle 11) wurden entsprechend der Beschreibung in 7.4.2 jeweils gleichzeitig in 20 µmol Ansätzen automatisiert dargestellt. Auf eine Bestimmung des Fmoc-Wertes zur Ermittlung der Kupplungsausbeute wurde zugunsten der Einfachheit der automatisierten Entfernung der Schutzgruppe verzichtet. Die Harze der Peptide **1-16** und **17-30** wurden für den Abspaltvorgang in einen speziellen Abspalt-Reaktionsblock überführt, zweimal in Folge für je 60 min in einer Lösung aus TFA:TIPS:H₂O im Verhältnis 95:5:2 suspendiert und anschließend darin gelöst in Nalgenflaschen aufgefangen. Die TFA-haltige Lösung wurde in einer Vakuumzentrifuge entfernt und das Rohprodukt entsprechend der AAV 5 und AAV 6 weiterverwendet. Die Harze der Peptide **31**, **35-41** wurden für einen manuellen Abspaltvorgang vom Harz in Glasfritten überführt und entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV 4, AAV 5 und AAV 6 behandelt.

7.4.4 Manuell Synthese der Peptide 18, 32-34

Die Peptide **32-34** wurden nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV 1 – AAV 6 in 20 µmol Ansätzen synthetisiert und gereinigt. Um eine ausreichende Menge Substanz für die biologischen Inhibitionsassays zu erhalten, wurde die Verbindung **18** nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV 1 – AAV 6 in einem 110 µM Ansatz erneut manuell synthetisiert und gereinigt. Die Ausbeute nach HPLC betrug 95.7 mg (106 µmol), entsprechend 96% der Theorie.

Tabelle 10: Übersicht der synthetisierten RBD Peptide des SARS-CoV spike Proteins.
 (*) Ausbeuten der manuellen Synthese von Peptid 18 für die SARS-CoV Inhibitionsassays.

Peptid	Sequenz	Fragment	Molmasse [g/mol]	MALDI- TOF [M+H] ⁺	Ausbeute [mg]	Ausbeute [%]
1	NITNLSPFGEVF	N318-F329	1335.7	1336.6	2.9	11
2	NATKFPSVYAWE	N330-E341	1410.7	1411.8	3.4	12
3	RKKISNSVADYS	R342-S353	1365.7	1366.6	6.9	25
4	VLYNSTFFSTFK	V354-K365	1451.7	1352.5	2.7	9.5
5	SYGVSATKLNDL	S366-L377	1265.7	1266.4	10.6	42
6	SFSNVYADSFVV	S378-V389	1332.6	1333.3	0.5	2
7	KGDDVRQIAPGQ	K390-Q401	1281.7	1282.7	12.3	48
8	TGVIADYNYKLP	T402-P413	1351.7	1353.1	4.5	16.5
9	DDFMGSVLAWNT	D414-T425	1353.6	1355.2	5.5	20
10	RNIDATSTGNYN	R426-N437	1323.6	1324.3	3.2	12
11	YKYRYLRHGKLR	Y438-R449	1651.0	1652.4	10.5	32
12	PFERDISNVPFS	P450-S461	1405.7	1406.6	5	18
13	PDGKPSTPPALN	P462-N473	1191.6	1192.6	5.3	22.5
14	SYWPLNDYGFYT	S474-T485	1523.7	1524.5	4.4	14.5
15	TTGIGYQPYRVV	T486-V497	1351.7	1352.7	3.8	14
16	VLSFELLNAPAT	V498-T509	1272.7	1273.6	4.3	17
17	NYNYKY	N435-Y440	862.4	863.6	1.0	5.5
18	YKYRYL	Y438-L443	903.5	904.5	3.7 (95.7)*	20.5 (96)*
19	RYLRHG	R441-G446	799.5	800.6	12.1	75.5
20	RHGKLR	R444-R449	764.5	765.4	2.0	13
21	KLRPFE	K447-E452	787.5	788.4	2.4	15.5
22	ALNSYW	A471-W476	751.4	752.2	1.7	11.5
23	SYWPLN	S474-N479	777.4	778.3	4.1	26.5
24	PLNDYG	P477-G482	676.3	677.5	3.9	29
25	DYGFYT	D480-T485	763.3	764.2	4.3	21.5
26	FYTTTG	F483-G488	687.3	688.5	3.5	17.5
27	TTGIGY	T486-Y491	609.3	610.4	5.2	26
28	IGYQPY	I489-Y494	738.4	739.8	4.2	21
29	QPYRVV	Q492-V497	759.4	760.5	2.8	14
30	RVVLS	R495-S500	670.4	671.5	2.6	13

Tabelle 11: Übersicht der synthetisierten RBD Peptidanaloga.

Peptid	Sequenz	Fragment	Molmasse [g/mol]	MALDI- TOF [M+H] ⁺	Ausbeute [mg]	Ausbeute [%]
31	IGYQ-GSGS- N _Y N _Y K _Y R _Y L	I489-Q492 N435-L443	2043.9	2044.8	3.3	16.5
32	FKFRFL	Y438-L443	855.5	856.5	6.6	38.5
33	WKWRWL		972.5	973.4	9.2	47.5
34	F_fK_fR_fL		909.5	910.4	3.7	20.5
35	YKY Ci tYL		904.5	905.6	1.0	5.5
36	Bpa K _Y R Cha L		981.6	982.7	1.0	5
37	WKYRCha L		916.6	917.8	0.3	1.5
38	BpaKChaRCha L		971.6	972.6	4.2	21.5
39	WKChaRCha L		906.6	907.5	1.3	7
40	BpaKCha R _Y L		981.6	982.4	3.4	17.5
41	WKCha R _Y L		916.6	917.4	5.3	29

7.4.5 Identifizierung der Peptide mit MALDI-TOF-MS

Die synthetisierten Peptide wurden mit Hilfe der MALDI-TOF-MS direkt aus den von der HPLC eluierten Fraktionen identifiziert. Dazu wurde zunächst die Matrix (0.5 µL einer gesättigten DHB- bzw. CCA-Lösung in Acetonitril/H₂O/0.1%TFA) auf den Probenhalter getupft und gewartet, bis das Lösungsmittel verdunstet war. Anschließend wurden 0.7 µL der HPLC-Fraktion auf die Matrix getupft und zusammen mit dieser kokristallisiert und anschließend vermessen. Tabelle 10 und Tabelle 11 geben eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten RBD Peptide und Analoga des SARS-CoV *spike* Proteins.

7.5 SPR-Experimente

7.5.1 Immobilisierung des Proteins auf dem Sensorchip

Die SPR-Untersuchungen erfolgten an einem BIACORE 3000 und T100 Gerät. Dazu wurde jeweils das rekombinante humane Protein rhACE2 der Firma R&D Systems auf einem CM5-Chip immobilisiert. Als Messpuffer diente TBS (Tabelle 8), der für die Messungen am BIACORE 3000 jeweils vor Beginn der Messreihe über einen Zeitraum von 10 min in einem

Ultraschallbad unter Vakuum entgast wurde. Das T100 Gerät verfügte über die Möglichkeit einer internen Entgasung des Puffers.

Zur Entfernung des bei der Immobilisierung störenden Tris wurde das in TBS gelieferte ACE2 zunächst in PBS (Tabelle 8) umgepuffert. Sämtliche Arbeitsschritte der Umpufferung erfolgten in einem Kühlraum bei 4 °C, in dem der Puffer vorgekühlt wurde. Die ACE2 Lösung (~ 10 µL) wurde in Slide-A-Lyzer MINI Units der Firma Pierce Technology mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 3500 pipettiert und anschließend darin mit einem Schwimmer in 2 L PBS gebracht. Während der Dialyse für mindestens 12 h wurde der Puffer vorsichtig durchmischt. Für die Immobilisierung am BIACORE 3000 wurden die Flusszellen Fc1/Fc2 bzw. Fc3/Fc4 des Chips jeweils gleichzeitig über einen Zeitraum von 10 min bei einer Flussrate von 5 µL/min mit einer frisch angesetzten Lösung aus 0.05 M NHS und 0.2 M EDC (1:1) aktiviert (Befehl: Quickinject). Die Zellen Fc1 sowie Fc3 dienten jeweils als Referenz- und Fc2 sowie Fc4 als entsprechende Messzellen, in denen das Protein immobilisiert wurde. Dazu wurde das entsprechende Volumen von ACE2 in PBS mit der 1-5fachen Menge Acetat-Puffer (pH 3.5) versetzt (Verhältnis 1:1–1:5) und die Lösung über die aktivierte Messzelle geleitet. Nach Immobilisierung der gewünschten Menge an ACE2 wurden Referenz- und Messzelle erneut zusammenschaltet und verbliebene, nicht belegte Carboxymethylgruppen blockiert. Dazu wurden die Flusszellen für 10 min mit einer 1 M Ethanolamin-Lösung bei einer Flussrate von 5 µL/min durchströmt. Am BIACORE T100 wurden die Flusszellen Fc1-4 jeweils nacheinander über einen Zeitraum von 12 min bei einer Flussrate von 10 µL/min mit einer frisch angesetzten Lösung aus 0.05 M NHS und 0.2 M EDC (1:1) aktiviert (Befehl: Inject). Die Referenzzellen wurden direkt nach der Aktivierung über einen Zeitraum von 12 min bei einer Flussrate von 10 µL/min mit einer 1 M Ethanolamin-Lösung blockiert. Die Belegung der Messzellen mit Protein erfolgte unmittelbar nach der Aktivierung bei einer Flussrate von 10 µL/min mit einer Lösung aus Protein in PBS und Acetat-Puffer (pH 4) im Verhältnis 1:5. Anschließend erfolgte die Blockierung mit 1 M Ethanolamin-Lösung über einen Zeitraum von 12 min bei einer Flussrate von 10 µL/min. Die Belegung des Chips mit Protein wurde über die Differenzbildung der RU-Werte vor und nach der Immobilisierung ermittelt. Dabei entsprach die Zunahme von $\Delta RU = 1$ einer Massenzunahme von einem Pikogramm Protein.

Tabelle 12: Belegung der CM5-Chips (F_c = flow cell): die Anzahl der Bindungsstellen ergibt sich aus dem ΔRU -Wert vor und nach der Immobilisierung, der Masse von ACE2 mit 120 kDa und der Annahme, dass pro ACE2 eine Ligand-Bindungsstelle vorhanden ist, $RU_{max\ theor.}$ entspricht dem theoretisch maximal erreichbaren RU Wert, wenn alle Bindungsstellen mit einem Liganden der Masse 900 g/mol belegt sind, die Bibliotheken **B1**, **B1***, **B2**, **B3** umfassen entsprechend die Peptide (**1-16**), (**3**, **5**, **7**, **10**, **12**, **13**, **16**), (**17-30**) und (**18,31-41**), ¹ BIACORE 3000, ² BIACORE T100.

	ΔRU -Wert [\cong pg]	Bindungsstellen [fmol]	$RU_{max\ theor.}$ für M = 900 g/mol	Durchgeführte Messungen
¹ Chip1	1299 (Fc2)	11	10	<i>screening</i> B1 , Konzentrationsreihen von 11
	6530 (Fc4)	54	49	<i>screening</i> B1* , Konzentrationsreihen von 11 , 14 , 15 .
¹ Chip2	5767 (Fc2)	48	43	<i>screening</i> B2
	8933 (Fc4)	74	67	<i>screening</i> B2 Konzentrationsreihen von 11 , 14 , 15 .
¹ Chip3	12000 (Fc2)	100	90	Konzentrationsreihen von 18
	--			
² Chip4	9404 (Fc2)	78	70	<i>screening</i> B3
	13235 (Fc4)	110	100	Konzentrationsreihen von B3

7.5.2 SPR-Bindungsuntersuchungen

Für sämtliche SPR-Messungen wurden entsprechend konzentrierte Peptid-Lösungen in TBS hergestellt. Bei den Durchführungen am BIACORE 3000 wurden die Lösungen im jeweiligen Messzyklus über einen Zeitraum von 1 min bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit dem Befehl Quickinject injiziert. Am Gerät T100 wurde bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ über einen Zeitraum von 15-20 s injiziert. Nach den Injektionen wurde gewartet, bis die Basislinie wieder erreicht war. Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die jeweilige Immobilisierung der verwendeten CM5-Chips sowie über die durchgeführten Messungen. Das *screening* der Peptidbibliothek **B1** auf Chip1/Fc2 wurde – mit Ausnahme der Verbindungen **2** und **3**, die als

200 μM bzw. 300 μM Lösungen vorlagen – bei einer Peptidkonzentration von 500 μM durchgeführt. Ferner wurde eine Konzentrationsreihe der Verbindung **11** auf dieser Flusszelle untersucht. In Tabelle 13 sind sämtliche untersuchte Konzentrationsreihen der Peptide zusammengefasst. Die Peptide **3**, **5**, **7**, **10**, **12**, **13**, **15** und **16** wurden jeweils bei einer Konzentration im Bereich von 1-5 mM erneut auf Affinität gegenüber ACE2 auf Chip1/Fc4 getestet. Anschließend wurde eine konzentrationsabhängige Messreihe von **11** auf Chip1/Fc4 wiederholt sowie Konzentrationsmessungen der bindenden Peptide **14** und **15** vorgenommen. Das *screening* der Ligandbibliothek **B2** wurde auf Chip2/Fc2 mit Ligandkonzentrationen von 250 μM – 2 mM durchgeführt. Dieses wurde auf Fc4 desselben Chips bei Peptidkonzentrationen von 1 - 2 mM wiederholt sowie Konzentrationsreihen der Peptide **11**, **14**, und **15** erneut bestimmt. Die konzentrationsabhängigen SPR-Messungen von **18** wurden auf Chip2/Fc2/4, Chip3/Fc2 und Chip4/Fc3/4 durchgeführt. Die RBD Peptidanaloga **31-41** der Bibliothek **B3** wurden anhand des Chip4/Fc2/Fc4 auf eine jeweilige Affinität gegenüber ACE2 getestet. Dabei diente Ligand **18** als Referenzverbindung und wurde ebenso in einer konzentrationsabhängigen Messreihe untersucht.

Tabelle 13: Peptide und deren Konzentrationsreihen, die für die SPR-Messungen verwendet wurden.

Peptid	Konzentrationen [μM]
11	Chip1/Fc2: 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250 Chip1/Fc4: 1, 2, 16, 31, 63, 125, 250 Chip2/Fc4: 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 63, 125, 250
14	Chip1/Fc4: 8, 31, 63, 125, 250, 500 Chip2/Fc4: 10, 20, 30, 40, 80, 125, 250, 500, 1000
15	Chip1/Fc4: 41, 82, 163, 325, 650, 1300 Chip2/Fc4: 20, 40, 60, 80, 125, 250
18	Chip2/Fc2: 31, 63, 125, 250, 500, 1000 Chip2/Fc4: 10, 20, 40, 63, 125, 250, 500 Chip3/Fc2: 31, 63, 125, 250, 500, 1000 Chip4/Fc3: 5, 10, 15, 20 ¹ , 25, 30, 35 ¹ , 40 ¹ , 80, 100, 200, 250 Chip4/Fc4: 0.005, 0.5, 1, 2, 4 ¹ , 6, 8 ¹ , 10 ¹ , 12, 14, 16, 20 ¹ , 24, 28, 30, 32, 40, 48, 56, 60

Peptid	Konzentrationen [μM]
31	Chip4/Fc3: 5, 10, 15 ¹ , 30 ¹ , 40 ¹ , 63, 125, 250 Chip4/Fc4: 0.005, 0.5 ¹ , 1, 2, 4, 6 ¹ , 8, 10 ¹ , 12, 14 ¹ , 16, 20, 24, 28, 30, 32, 40, 48, 56, 60
32	Chip4/Fc3: 5, 10 ¹ , 15 ¹ , 20 ¹ , 25, 30, 35, 40, 250
33	Chip4/Fc3: 1.3, 2.5 ¹ , 5, 10 ¹ , 15 ¹ , 20, 25, 30, 35, 40, 250 Chip4/Fc4: 0.005, 0.5 ¹ , 1, 2, 4, 8 ¹ , 12, 16 ¹ , 20 ¹ , 24, 32
34	Chip4/Fc3: 5 ¹ , 10, 15 ¹ , 20 ¹ , 25, 30, 35, 40, 250
35	Chip4/Fc4: 0.2, 0.8, 1.6, 3, 6, 13, 19 ¹ , 26, 32, 38 ¹ , 45, 51 ¹ , 64, 90, 96
36	Chip4/Fc3: 5, 10 ¹ , 15 ¹ , 20 ¹ , 25, 30, 35, 40, 250 Chip4/Fc4: 0.01, 1, 2, 4 ¹ , 8, 10 ¹ , 16, 20 ¹ , 32
37	Chip4/Fc4: 0.5, 2, 4 ¹ , 8 ¹ , 16 ¹ , 32
38	Chip4/Fc4: 0.01, 1 ¹ , 2, 4 ¹ , 8, 10 ¹ , 16, 20 ¹ , 32
39	Chip4/Fc3: 1.3, 2.5, 5 ¹ , 10 ¹ , 15 ¹ , 20, 25, 30, 35, 40, 250 Chip4/Fc4: 0.005, 0.5 ¹ , 1, 2 ¹ , 4, 8 ¹ , 12, 16 ¹ , 20, 24, 32
40	Chip4/Fc3: 1.3, 2.5, 5 ¹ , 10 ¹ , 15 ¹ , 20, 25, 30, 35, 40, 250 Chip4/Fc4: 0.005, 0.5 ¹ , 1, 2, 4 ¹ , 8 ¹ , 12, 16 ¹ , 20, 24, 32
41	Chip4/Fc3: 5 ¹ , 10 ¹ , 15 ¹ , 20, 25, 30, 35, 40, 250 Chip4/Fc4: 0.005, 0.5 ¹ , 1, 2, 4 ¹ , 8, 12 ¹ , 16, 20 ¹ , 24, 32

7.6 NMR-Experimente

7.6.1 Charakterisierung der Peptide **11**, **18** und **31**

Alle NMR-Spektren wurden auf Bruker Avance DRX 500 und 700 NMR Spektrometern aufgenommen. Die Zuordnung der ¹H-chemischen Verschiebungen von **11**, **18** und **31** erfolgte mit Hilfe von 1D-¹H Experimenten, 2D-¹H,¹H TOCSY-Spektren (Pulsprogramm *mlevgpph19*) und 2D-¹H,¹H NOESY Spektren (Pulsprogramm *noesygpph19*). zusammengefasst. Die Wasserunterdrückung wurde mittels Vorsättigung des Wassersignals (Pulsprogramm *zgpr*) oder durch Anwendung der WATERGATE Pulssequenz (Pulsprogramm *w5*) erreicht. Die 2D-Spektren wurden mit 256 oder 512 Inkrementen in der F1-Dimension aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm wurden 32 Scans mit jeweils 4096 oder 8192 Datenpunkten pro Inkrement akkumuliert. Alle Spektren wurden mittels TPPI phasensensitiv aufgenommen.

Tabelle 14: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] von **11** gelöst in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.7 ppm kalibriert.

	NH	H α/α'	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
Y438	-	4.004	2.874	2.874			H δ 6.865; H δ' 6.865; H ϵ 6.667; H ϵ' 6.667
K439	8.249	4.144	1.484	1.484	1.112	1.112	H δ 1.484; H δ' 1.484; H ϵ 2.800; H ϵ' 2.800; H ζ 7.388
Y440	8.020	4.323	2.763	2.763			H δ 6.947; H δ' 6.947; H ϵ 6.657; H ϵ' 6.657
R441	8.046	4.061	1.511	1.511	1.306	1.306	H δ 2.968; H δ' 2.968; H ϵ 6.980
Y442	7.933	4.384	2.861	2.774			H δ 6.960; H δ' 6.960; H ϵ 6.661; H ϵ' 6.661
L443	7.989	4.164	1.336	1.336	1.336		H δ 0.743; H δ' 0.679
R444	8.123	4.067	1.589	1.589	1.430	1.430	H δ 3.025; H δ' 3.025; H ϵ 7.042
H445	8.445	4.575	3.162	3.033			H δ 8.468; H δ' 7.167; H ϵ 7.167; H ϵ' 8.468
G446	8.333	3.869/ 3.806					
K447	8.217	4.169	1.659	1.659	1.288	1.288	H δ 1.539; H δ' 1.539; H ϵ 2.848; H ϵ' 2.848; H ζ 7.407
L448	8.255	4.217	1.473	1.473	1.473		H δ 0.777; H δ' 0.724
R449	8.256	4.132	1.709	1.709	1.503	1.503	H δ 3.062; H δ' 3.062; H ϵ 7.070; CONH/H'7.453/7.005

Tabelle 15: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] von **11** gelöst in *d*-TBS bei pH 8. Das Spektrum wurde auf einem 700 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und auf L443 $\text{H}\delta'$ bei 0.679 ppm kalibriert.

	NH	$\text{H}\alpha/\alpha'$	$\text{H}\beta$	$\text{H}\beta'$	$\text{H}\gamma$	$\text{H}\gamma'$	Sonstige
Y438	-	3.777	2.769	2.769			$\text{H}\delta$ 6.876; $\text{H}\delta'$ 6.876; $\text{H}\epsilon$ 6.657; $\text{H}\epsilon'$ 6.657
K439	-	4.052	1.436	1.436	1.067	1.006	$\text{H}\delta$ 1.436; $\text{H}\delta'$ 1.436; $\text{H}\epsilon$ 2.777; $\text{H}\epsilon'$ 2.777
Y440	-	4.337	2.794	2.713			$\text{H}\delta$ 6.945; $\text{H}\delta'$ 6.945; $\text{H}\epsilon$ 6.657; $\text{H}\epsilon'$ 6.657
R441	-	4.025	1.486	1.486	1.276	1.276	$\text{H}\delta$ 2.953; $\text{H}\delta'$ 2.953
Y442	-	4.388	2.887	2.782			$\text{H}\delta$ 6.967; $\text{H}\delta'$ 6.967; $\text{H}\epsilon$ 6.657; $\text{H}\epsilon'$ 6.657
L443	-	4.139	1.309	1.309	1.414		$\text{H}\delta$ 0.738; $\text{H}\delta'$ 0.679
R444	-	4.062	1.591	1.532	1.381	1.333	$\text{H}\delta$ 2.998; $\text{H}\delta'$ 2.998
H445	-	4.454	3.003	2.921			$\text{H}\delta$ 7.630; $\text{H}\delta'$ 6.855; $\text{H}\epsilon$ 6.855; $\text{H}\epsilon'$ 7.630
G446	-	3.809/ 3.752					
K447	-	4.175	1.694	1.603	1.276	1.276	$\text{H}\delta$ 1.520; $\text{H}\delta'$ 1.520; $\text{H}\epsilon$ 2.838; $\text{H}\epsilon'$ 2.838
L448	-	4.195	1.442	1.442	1.498		$\text{H}\delta$ 0.769; $\text{H}\delta'$ 0.711
R449	-	4.118	1.702	1.603	1.513	1.437	$\text{H}\delta$ 3.039; $\text{H}\delta'$ 3.039

Tabelle 16: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] von **18** gelöst in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.7 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
Y438	-	4.041	2.934	2.903			H δ 6.916; H δ' 6.916; H ϵ 6.707; H ϵ' 6.707
K439	8.272	4.179	1.517	1.517	1.165	1.165	H δ 1.517; H δ' 1.517; H ϵ 2.843; H ϵ' 2.843; H ζ 7.427
Y440	8.074	4.351	2.810	2.810			H δ 7.002; H δ' 7.002; H ϵ 6.710; H ϵ' 6.710
R441	8.029	4.091	1.546	1.546	1.341	1.341	H δ 3.013; H δ' 3.013; H ϵ 7.020
Y442	8.096	4.383	2.883	2.883			H δ 7.053; H δ' 7.053; H ϵ 6.735; H ϵ' 6.735
L443	8.080	4.119	1.421	1.421	1.421		H δ 0.781; H δ' 0.700

Tabelle 17: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] von **18** gelöst in *d*-TBS bei pH 8. Das Spektrum wurde auf einem 700 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und auf L443 H δ' bei 0.7 ppm kalibriert.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
Y438	-	3.728	2.808	2.763			H δ 6.918; H δ' 6.918; H ϵ 6.695; H ϵ' 6.695
K439	-	4.077	1.476	1.476	1.068	1.068	H δ 1.476; H δ' 1.476; H ϵ 2.815; H ϵ' 2.815
Y440	-	4.359	2.830	2.773			H δ 6.988; H δ' 6.988 H ϵ 6.707; H ϵ' 6.707
R441	-	4.072	1.539	1.539	1.318	1.318	H δ 3.000; H δ' 3.000
Y442	-	4.401	2.902	2.879			H δ 7.050; H δ' 7.050 H ϵ 6.730; H ϵ' 6.730
L443	-	4.114	1.476	1.383	1.383		H δ 0.778; H δ' 0.700

Tabelle 18: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] von **31** gelöst in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3. Das Spektrum wurde auf einem 700 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.7 ppm kalibriert.

	NH	H α/α'	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
I489	-	3.733	1.786		1.345	1.074	H γ_2 0.814; H δ 0.759
G490	8.456	3.851/ 3.792					
Y491	8.208	4.373	2.822	2.799			H δ 6.946; H δ' 6.946; H ϵ 6.643; H ϵ' 6.643
Q492	8.267	4.126	1.906	1.720	2.108	2.108	H ϵ 7.292; H ϵ' 6.670
G1	7.588	3.770/ 3.738					
S1	8.173	4.301	3.758	3.691			
G2	8.419	3.884/ 3.817					
S2	8.119	4.238	3.680	3.626			
N435	8.280	4.502	2.600	2.514			H δ 7.402; H δ' 6.722
Y436	7.939	4.254	2.775	2.712			H δ 6.854; H δ' 6.854; H ϵ 6.634; H ϵ' 6.634
N437	8.060	4.433	2.585	2.479			H δ 7.379; H δ' 6.722
Y438	7.836	4.224	2.832	2.807			H δ 6.924; H δ' 6.924; H ϵ 6.654; H ϵ' 6.654
K439	7.837	3.909	1.400	1.400	0.965	0.965	H δ 1.400; H δ' 1.400; H ϵ 2.749; H ϵ' 2.749; H ζ 7.360
Y440	7.643	4.311	2.839	2.676			H δ 6.898; H δ' 6.898; H ϵ 6.649; H ϵ' 6.649
R441	7.717	4.001	1.489	1.489	1.246	1.246	H δ 2.914; H δ' 2.914; H ϵ 6.936
Y442	7.980	4.352	2.859	2.802			H δ 6.981; H δ' 6.981; H ϵ 6.679; H ϵ' 6.679
L443	7.912	4.061	1.407	1.338	1.338		H δ 0.725; H δ' 0.654; CONH/H' 6.882/6.758

Tabelle 19: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] von **31** gelöst in *d*-TBS bei pH 8. Das Spektrum wurde auf einem 700 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen und auf L443 $\text{H}\delta'$ bei 0.654 ppm kalibriert. Das Peptid zeigte in dem Puffer eine geringe Löslichkeit. Die chemischen Verschiebungen der mit * gekennzeichneten Protonen konnten in diesem Spektrum nicht eindeutig zugeordnet werden. Für die Auswertung der STD NMR-Spektren wurden bei diesen Protonen sowie bei den Protonen ohne Zuordnung die Verschiebungen aus Tabelle 18 zugrunde gelegt (n. b. = nicht bestimmbar).

	NH	H α/α'	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
I489	-	3.340	1.612		1.301	0.998	H γ_2 0.743; H δ 0.715
G490	-	n. b.					
Y491	-	n. b.	n. b.	n. b.			H δ/δ' * 6.866–7.043; H ϵ/ϵ' * 6.635–6.737
Q492	-	4.108	1.914	1.701	2.088	2.088	
G1	-	n. b.					
S1	-	4.296	3.752	3.690			
G2	-	n. b.					
S2	-	4.227	3.680	3.626			
N435	-	4.495	2.598	2.516			
Y436	-	n. b.	n. b.	n. b.			H δ/δ' * 6.866–7.043; H ϵ/ϵ' * 6.635–6.737
N437	-	4.429	2.582	2.481			
Y438	-	n. b.	n. b.	n. b.			H δ/δ' * 6.866–7.043; H ϵ/ϵ' * 6.635–6.737
K439	-	3.909	1.403	1.403	0.969	0.969	H δ 1.403; H δ' 1.403; H ϵ 2.749; H ϵ' 2.749
Y440	-	n. b.	n. b.	n. b.			H δ/δ' * 6.866–7.043; H ϵ/ϵ' * 6.635–6.737
R441	-	4.002	1.489	1.489	1.245	1.245	H δ 2.912; H δ' 2.912
Y442	-	n. b.	n. b.	n. b.			H δ/δ' * 6.866–7.043; H ϵ/ϵ' * 6.635–6.737
L443	-	4.061	1.410	1.340	1.340		H δ 0.724; H δ' 0.654

7.6.2 STD NMR mit ACE2

Umpufferung von ACE2: Für die STD NMR-Messungen wurde wie auch für die SPR-Untersuchungen das in TBS gelieferte rekombinante humane ACE2 der Firma R&D Systems verwendet. Um möglichst hohe Intensitätseinbußen durch das im Puffer enthaltene H₂O zu vermeiden, wurde das Wasser gegen D₂O ausgetauscht. Dazu wurde die ACE2 Lösung (~ 10 µL) in Slide-A-Lyzer MINI Units der Firma Pierce Technology mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 3500 pipettiert und anschließend darin mit einem Schwimmer in 20 mL *d*-TBS (Tabelle 8) gebracht. Während der Dialyse über einen Zeitraum von mindestens 20 h wurde der Puffer vorsichtig durchmischt und zweimal durch jeweils 20 mL frischen Puffer erneuert. Sämtliche Arbeitsschritte der Umpufferung erfolgten in einem Kühlraum bei 4 °C, in dem der Puffer vorgekühlt wurde.

Vorbereitung der NMR-Proben: Nach beendeter Dialyse wurde das Puffervolumen der Proteinlösung bestimmt und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Dialysegefäß wurde mit einer definierten Menge Puffer nachgespült und mit der Proteinlösung vereinigt. Zu dieser wurde dann von der Peptidstammlösung in *d*-TBS die entsprechende Menge Ligand gegeben und anschließend das Gesamtvolumen durch Zugabe von *d*-TBS auf 100 µL eingestellt. Die Protein-Ligand Lösung wurde anschließend in ein 100 µL Shigemi NMR-Röhrchen pipettiert.

Negativkontrolle: Als Negativkontrolle der STD NMR-Untersuchungen dienten Proben, die keine ACE2 sondern lediglich die entsprechende Menge Peptid gelöst in *d*-TBS enthielten.

Aufnahme der NMR-Spektren: Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte auf einem Bruker Avance 700 NMR Spektrometer. Die STD NMR Spektren wurden bei einer Temperatur von 295 K und einer spektralen Weite von 11 ppm mit insgesamt 3k Datenpunkten aufgenommen (Pulsprogramm *std.t4_3.bc*). Die selektive Sättigung erfolgte über eine Kaskade von Gausspulsen über einen Zeitraum von 4 s mit einem Einstrahlpunkt der Sättigungspulse bei - 0.5 ppm (*on-resonance*) und 40 ppm (*off-resonance*). Die Wasserunterdrückung wurde durch Anwendung der WATERGATE Pulssequenz (Pulsprogramm *w5gp.rm*) erreicht.

Auswertung der NMR-Spektren: Vor der Fourier Transformation wurden die Spektren mit einer exponentiellen Linienverbreiterung von 1 Hz multipliziert. Die Bestimmung der absoluten STD% erfolgte durch den Vergleich des STD-Spektrums mit dem durch das Pseudo-2D-Experiment zugänglichen *off-resonance* Spektrum. Letzteres kann direkt als Referenzspektrum verwendet werden, da es unter exakt den gleichen Bedingungen wie das STD-Spektrum aufgenommen wurde. Die quantitative Auswertung der STD-Spektren der Verbindungen **11**, **18** und **31** ist in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Tabelle 20: Absolute und relative (in Klammern) STD-Effekte in [%] der Verbindung **11** (Y438-R449, YKYRYLRHGKLR). Für ein Signal von mehreren gleichwertigen Protonen wurde der beobachtete STD-Effekt pro Wasserstoffatom berechnet. Die in der jeweils gleichen Farbmarkierung gezeigten Resonanzen können im STD-Spektrum nicht differenziert werden.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
Y438	-	-	20.0 (70)	20.0 (70)			H δ, δ' 18.2 = 9.1/H (32); H ϵ, ϵ' 20.8 = 10.4/H (36)
K439	-	-	15.2 = 7.6/H (26)				H δ, δ' 15.2 = 7.6/H (26); H ϵ, ϵ' 15.8 = 7.9/H (28)
Y440	-	-	20.0 (70)	20.0 (70)			H δ, δ' 20.4 = 10.2/H (36); H ϵ, ϵ' 20.8 = 10.4/H (36)
R441	-	-	11.5 = 5.8/H (20)		13.9 = 7.0/H (24)		H δ, δ' 13.0 = 6.5/H (23)
Y442	-	-	28.7 (100)	20.0 (70)			H δ, δ' 18.2 = 9.1/H (32); H ϵ, ϵ' 20.8 = 10.4/H (36)
L443	-	-	13.9 = 7.0/H (24)		15.2 (53)		H δ 14.1 = 4.7/H (16); H δ' 15.6 = 5.2/H (18)
R444	-	-	19.6 (68)	11.5 (40)	15.2 (53)	13.9 (48)	H δ, δ' 13.5 = 6.8/H (24)
H445	-	-	20.0 (70)	27.5 (96)			H δ 17.4 = 8.7/H (30); H δ' 17.4 = 8.7/H (30); H ϵ 17.4 = 8.7/H (30); H ϵ' 17.4 = 8.7/H (30)
G446	-	-					
K447	-	-	24.0 (84)	19.6 (68)	13.9 = 7.0/H (24)		H δ, δ' 11.5 = 5.8/H (20); H ϵ, ϵ' 13.8 = 6.9/H (24)
L448	-	-	15.2 = 7.6/H (26)		11.5 (40)		H δ 13.7 = 4.6/H (16); H δ' 13.5 = 4.5/H (16)
R449	-	-	24.0 (84)	19.6 (68)	11.5 (40)	15.2 (53)	H δ, δ' 14.9 = 7.5/H (26)

Tabelle 21: Absolute und relative (in Klammern) STD-Effekte in [%] der Verbindung **18** (Y438-L443, YKYRYL). Für ein Signal von mehreren gleichwertigen Protonen wurde der beobachtete STD-Effekt pro Wasserstoffatom berechnet.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
Y438	-	-	8.3 (89)	4.6 (49)			H δ , 8.95 = 4.5/H (48); H ϵ , ϵ' 11.1 = 5.6/H (60)
K439	-	-	-	-	-	-	H ϵ , ϵ' 5.3 = 2.7/H (29)
Y440	-	-	8.6 (92)	4.9 (53)			H δ , δ' 8.1 = 4.1/H (44); H ϵ , ϵ' 9.2 = 4.6/H (49)
R441	-	-	-	-	-	-	H δ , δ' 9.1 = 4.6/H (49)
Y442	-	-	9.3 (100)	7.6 (82)			H δ , δ' 7.8 = 3.9/H (42); H ϵ , ϵ' 9.75 = 4.9/H (53)
L443	-	-	-	-	-	-	H δ 7.2 = 2.4/H (26); H δ' 4.4 = 1.5/H (16)

Tabelle 22: Absolute und relative (in Klammern) STD-Effekte in [%] der Verbindung **31** (I489-Q492-Linker-N435-L443, IGYQGSGSNYNYKYRYL). Für ein Signal von mehreren gleichwertigen Protonen wurde der beobachtete STD-Effekt pro Wasserstoffatom berechnet. Die farbig markierten Resonanzen können im STD-Spektrum nicht differenziert werden.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	Sonstige
I489	-	-	-		10.2 (54)	10.2 (54)	H γ_2 5.1 = 1.7/H (9), H δ 5.1 = 1.7/H (9)
G490	-	-					
Y491	-	-	9.0 (47)	9.0 (47)			H δ ; δ' 10.9 = 5.5/H (29); H ϵ ; ϵ' 13.1 (6.6/35)
Q492	-	-	19.0 (100)	19.0 (100)	7.6 0 3.8/H (20)		-
G1	-	-					
S1	-	-	-	-			
G2	-	-					
S2	-	-	-	-			
N435	-	-	9.7 (51)	9.7 (51)			-
Y436	-	-	12.0 (63)	12.0 (63)			H δ ; δ' 11.8 = 5.9/H (31); H ϵ ; ϵ' 13.1 (6.6/35)
N437	-	-	-	-			-
Y438	-	-	9.0 (47)	9.0 (47)			H δ ; δ' 9.3 = 4.7/H (25), H ϵ ; ϵ' 13.1 = (6.6/H (35))
K439	-	-	-	-	-	-	-
Y440	-	-	9.0 (47)	10.0 (53)			H δ ; δ' 11.8 = 5.9/H (31); H ϵ ; ϵ' 13.1 = 6.6/H (35)
R441	-	-			7.6 = 3.8/H (20)		H δ ; δ' 7.0 = 3.5/H (18)
Y442	-	-	12.0 (63)	9.0 (47)			H δ ; δ' 11.8 = 5.9/H (31); H ϵ ; ϵ' 13.1 = 6.6/H (35)
L443	-	-	-	-	-		H δ 5.1 = 1.7/H (9); H δ' 5.6 = 1.9/H (10)

7.7 Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

Substanzname	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril (MeCN)	F, T	11-23/24/25	16-27-45
4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF-HCl)	nicht vollständig geprüfter Stoff		
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)	Xi	36/37/38	26-36
tert-Butylmethylether	F	11-66	16-23.2-29-33
Calciumchlorid	Xi	36	22-24
α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CCA)	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25/36/37
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	-	-	24/25
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC)	Xn	22-36/37/38-42	-
N,N-Dimethylformamid (DMF)	T	61-E20/21-36	53-45
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-36/37/39-45
Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O)	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	-
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA-Na ₂)	Xn	22	
Fmoc-Aminosäurederivate	nicht vollständig geprüfter Stoff		
Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz	nicht vollständig geprüfter Stoff		

Substanzname	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Xi	5-36/37/38	-
Kaliumchlorid	-	-	-
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natriumazid	T ⁺ , N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat	-	-	-
di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	-	-	-
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	C	34-37	26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure (TFA)	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Xi	36/38	-
Triisopropylsilan (TIPS)	Xi	10-36/37/38	26-36
Zink(II)chlorid	C	34	7/8-28.1-45

8 LITERATUR

1. Claasen, B., Axmann, M., Meinecke, R., and Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin alpha(IIb)beta3 in native platelets than in liposomes. *J Am Chem Soc* **127**, 916-9 (2005).
2. Böhm, H.-J., Klebe, G., and Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (2002).
3. Gohlke, H. and Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chem Int Edit* **41**, 2644-76 (2002).
4. Andrews, P.R., Craik, D.J., and Martin, J.L. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J Med Chem* **27**, 1648-57 (1984).
5. Böhm, H.-J. and Klebe, G. What can we learn from molecular recognition in protein-ligand complexes for the design of new drugs? *Angew Chem Int Edit* **35**, 2588-2614 (1996).
6. McDonald, I.K. and Thornton, J.M. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J Mol Biol* **238**, 777-93 (1994).
7. Hunter, C. A. Meldola lecture. The role of aromatic interactions in molecular recognition. *Chem Soc Rev* **23**, 101-9 (1994).
8. Morgan, B. P. and Bartlett, P. A. Phosphinates as transition-state analog inhibitors of thermolysin: the importance of hydrophobic and hydrogen bonding effects. *Pept Chem, Struct Biol, Proc Am Pept Symp*, 11th, 371-2 (1990).
9. Morgan, B. P. , Scholtz, J. M., Ballinger, M. D., Zipkin, I. D., and Bartlett, P. A. Differential binding energy: a detailed evaluation of the influence of hydrogen-bonding and hydrophobic groups on the inhibition of thermolysin by phosphorus-containing inhibitors. *J Am Chem Soc* **113**, 297-307 (1991).
10. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* **180**, 385-98 (1984).

11. Kreusch, A. and Schulz, G.E. Refined structure of the porin from *Rhodopseudomonas blastica*. Comparison with the porin from *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol* **243**, 891-905 (1994).
12. Weiss, M.S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E., and Schulz, G.E. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* **254**, 1627-30 (1991).
13. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K.H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* **213**, 899-929 (1990).
14. Kuhlbrandt, W., Wang, D.N., and Fujiyoshi, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-21 (1994).
15. Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**, 243-9 (1994).
16. Unwin, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* **373**, 37-43 (1995).
17. Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J., Bruinvels, A., and Hibert, M. Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *J Med Chem* **35**, 3448-62 (1992).
18. Findlay, J. and Eliopoulos, E. Three-dimensional modeling of G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 492-9 (1990).
19. Humblet, C. and Mirzadegan, T. Three-dimensional models of G-protein coupled receptors. *Annu Rep Med Chem* **27**, 291-300 (1992).
20. Cronet P, Sander C, and Vriend G. Modeling of transmembrane seven helix bundles. *Protein Eng* **6**, 59-64 (1992).
21. Kontoyianni, M. and Lybrand, T. P. Computer modeling studies of G protein coupled receptors. *Med Chem Res* **3**, 407-18 (1993).
22. Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., Bergmann, J.E., and Gaitanaris, G.A. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4903-8 (2003).
23. Pfaff, M., Tangemann, K., Muller, B., Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Timpl, R., and Engel, J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem* **269**, 20233-8 (1994).

24. Axelrod, D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* **2**, 764-74 (2001).
25. Kalb, E. and Engel, J. Binding of proteins to specific target sites in membranes measured by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochemistry* **29**, 1607-1613 (1990).
26. Cooper, M.A., Hansson, A., Lofas, S., and Williams, D.H. A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal Biochem* **277**, 196-205 (2000).
27. Cooper, M.A., Try, A.C., Carroll, J., Ellar, D.J., and Williams, D.H. Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim Biophys Acta* **1373**, 101-11 (1998).
28. Masson, L., Mazza, A., and Brousseau, R. Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. *Anal Biochem* **218**, 405-12 (1994).
29. Brandish, P.E., Hill, L.A., Zheng, W., and Scolnick, E.M. Scintillation proximity assay of inositol phosphates in cell extracts: High-throughput measurement of G-protein-coupled receptor activation. *Anal Biochem* **313**, 311-8 (2003).
30. Culliford, S.J., McCauley, P., Sutherland, A.J., McCairn, M., Sutherland, J., Blackburn, J., and Kozlowski, R.Z. A novel cell-based scintillation proximity assay for studying protein function and activity in vitro using membrane-soluble scintillants. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 857-63 (2002).
31. Martin, R.L., Renosto, F., and Segel, I.H. A simple method for calculating the dissociation constant of a receptor (or enzyme)-unlabeled ligand complex from radioligand displacement measurements. *Arch Biochem Biophys* **284**, 26-9 (1991).
32. Lund, J. Radioreceptor assay for benzodiazepines in biological fluids using a new dry and stable receptor preparation. *Scand J Clin Lab Invest* **41**, 275-280 (1981).
33. Meyer, B., Weimar, T., and Peters, T. Screening mixtures for biological activity by NMR. *Eur J Biochem* **246**, 705-9 (1997).
34. Mayer, M. and Meyer, B. Mapping the active site of angiotensin-converting enzyme by transferred NOE spectroscopy. *J Med Chem* **43**, 2093-9 (2000).
35. Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., and Farzan, M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450-4 (2003).

36. Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531-4 (1996).
37. Hajduk, P.J., Gerfin, T., Boehlen, J.M., Haberli, M., Marek, D., and Fesik, S.W. High-throughput nuclear magnetic resonance-based screening. *J Med Chem* **42**, 2315-7 (1999).
38. Chen, A. and Shapiro, M.J. NOE Pumping. 2. A High-Throughput Method To Determine Compounds with Binding Affinity to Macromolecules by NMR. *J Am Chem Soc* **122**, 414-15 (2000).
39. Chen, A. and Shapiro, M.J. NOE Pumping: A novel NMR Technique for Identification of Compounds with Binding Affinity to Macromolecules. *J Am Chem Soc* **120**, 10258-9 (1998).
40. Holmes, K.V. SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* **348**, 1948-51 (2003).
41. Siriwardena, A.H., Tian, F., Noble, S., and Prestegard, J.H. A straightforward NMR-spectroscopy-based method for rapid library screening. *Angew Chem Int Edit* **41**, 3454-7 (2002).
42. Albelda, S.M. and Buck, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **4**, 2868-80 (1990).
43. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
44. McEver, R.P., Bennett, E.M., and Martin, M.N. Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **258**, 5269-75 (1983).
45. Pidard, D., Montgomery, R.R., Bennett, J.S., and Kunicki, T.J. Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex, with intact platelets. *J Biol Chem* **258**, 12582-6 (1983).
46. Newman, P.J., Allen, R.W., Kahn, R.A., and Kunicki, T.J. Quantitation of membrane glycoprotein IIIa on intact human platelets using the monoclonal antibody, AP-3. *Blood* **65**, 227-32 (1985).
47. Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., and Jordan, R.E. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* **88**, 907-14 (1996).
48. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491-7 (1987).

49. Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., and Fitzgerald, L.A. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **71**, 831-43 (1988).
50. Tranqui, L., Andrieux, A., Hudry-Clergeon, G., Ryckewaert, J.J., Soyeux, S., Chapel, A., Ginsberg, M.H., Plow, E.F., and Marguerie, G. Differential structural requirements for fibrinogen binding to platelets and to endothelial cells. *J Cell Biol* **108**, 2519-27 (1989).
51. Foster, M.R., Hornby, E.J., Brown, S., Kitchin, J., Hann, M., and Ward, P. Improved potency and specificity of Arg-Gly-Asp (RGD) containing peptides as fibrinogen receptor blocking drugs. *Thromb Res* **72**, 231-45 (1993).
52. Marinelli, L., Lavecchia, A., Gottschalk, K.E., Novellino, E., and Kessler, H. Docking studies on alphavbeta3 integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design. *J Med Chem* **46**, 4393-404 (2003).
53. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., and Acton, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* **87**, E1-9 (2000).
54. Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* **275**, 33238-43 (2000).
55. Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., and Clark, K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme . *FEBS Lett* **532**, 107-10 (2002).
56. Komatsu, T., Suzuki, Y., Imai, J., Sugano, S., Hida, M., Tanigami, A., Muroi, S., Yamada, Y., and Hanaoka, K. Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2). *DNA Seq* **13**, 217-20 (2002).
57. Danilczyk, U., Eriksson, U., Crackower, M.A., and Penninger, J.M. A story of two ACEs. *J Mol Med* **81**, 227-34 (2003).
58. Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Koziaradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappell, M.C., Backx, P.H., Yagil, Y., and Penninger, J.M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* **417**, 822-8 (2002).

59. Towler, P., Staker, B., Prasad, S.G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Ryan, D., Fisher, M., Williams, D., Dales, N.A., Patane, M.A., and Pantoliano, M.W. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem* **279**, 17996-8007 (2004).
60. Modrow, S. and Falke, D. *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1. korrigierter Nachdruck, Heidelberg, Berlin (1998).
61. Mahy, B.W. Molecular biology of the coronaviruses. *Nature* **305**, 474-5 (1983).
62. Sturman, L.S. and Holmes, K.V. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **28**, 35-112 (1983).
63. Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H.D., and Rappuoli, R. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* **1**, 209-18 (2003).
64. Dimitrov, D.S. The secret life of ACE2 as a receptor for the SARS virus. *Cell* **115**, 652-3 (2003).
65. Tripet, B., Howard, M.W., Jobling, M., Holmes, R.K., Holmes, K.V., and Hodges, R.S. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J Biol Chem* **279**, 20836-49 (2004).
66. Spaan, W., Cavanagh, D., and Horzinek, M.C. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol* **69**, 2939-52 (1988).
67. Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A., and Rottier, P.J. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* **77**, 8801-11 (2003).
68. Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., and Doerr, H.W. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1967-76 (2003).
69. Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., and Anderson, L.J. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1953-66 (2003).

70. Marra, M.A. *et al.* The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**, 1399-404 (2003).
71. Peiris, J.S., Lai, S.T., Poon, L.L., Guan, Y., Yam, L.Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C., Chan, K.H., Tsang, D.N., Yung, R.W., Ng, T.K., and Yuen, K.Y. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**, 1319-25 (2003).
72. Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., and Bellini, W.J. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394-9 (2003).
73. Eickmann, M., Becker, S., Klenk, H.D., Doerr, H.W., Stadler, K., Censini, S., Guidotti, S., Masignani, V., Scarselli, M., Mora, M., Donati, C., Han, J.H., Song, H.C., Abrignani, S., Covacci, A., and Rappuoli, R. Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science* **302**, 1504-5 (2003).
74. Kuiken, T., Fouchier, R.A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., Laman, J.D., de Jong, T., van Doornum, G., Lim, W., Ling, A.E., Chan, P.K., Tam, J.S., Zambon, M.C., Gopal, R., Drosten, C., van der Werf, S., Escriou, N., Manuguerra, J.C., Stohr, K., Peiris, J.S., and Osterhaus, A.D. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **362**, 263-70 (2003).
75. Peiris, J.S., Yuen, K.Y., Osterhaus, A.D., and Stohr, K. The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **349**, 2431-41 (2003).
76. Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A.S., Gramatikoff, K., and Dimitrov, D.S. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1159-64 (2003).
77. Babcock, G.J., Eshaki, D.J., Thomas, W.D. Jr, and Ambrosino, D.M. Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol* **78**, 4552-60 (2004).

78. Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H., and Farzan, M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* **279**, 3197-201 (2004).
79. Li, F., Li, W., Farzan, M., and Harrison, S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **309**, 1864-8 (2005).
80. Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J.H., Moore, M.J., Luo, S., Wong, S.K., Huang, I.C., Xu, K., Vasilieva, N., Murakami, A., He, Y., Marasco, W.A., Guan, Y., Choe, H., and Farzan, M. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* **24**, 1634-43 (2005).
81. Holmes, K.V. Structural biology. Adaptation of SARS coronavirus to humans. *Science* **309**, 1822-3 (2005).
82. Qu, X.X., Hao, P., Song, X.J., Jiang, S.M., Liu, Y.X., Wang, P.G., Rao, X., Song, H.D., Wang, S.Y., Zuo, Y., Zheng, A.H., Luo, M., Wang, H.L., Deng, F., Wang, H.Z., Hu, Z.H., Ding, M.X., Zhao, G.P., and Deng, H.K. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *J Biol Chem* **280**, 29588-95 (2005).
83. Yuan, K., Yi, L., Chen, J., Qu, X., Qing, T., Rao, X., Jiang, P., Hu, J., Xiong, Z., Nie, Y., Shi, X., Wang, W., Ling, C., Yin, X., Fan, K., Lai, L., Ding, M., and Deng, H. Suppression of SARS-CoV entry by peptides corresponding to heptad regions on spike glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 746-52 (2004).
84. Sainz, B. Jr, Mossel, E.C., Gallaher, W.R., Wimley, W.C., Peters, C.J., Wilson, R.B., and Garry, R.F. Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) infectivity by peptides analogous to the viral spike protein. *Virus Res* **120**, 146-55 (2006).
85. Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.R., and Hilgenfeld, R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **300**, 1763-7 (2003).
86. Merrifield, R.B. Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* **21**, 412 (1962).
87. Carpino, L.A. and Han, G.Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. *J Org Chem* **37**, 3404-9 (1972).
88. Carpino L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* **115**, 4397-8 (1993).

89. Reid, G.E. and Simpson, R.J. Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids. *Anal Biochem* **200**, 301-9 (1992).
90. Zenobi, R. and Knochenmuss, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **17**, 337-66 (1998).
91. Glish, G.L. and Vachet, R.W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 140-50 (2003).
92. Fesik, S.W. NMR studies of molecular complexes as a tool in drug design. *J Med Chem* **34**, 2937-45 (1991).
93. Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J Chem Phys* **30**, 11-5 (1959).
94. Braunschweiler, L. and Ernst, R.R. Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J Magn Reson* **53**, 521-28 (1983).
95. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys* **71**, 4546-53 (1979).
96. Kessler, H., Gehrke, M., and Griesinger, C. Two-dimensional NMR spectroscopy, principles and survey of the experiments. *Angew Chem* **100**, 507-54 (1988).
97. Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., and Ronnberg, I. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620-7 (1991).
98. Turbadar, T. Complete absorption of light by thin metal films. *Proc Phy Soc* **73**, 40-4 (1959).
99. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Edit* **38**, 1784-88 (1999).
100. Mayer, M. and Meyer, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J Am Chem Soc* **123**, 6108-17 (2001).
101. Meyer B. and Peters T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Edit* **42**, 864-90 (2003).
102. Meinecke, R. and Meyer, B. Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin α IIb β 3. *J Med Chem* **44**, 3059-65 (2001).

103. Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M., and Meyer, B. Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J Am Chem Soc* **121**, 5336-7 (1999).
104. Drosten, C., Chiu, L.L., Panning, M., Leong, H.N., Preiser, W., Tam, J.S., Gunther, S., Kramme, S., Emmerich, P., Ng, W.L., Schmitz, H., and Koay, E.S. Evaluation of advanced reverse transcription-PCR assays and an alternative PCR target region for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Clin Microbiol* **42**, 2043-7 (2004).
105. Chen, L., Gui, C., Luo, X., Yang, Q., Gunther, S., Scandella, E., Drosten, C., Bai, D., He, X., Ludewig, B., Chen, J., Luo, H., Yang, Y., Yang, Y., Zou, J., Thiel, V., Chen, K., Shen, J., Shen, X., and Jiang, H. Cinanserin is an inhibitor of the 3C-like proteinase of severe acute respiratory syndrome coronavirus and strongly reduces virus replication in vitro. *J Virol* **79**, 7095-103 (2005).
106. Meinecke, R. STD-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Bindungsspezifität des integralen Membranproteins Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Liposomen und auf intakten Thrombozyten, Dissertation, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg (2003).
107. Claasen, B. Synthese und Charakterisierung von peptidischen Liganden des zellulären, humanen Prionproteins: Inhibition der Aggregation des Prionproteins, Dissertation, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg (2005).
108. Scherf, T. and Anglister, J. A $T_{1\rho}$ -filtered two-dimensional transferred NOE spectrum for studying antibody interactions with peptide antigens. *Biophys J* **64**, 754-761. (1993).
109. Hünnefeld, B. Analyse der Bindung von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins gp120 mit dem humanen Korezeptor CCR5, Dissertation, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg (2006).
110. Ramachandran, G.N. and Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* **23**, 283-438 (1968).
111. Hu, H., Li, L., Kao, R.Y., Kou, B., Wang, Z., Zhang, L., Zhang, H., Hao, Z., Tsui, W.H., Ni, A., Cui, L., Fan, B., Guo, F., Rao, S., Jiang, C., Li, Q., Sun, M., He, W., and Liu, G. Screening and identification of linear B-cell epitopes and entry-blocking peptide of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus using synthetic overlapping peptide library. *J Comb Chem* **7**, 648-56 (2005).

112. Ho, T.Y., Wu, S.L., Chen, J.C., Wei, Y.C., Cheng, S.E., Chang, Y.H., Liu, H.J., and Hsiang, C.Y. Design and biological activities of novel inhibitory peptides for SARS-CoV spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res* **69**, 70-6 (2006).
113. Zheng, B.J., Guan, Y., Hez, M.L., Sun, H., Du, L., Zheng, Y., Wong, K.L., Chen, H., Chen, Y., Lu, L., Tanner, J.A., Watt, R.M., Niccolai, N., Bernini, A., Spiga, O., Woo, P.C., Kung, H.F., Yuen, K.Y., and Huang, J.D. Synthetic peptides outside the spike protein heptad repeat regions as potent inhibitors of SARS-associated coronavirus. *Antivir Ther* **10**, 393-403 (2005).
114. Yi, C.E., Ba, L., Zhang, L., Ho, D.D., and Chen, Z. Single amino acid substitutions in the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein determine viral entry and immunogenicity of a major neutralizing domain. *J Virol* **79**, 11638-46 (2005).
115. He, Y., Li, J., and Jiang, S. A single amino acid substitution (R441A) in the receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein disrupts the antigenic structure and binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 106-13 (2006).
116. U.S. Food and Drug Administration (FDA) and Roche:
<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2005/021481s007lbl.pdf>.
117. Wild, C., Greenwell, T., and Matthews, T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retrov* **9**, 1051-3 (1993).
118. Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., and Matthews, T.J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9770-4 (1994).
119. Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M., and Saag, M.S. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-7 (1998).

9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

Meiner Familie, insbesondere Gesine Engels, Lenn Bo Axmann, meinen Eltern und meinem Bruder Guido für viele glückliche gemeinsame Momente.

Prof. Dr. Bernd Meyer für die Lehren über die Forschung und das Verfassen einer wissenschaftlichen Arbeit.

Robert Meinecke für die Überlassung seines Themas für das erste Projekt dieser Arbeit.

Birgit Claasen für die wertvolle Zusammenarbeit und viele anregende Gespräche und Diskussionen.

Prof. Dr. Thomas Peters und seinem Arbeitskreis für die Bereitstellung des Biacore3000 Gerätes.

Dr. Christian Drost und Susanne Pfefferle für die Durchführungen der SARS-CoV Inhibitionsassays am Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg.

Meinen Praktikanten Tim Westphal, Oliver Röhrs, Beatrice Jürs und Alexander Bär.

Dem Sonderforschungsbereich SFB470 für die finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit.

Thomas Hackl und Dennis Wilhelm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dem Arbeitskreis für jegliche Unterstützung und viele freudige Momente: Joachim Albers, Birgit Claasen, Atilâ Çoksezen, Lars Fischer, Christian Flügge, Ilona Grüneberg, Thomas Hackl, Martin Hollinger, Britta Hünnefeld, Robin Job, Kolja Klein, Boris Kröplien, Thomas Kühnemund, Mirko Lindner, Robert Meinecke, Heiko Möller, Axel Neffe, Karolina Poc, Dirk Rehders, Svenja Scheid, Winrich Scherres, So-Young Shin, Anna Struck, Jutta Tost, Katharina Wallach, Jan-C. Westermann, Dennis Wilhelm.

10 LEBENS LAUF

Marco Axmann

geboren am 18. März 1976

in Oldenburg (Niedersachsen)

ledig, ein Sohn.

Ausbildung

- seit 08.2003 *Dissertation Forschungsgruppe Prof. Dr. B. Meyer*
Institut für Organische Chemie,
Universität Hamburg
Titel: Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Wirkstoffdesign:
Ligandbindung an membranständige Proteine in lebenden Zellen und die
Identifizierung einer Leitstruktur als *entry*-Inhibitor der SARS-CoV
Infektion
- 10.1999-06.2003 *Hauptstudium Chemie*
Diplomhauptprüfung: "sehr gut"
Universität Hamburg
Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. B. Meyer
Titel: Synthese von N-Typ Glycopeptiden aus dem Glycoprotein GP120
des HIV.
- 10.1998-09.1999 *Grundstudium Chemie*
Diplomvorprüfung: "sehr gut"
Universität Hamburg
- 10.1996-09.1998 *Lehramtsstudium*
Universität Hamburg
Fächer: Mathe, Physik, Chemie
- 05.1995 *Hochschulreife am Herbartgymnasium*
Oldenburg, Niedersachsen
Note: 2.2

Anstellungsverhältnisse:

- 10.2006-01.2007 Lehrtätigkeit im Praktikum der Chemie für Medizin-Studenten,
Universität Hamburg
- 08.2003-09.2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universität Hamburg
- 07.2006 Organisation und Leitung des Kurses *Naturstoffe und Medikamente* im
Rahmen der Hochbegabtenförderung der Deutschen Schülerakademie
(DSA), Rostock
- 01.2006-04.2006 Lehrtätigkeit im Grundpraktikum der Organischen Chemie für Chemie-
Studenten, Universität Hamburg
- 05.2003-07.2003 Lehrtätigkeit im Praktikum der Chemie für Medizin-Studenten,
Universität Hamburg
- 09.2002-04.2003 Studentische EDV-Hilfskraft im Institut für Organische Chemie,
Universität Hamburg

Veröffentlichungen

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

Poster

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

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

Hamburg, im März 2007