STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

von
Moriz Mayer
aus Hamburg

Januar 2001

Universität Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1998 bis Dezember 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. P. Margaretha, durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Meyer möchte ich mich für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Anregungen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit geführt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 3
1.1 Pharmazeutisches Screening 3
1.2 Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten 4
1.3 Die Bestimmung von Bindungsepitopen 5
1.4 Die Erzeugung und Optimierung von Leitstrukturen 6
1.5 NMR-Spektroskopie in biomolekularen Systemen 9
1.6 NMR-Spektroskopie als Suchmaschine 11
1.7 Oberflächen Plasmonen Resonanz 14
1.8 Glycostrukturen in biologischen Systemen 15
1.9 Pflanzliche Lektine 17
Weizenkeim Agglutinin 18
Aleuria aurantia Agglutinin 19
Ricinus communis Agglutinin 19
2 PROBLEMSTELLUNG 21
3 THEORIE 22
3.1 Relaxation 22
3.1.1 Die T_1-Relaxationszeit 22
3.1.2 Die T_2-Relaxationszeit 23
3.2 Sättigung 24
3.3 Spin-Diffusion 25
3.4 Schneller und langsamer Austausch 25
3.5 Sättigungstransfer NMR-Spektroskopie 27
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 29
4.1 Das STD-NMR-Experiment 29
4.2 Weizenkeim Agglutinin 33
4.2.1 *N*-Acetyl-D-glucosamin 34
1D STD-Screening-Experimente 34
2D STD-Screening-Experimente 37
STD-Titrationsexperimente 39
Bestimmung des Bindungsepitops 42
STD-NMR-Experimente in H_2O 45
4.3 *Aleuria aurantia* Agglutinin 48
4.3.1 Methyl-α-L-fucosid 48
1D STD-Screening-Experimente 48
2D STD-Screening-Experimente 50
STD-Titrationsexperimente 55
STD-Sättigungszeitexperimente 58
Bestimmung des Bindungsepitops 59
Einfluss der Bindung auf die chemische Verschiebung 60
4.3.2 2´-α-L-Fucosyl-D-lactose 61
Bestimmung des Bindungsepitops 62
4.3.3 Le^b-Hexasaccharid 66
Bestimmung des Bindungsepitops 66

4.4 *Ricinus communis* Agglutinin 69
4.4.1 Der RCA_{120}-Rezeptor 69
4.4.2 Methyl-α-D-galactosid 71
Bestimmung des Bindungsepitops 71
STD-Titrationsexperimente 74
4.4.3 Methyl-β-D-galactosid 76
Bestimmung des Bindungsepitops 76
STD-Titrationsexperimente 81
STD-Sättigungszeitexperimente 83
Einfluss des Ligandenüberschusses auf die Bestimmung der Bindungsepitope 87
STD-Kompetitionsexperimente 88
SPR-Analyse 92
4.4.4 *N*-Acetyl-D-lactosamin 93
Bestimmung des Bindungsepitops 93
STD-Titrationsexperiment 96
SPR-Analyse 97
4.4.5 Asialo-Komplex-Typ Biantennäres Decasaccharid NA_2 98
Bestimmung des Bindungsepitops 98
STD-Titrationsexperimente 106
STD-Kompetitionsexperimente 107
SPR-Analyse 110
4.4.6 Diskussion der STD-NMR Ergebnisse der vier Saccharide 113
4.5 STD-NMR im Vergleich zu anderen NMR-Bindungsstudien 115
4.6 Folgen für die Entwicklung neuer Inhibitoren 117
5 ZUSAMMENFASSUNG 119
6 SUMMARY 122
7 EXPERIMENTELLER TEIL 125
7.1 Vorbereitung der Proteinproben 125
7.2 NMR-Experimente 126
7.3 1D ^{1}H-NMR- und ^{1}H-STD-NMR-Experimente 126
7.4 2D STD-NMR-Experimente 128
7.4.1 STD-TOCSY-Experiment 128
7.4.2 STD-HSQC-Experiment 129
7.5 Oberflächen Plasmonen Resonanz 129
7.6 Sicherheitshinweise 130
7.7 Anhang: Pulsprogramme 130
stdsp und stdslsp 130
std19sp und std19slsp 131
stdmlev2f 133
std19mlev2f 135
stdinvietgssi2f 138
8 LITERATUR 141

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	1-, 2-dimensional
AAA	*Aleuria aurantia* Agglutinin
ADME	*absorption, distribution, metabolism, excretion*
clogP	*calculated* Octanol / Wasser-Verteilungskoeffizient
COSY	*correlation spectroscopy*
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
FucOMe	Methyl-L-fucosid
GalOMe	Methyl-D-galactosid
Glc	D-Glucose
GlcNAc	*N*-Acetyl-D-glucosamin
HSQC	*heteronuclear single quantum correlation*
HTS	*high throughput screening*
IC_{50}	Inhibitorkonzentration, die zu 50% verminderter Aktivität führt
K_D	Dissoziationskonstante
K_I	Inhibitionskonstante
k_{off}	Dissoziationsrate
k_{on}	Assoziationsrate
k_{sat}	Sättigungsrate
LacNAc	*N*-Acetyl-D-lactosamin
Man	D-Mannose
MW	Molekulargewicht
NA_2	Asialo-Komplex-Typ biantennäres Decasaccharid
NMR	*nuclear magnetic resonance*
NOESY	*nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy*
ppm	*parts per million*
RCA_{120}	*Ricinus communis* Agglutinin
RIA	*radio immuno assay*
SAR	*structure activity relationship*
SLe^x	Sialyl-Lewis^x
SPR	*surface plasmon resonance*

STD	*saturation transfer difference*
T_1, T_2	Longitudinale-, transversale Relaxationszeit
TOCSY	*total correlated spectroscopy*
TPPI	*time proportional phase increment*
*Tr*NOE	*transferred nuclear Overhauser effect*
TROSY	*transverse relaxation optimized spectroscopy*
WATERGATE	*water suppression by gradient tailored excitation*
WGA	*Wheat germ agglutinin*, Weizenkeim Agglutinin
γ	Gyromagnetisches Verhältnis
ρ	Direkte dipolare Relaxationsrate
τ_b	Aufenthaltsdauer im gebundenem Zustand
σ	Kreuzrelaxationsrate

1 Einleitung

1.1 Pharmazeutisches Screening

Die pharmazeutische Industrie benötigt zur Entdeckung von neuartigen Substanzen mit spezifischer biologischer Aktivität verlässliche Assays. Die Testung von Einzelsubstanzen oder Mischungen bezüglich ihrer Affinität erfolgt in der Industrie meist mit Hochdurchsatz-Screening-Methoden (HTS). Diese können mittlerweile bis zu 100000 Substanzen am Tag und mehr untersuchen (*1*). Die am häufigsten verwendeten Tests sind die Fluoreszenz-basierten Assays auf der einen Seite und die immunologisch-basierten andererseits. Letztere verwenden die hochspezifischen Antikörper-Antigen Bindung zur Detektion (*2-4*). Ein Problem solcher Tests ist, dass der Schwellenwert für die Detektion eines bindenden Moleküls – ein sogenannter Hit – eine etwa mikromolare Dissoziationskonstante voraussetzt. Niedrigaffine Substanzen können somit nur schwer entdeckt werden. Besonders in den frühen Screening-Phasen sind diese niedrigaffinen Substanzen jedoch von grossem Interesse. Dies liegt daran, dass es teilweise Proteine gibt, für die nicht direkt hochaffine Liganden gefunden werden können. Zudem wird trotz des hoch angelegten Schwellenwertes ein gewisser Prozentsatz an sogenannten *false positives* erhalten, d.h. Hits, die keine sind. Die Weiterverfolgung dieser nicht-bindenden Substanzen ist ineffektiv; sie kann die weitere Forschung in eine völlig falsche Richtung lenken.

Ein weiterer Nachteil der HTS-Methoden ist, dass sich die Zielproteine – die sogenannten Targets – zum Teil nicht mit einfachen Assays testen lassen. Die Entwicklung eines neuen HTS-Assays benötigt inklusive der Validierungsphase mittlerweile etwa ein halbes Jahr. Ferner sind viele der interessanten Targets membranständige oder transmembrane Proteine und dadurch mit HTS-Methoden nicht ohne weiteres zugänglich. Es besteht folglich ein grosser Bedarf an der Entwicklung und Optimierung neuer Testmethoden, mit denen auch schwer untersuchbaren Proteine analysiert werden können.

1.2 Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Häufig wird die Bindungsaffinität eines Rezeptors gegenüber einem Liganden über die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K_D definiert:

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

wobei [P] und [L] für die Konzentration des Proteins, respektive des Liganden steht und [PL] die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes repräsentiert. Die Einheit dieser Dissoziationskonstante ist in Mol/L definiert, und je niedriger der K_D-Wert liegt, desto höher ist die Affinität des Rezeptors für den Liganden. Der K_D-Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, die nötig ist, um die Hälfte der Bindungsplätze des Rezeptors zu belegen. Das bedeutet für potentielle pharmazeutische Wirkstoffe – soweit sie als Inhibitoren einer bestimmten Wirkung agieren sollen, dass der K_D-Wert möglichst klein sein sollte, um mit niedrigen Dosierungen auskommen zu können.

Die Dissoziationskonstante kann auch über die Kinetik der Assoziation und der Dissoziation des Liganden definiert werden:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_{off} steht dabei für die Dissoziationsrate und k_{on} für die Assoziationsrate. Für eine diffusionskontrollierte Assoziationsrate, die bei kleinen Molekülen üblicherweise in einem Bereich von $10^7 - 10^8$ s^{-1} M^{-1} liegt, kann bei einem bekannten K_D-Wert die Dissoziationsrate bestimmt werden. Beispielsweise entspricht ein K_D-Wert von 10^{-7} M unter diesen Bedingungen einem k_{off}-Wert im Bereich von 1 - 10 s^{-1}.

Hier soll konkreter auf die Möglichkeiten zur Bestimmung der Dissoziationskonstante eingegangen werden. Viele Methoden zur Messung von Aktivität (Assays) sind Kompetitionsexperimente, d.h. es werden IC_{50}-Werte gegenüber einem bekannten Binder bestimmt. Der IC_{50}-Wert beschreibt die Konzentration eines kompetitiv wirkenden Inhibitors, bei der 50% eines spezifisch bindenden Liganden verdrängt werden. Die IC_{50}-Werte sind zusätzlich zur Affinität des Inhibitors auch abhängig von der Affinität und Konzentration des bekannten Binders. Aus dem IC_{50}-Wert lässt sich dann auch der K_D-Wert berechnen (*5*). Häufig verwendete Methoden sind der ELISA-Assay, Hämagglutinations-Assays, Fluoreszenz-Assays sowie *Radioimmuno*-Assays (RIA). In den letzten Jahren ist auch vermehrt Oberflächen-

Plasmonen-Resonanz (SPR) eingesetzt worden, da so zusätzlich die Kinetik der Interaktionen bestimmt werden kann (siehe auch Abschnitt 1.7).

Die Vergleichbarkeit der K_D-Werte, die aus verschiedenen Methoden erhalten wurden, ist oftmals schlecht. Unterschiede in der Konzentration, der Reinheit und Aktivität der Proteine oder Inhibitoren – sowie der Temperatur oder dem pH-Wert können einen erheblichen Einfluss haben. Selbst bei einer Verwendung der gleichen Methode kann es zu bedeutenden Unterschieden kommen. Beispielsweise ist der K_D-Wert eines Protein-Ligand-Komplexes bei SPR-Untersuchungen sehr stark davon abhängig, welchen der beiden Partner man immobilisiert. Die Immobilisierung des niedermolekularen Partners kann dabei zu bis um den Faktor 10000 höhere Affinitäten liefern, als wenn der makromolekulare Rezeptor immobilisiert wird (*6*). Desweiteren sind K_D-Werte von den jeweiligen Methode nur über einen bestimmten Affinitätsbereich akkurat bestimmbar. Keine Methode ist über einen Bereich von mehr als sechs Zehnerpotenzen genau.

1.3 Die Bestimmung von Bindungsepitopen

Bei Protein-Protein-Interaktionen wird der Kontakt meist durch eine begrenzte Anzahl an Aminosäuren hergestellt. Diese Kontaktfläche oder -region wird als Bindungsepitop bezeichnet. Die Anzahl der Aminosäuren, die eine solche Region ausmachen, variiert dabei zwischen 7 und etwa 30. Erschwert wird die Bestimmung des Epitops dadurch, dass die Aminosäuren, die das Epitop ausmachen, sich oftmals auf unterschiedlichen Domänen des Proteins befinden, das Epitop also diskontinuierlich ist. Einfacher ist die Bestimmung, wenn das bindende Epitop linear ist – also aus einem kontinuierlichen Aminosäurestrang besteht. Hier kann über kombinatorische Peptidbibliotheken schnell ein Ergebnis erreicht werden. Wenn auch zu bedenken ist, dass die für einen spezifischen Kontakt nötige 3D-Struktur häufig von solch kleinen, flexiblen Peptiden nicht erzeugt werden kann.

Eine andere Möglichkeit sind die Phagen-Display Bibliotheken. Diese Bibliotheken bestehen aus mehreren Millionen Phagen, die jeweils spezifische Peptide auf ihren Hüllen präsentieren. Über mehrere Selektionsprozesse gegenüber einem Rezeptor werden so Phagen angereichert, die die gesuchte Peptidsequenz tragen. Durch anschliessendes Sequenzieren der Phagen-DNA, kann die Peptid-sequenz bestimmt werden (*7-9*).

Bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen handelt es sich oft um kleinere Moleküle, wie Hormone oder Substrate, die vom entsprechenden Rezeptor erkannt werden. Ist keine Röntgenstruktur eines kokristallisierten Liganden in der Bindungstasche vorhanden, kann selbst die Aufklärung des kleinen Epitops des Liganden komplex sein. Anhand der Bestimmung von Bindungsepitopen von Peptiden kann die Vorgehensweise erläutert werden. Mit einem Alanin-Scan können für ein bindendes Peptid, die für die Bindung entscheidenden Gruppen identifiziert werden. Bei dieser Methode werden die einzelnen Aminosäuren auf einer Position jeweils durch ein Alanin ersetzt und anschliessend der Einfluss dieser Modifikation auf die Affinität gemessen. Hierdurch werden Informationen über die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren an den jeweiligen Positionen erhalten (*10*, *11*).

Anschliessend kann die Bestimmung des Minimalepitops erfolgen, indem Schritt für Schritt das Peptid verkürzt wird. Weitere Modifikationen können dann über den Austausch von Seitenketten, funktionellen Gruppen oder der Rigidifizierung des Peptids erreicht werden. Dadurch erhält man nach und nach nicht nur Details über die Bedeutung einzelner Aminosäuren, sondern auch über den Einfluss einzelner Gruppen sowie der strukturellen Beschaffenheit, die der Ligand aufweisen muss. Für Peptide sind die synthetischen Bedingungen für diese Analysen zumindest annähernd erfüllt. Viele Liganden, wie z. B. Saccharide, entziehen sich jedoch einem solch automatisierbaren und rationalen Ansatz.

Die Bestimmung der Epitope bei anderen Substanzen, die als Inhibitoren wirken sollen, verläuft im Normalfall nach einem analogen Verfahren. Es müssen die entscheidenden funktionellen Gruppen identifiziert werden, das Minimalepitop muss bestimmt werden und der Wirkstoff sollte möglichst wenig flexibel sein und in seiner bioaktiven 3D-Struktur vorliegen. Um den synthetischen und analytischen Aufwand zur Charakterisierung von Bindungsepitopen auch synthetisch schwer zugänglichen Substanzen zu minimieren, sind neue Methoden nötig, die es erlauben einige der zeitaufwendigen Schritte zu überspringen, um so schneller zum Ziel zu gelangen.

1.4 Die Erzeugung und Optimierung von Leitstrukturen

Eine zentrale Herausforderung in der heutigen pharmazeutischen Industrie ist es, aus den verschiedenen Hits der Screening-Methoden, eine geeignete Leitstruktur zu ermitteln. Die heute hauptsächlich verwendeten Hochdurchsatz-Screening-

Methoden (HTS) liefern zwar meist sehr schnell einen Hit, jedoch sind diese Substanzen meist noch sehr weit davon entfernt eine gute Leitstruktur oder gar ein guter Wirkstoff zu sein (*12*).

Zur Zeit scheinen sich die früher als konkurrierend geltenden Ansätze der kombinatorischen Chemie in Verbindung mit HTS auf der einen Seite – und des rationalen Drug Designs andererseits, gut zu einem Hybridansatz kombinieren zu lassen. Die oben genannten Ansätze haben unterschiedliche Schwerpunkte. Die kombinatorische Chemie mit anschliessendem HT-Screening wird meist auf Diversität ausgelegt. Sie beruht darauf Bibliotheken aus möglichst vielen verschiedenartigen Substanzen herzustellen, um so über die schiere Anzahl an Molekülen einen guten Binder zu finden. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass trotz der vielen über Kombinatorik hergestellten Moleküle, oft dennoch die Diversität der Moleküle ungenügend ist, um einen geeigneten Hit zu finden. Beim rein rationalen Ansatz dagegen, soll anhand der 3D-Struktur der Bindungsstelle gezielt ein perfekt passendes Molekül mit hoher Affinität berechnet werden. Keiner der beiden Ansätze führte bislang direkt zu einem Wirkstoff. Daher ist man dazu übergegangen fokussierte Bibliotheken aus einer möglichst niedrigen Anzahl an Substanzen zu testen *(13-17)*.

Bei diesem fokussierten Screening werden hauptsächlich Substanzen geprüft, in die schon vorab viele Daten über die Bindungsdomäne des Targets geflossen sind *(18, 19)*. So kann ein vernünftiger Startpunkt für die meist langwierige Wirkstoff-entwicklung gewählt werden (*20*). Diese Vorinformationen können vielerlei Ursprung haben. Beispielsweise kann durch ein virtuelles Screening von 3D-Datenbanken bekannter Binder im Mittel schon eine Verbesserung der Hit-Rate um einen Faktor 10-100 gegenüber dem Zufalls-Screening erreicht werden. Ein entscheidender Faktor an dieser Stelle ist die starke Abhängigkeit von der Qualität der vorhandenen Vorinformationen über das Target – oder der eventuell vorhandenen bekannten Binder. Diese beiden letzteren Ansätze wiederum werden Protein-basiertes und Liganden-basiertes Drug Design genannt (*21*).

Man ist jedoch noch weit davon entfernt, aus einer Röntgenstruktur des Proteins direkt nur die potentiell besten Binder generieren zu können. Die jetzigen computergestützen Verfahren zur Generierung von unbekannten, neuartigen Wirkstoffen erzeugen virtuelle Bibliotheken, die sich in einem Grössen-ordnungsbereich von einigen hundert bis tausend Substanzen befinden. Dieser

Ansatz ist im Endeffekt oft effizienter, als das wahllose Screening von hunderttausenden verschiedener Substanzen. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich mit kleinen Bibliotheken aufwendigere Assays durchführen lassen. Man befindet sich hier im sogenannten *low throughput* Screening Bereich, in dem Assays mit höherem Informationsgehalt durchgeführt werden können.

Oft ist es schon die Wahl des Assays, also der Testmethode, die einen bestimmten Weg vorschreibt. Ein einzelnes Test-Verfahren wird oft nicht ausreichen, um ein System vollständig zu beschreiben. D. Hill bemerkte hierzu, dass die Qualität der während der frühen Screening-Phasen gesammelten Daten entscheidend für den Erfolg einer Leitstruktur sein können *(1)*. Folglich sind im frühen Stadium der Leitstruktursuche die schwach bindenden Moleküle mit millimolaren Dissoziations-konstanten interessant. Aus diesem Grund ist es essentiell, ein Verfahren zu verwenden, das auch diese schwachen Inhibitoren entdecken kann (*22)*.

Hat man einen Erfolg versprechenden Kandidaten als Leitstruktur gefunden, ist der Weg in die ersten klinischen Phasen noch lang. Denn neben einer möglichst hohen Bindungsaffinität zählen hier die Verteilung der Substanz in lipo- und hydrophilem Milieu, die Modifizierbarkeit und die Möglichkeiten zum sogenannten Upscaling, also die Möglichkeit den Wirkstoff in einem technischen Maßstab herzustellen. Die synthetische oder enzymatische Modifizierbarkeit der Leitstruktur ist eine Grundvoraussetzung, da nur so die Spezifität erhöht, bzw. die Bioverfügbarkeit angepasst werden kann – und somit mögliche Nebenwirkungen vermieden werden können. Moleküle, die zwar sehr gut am Target wirken, jedoch entweder nicht zu diesem gelangen können oder auf dem Weg dorthin metabolisiert werden sind nutzlos. Im Gegenteil, sie belasten den Körper zusätzlich. Diese Faktoren werden unter dem Überbegriff Pharmakokinetik zusammengefasst. Hier ist das Akronym ADME zu nennen. Es steht für ***a****bsorption*, ***d****istribution*, ***m****etabolism*, ***e****xcretion*, also der Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung des Wirkstoffs. Diese Faktoren beeinflussen die Bioverfügbarkeit – also die Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort. Sie sind daher neben der *in vitro* Affinität des Inhibitors immens wichtig (*21*).

Für potentielle Wirkstoffe die oral verabreicht werden sollen, ist in der pharmazeutischen Industrie oftmals vorgeschrieben, die sogenannte *rule of five* einzuhalten: Die Molmasse sollte den Wert von ca. 500 Da nicht überschreiten, die Anzahl an Sauerstoff- und Stickstoff-Atomen, also an Wasserstoff-Akzeptoren, sollte

nicht grösser sein als 10 und der clogP-Wert, der als Anhaltspunkt für die Verteilung im hydro- bzw. lipophilem Milieu dient, sollte kleiner als 5 sein. Auch die Gesamtzahl an Wasserstoff-Donoren sollte möglichst unter 5 gehalten werden.

Entscheidende Bedeutung bei der Optimierung von Leitstrukturen haben solche Informationen, die einem Anhaltspunkte darüber geben, welche Gruppen essentiell für die Bindung am Target sind. Die so ermittelten Gruppen sollten folglich möglichst wenig modifiziert werden, um eine Beeinträchtigung der Affinität zu vermeiden. Aus diesem Grund sind Verfahren, die diese Daten liefern können in der frühen Entwicklungsphase wichtig. Nicht direkt an der Bindung beteiligte Ligandengruppen können dann selektiv modifiziert oder entfernt werden. Normalerweise werden diese Daten aus der chemischen Modifizierung und anschliessenden Testung des Einflusses dieser Modifizierung auf die Bindungsaffinität der Moleküle bestimmt. Dies erfordert zusätzliche Synthese-, Reinigungs- und Analyse-Schritte, die mit erheblichem Zeitaufwand verbunden sind. Die Bestimmung des Bindungsepitops des Liganden ist daher ein zentraler Punkt einer jeden Wirkstoff-Optimierung. Das Ergebnis wäre eine gerichtete Synthese von Liganden mit verbesserten Bindungseigenschaften. Der Wunsch ist es ganz zu einem rationalem Wirkstoffdesign zu gelangen, und so einen unnötigen Ressourcenverbrauch zu vermeiden.

1.5 NMR-Spektroskopie in biomolekularen Systemen

Die NMR-Spektroskopie ist eines der wichtigsten Hilfsmittel für die Identifizierung und Konformationsanalyse von Biomolekülen. Substanzen können in Lösung und dadurch unter annähernd physiologischen Bedingungen untersucht werden. In der Arzneimittelforschung hat sich daher die NMR-Spektroskopie zu einem unverzichtbaren Hilfsmittel entwickelt. Sie wird zwar weiterhin hauptsächlich zur Identitäts- und Produktkontrolle eingesetzt, hat aber auch Einzug in den Screening- und Optimierungsprozess gefunden (siehe auch Kapitel 1.6).

Eine Vielzahl neuer Methoden haben das Aufgabenfeld der NMR-Spektroskopiker erweitert. Beispielsweise treiben höhere Feldstärken und neue Akquisitions-Methoden die Grenzen für die Strukturaufklärung von Proteinen hin zu immer grösseren und komplexeren Systemen. Weiterhin dienen NOE-Experimente und solche, die eine Bestimmung der ^{3}J-Kopplungskonstanten ermöglichen, als wichtigste Lieferanten strukturrelevanter Daten. Das erste

Experiment ermöglicht die Bestimmung von Protonenabständen über den Raum, bis zu einem Abstand von ca. 5 Å während letzteres die Ermittlung von Diederwinkeln in gekoppelten Systemen erlaubt. Es handelt sich folglich um eine Untersuchung der Nahordnung des Moleküls. Jedoch haben sich in letzter Zeit auch Fernstruktur-Untersuchungen etabliert. Beispielsweise lässt sich über die residuale dipolare Kopplung in an Bizellen partiell ausgerichteten Molekülen gut die Fernstruktur einzelner Proteindomänen gegenüber einem festen Bezugspunkt bestimmen. Mit Spin-Labeln, die eine erhöhte Relaxationsrate der mit ihnen wechselwirkenden Bereichen bewirkt, werden vermehrt Topologie-Untersuchungen durchgeführt. Über sogenannte Shift-Reagenzien, die aus einem komplexierten Schwermetall-Zentrum bestehen, können ebenfalls Fernstruktur-Daten gewonnen werden (*23*, *24*).

Insofern hat sich die NMR-Spektroskopie – neben der Röntgenstruktur-analyse – als strukturaufklärende Methode für kleinere Proteine oder Protein-fragmente mittlerweile etabliert. Die NMR-Spektroskopie kann selbst dann noch Ergebnisse liefern, wenn sich die Proteine der Kristallisation entziehen, was häufig bei glycosylierten Proteinen der Fall ist. Zudem ist bei Röntgenstrukturen der Kohlenhydratrest von Glycoproteinen aufgrund seiner hohen Flexibilität oft nicht – oder nur ungenügend – aufgelöst. Gegebenenfalls lässt sich zudem nur eine Konformation analysieren, d.h. jegliche Information über die Dynamik geht verloren (*25*). NMR-spektroskopische Untersuchungen der Flexibilität einzelner Moleküldomänen haben daher zunehmend an Bedeutung gewonnen. Beispielsweise konnten Proteine im partiell entfalteten Zustand untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Stabilität einzelner Domänen deutlich verschieden sein kann. Manche dieser partiell gefalteten, flexiblen Bereiche sind "voreingenommen" und haben dadurch eine Neigung für eine bestimmte Faltung. Diese Faltung kann sich sehr schnell durch einen äusseren Einfluss, wie beispielsweise einer Interaktion mit einem Bindungspartner, ausbilden.

Ein weiterer Durchbruch in Richtung Strukturaufklärung von Proteinen mit Molmassen bis zu über 100 kDa ist das TROSY (*transverse relaxation optimized spectroscopy*)-Experiment (*26*). In diesem Experiment kompensieren sich bei hohen Feldstärken (> 750 MHz) die beiden Terme, die hauptverantwortlich für die breiten Linien in Makromolekülen sind. Bei einem HSQC bewirkt dies beispielsweise, dass sich bei hohen Feldstärken drei breite Komponenten des ^{1}H-^{15}N-Multipletts über einen speziellen Phasenzyklus auslöschen lassen und nur die schärfste Komponente

erhalten bleibt. Man kann daher auch bei sehr grossen Molekülen noch die nötige spektrale Auflösung erreichen.

1.6 NMR-Spektroskopie als Suchmaschine

Die Verwendung der NMR-Spektroskopie als Screening-Methode hat in den letzten fünf Jahren auch in der pharmazeutischen Industrie an Bedeutung gewonnen (*27*). Die gerätetechnische Entwicklung neuer Hochfeldmagnete mit bis zu 900 MHz – sowie die Einführung des Cryo-Probenkopfes werden hier in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein. Die Empfindlichkeit der Geräte verbessert sich dabei durch den Einsatz eines Cryo-Probenkopfes um einen Faktor 3 - 4. Schon jetzt ist es möglich, Mengen im Nanogramm Bereich mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Neben dieser rein technischen Weiterentwicklung gibt es jedoch auch bedeutende Fortschritte im Bereich neuer NMR-Experimente.

Weiterhin haben es NMR-basierte Screening-Methoden, die einzig darauf zielen eine Affinität nachzuweisen, in Konkurrenz zu den heute üblichen HTS-Verfahren schwer, da diese ungleich schneller sind. Verfahren, die zusätzliche Informationen liefern können, wie Transfer-NOE *(28, 29)* und (*structure activity relationship* by NMR) SAR by NMR *(30-32)* besitzen aber entscheidende Vorteile. Meyer *et al.* verwendeten die Tatsache, dass kleine Moleküle, die reversibel an einen makromolekularen Rezeptor binden, einen Vorzeichenwechsel der NOEs erfahren *(28, 33, 34)*. Diese sogenannten Transfer-NOEs geben dann nicht nur Auskunft, ob die Substanz bindungsaktiv ist, sondern sie können unter geeigneten Bedingungen sogar die 3D-Struktur des Liganden im gebundenen Zustand liefern (*35*). Die weiter unten beschriebene SAR by NMR Methode kann dazu genutzt werden, nebeneinander liegende Bindungsstellen am Protein zu lokalisieren. Dies sind Möglichkeiten, die einem mit einer reinen HTS-Strategie verborgen bleiben. Zudem erlaubt die Transfer-NOE Methode im Normalfall eine direkte Identifikation der bindenden Komponente aus der Mischung. Auch die Tatsache, dass es sich um eine zerstörungsfreie Meßmethode handelt ist von Vorteil, da die untersuchten Substanzen normalerweise problemlos zurückgewonnen werden können. Besonders bei schwer darstellbaren Liganden und wertvollen Proteinen ist dies von Bedeutung.

Eine weitere, positive Eigenschaft der Transfer-NOE Methode ist, dass im Gegensatz zur SAR by NMR Methode keine Größenbegrenzung des Proteins nach oben besteht – es ist sogar von Vorteil einen großen Rezeptor einzusetzen. Zudem

entfällt die Isotopenmarkierung des Proteins, man ist daher unabhängig von einem effizienten Expressions-System. Nachteil ist hier, dass bestimmte Ligand-Protein-Verhältnisse eingehalten werden müssen. Ein zu hoher oder geringer Überschuss des Liganden verhindert, dass die Transfer-NOEs beobachtbare Signale liefern. Somit können bindende Moleküle übersehen werden. Auch eine zu hohe Anzahl an verschiedenen Komponenten kann die Detektion der Bindung wegen einer starken Überlappung der Resonanzen verhindern. Zudem muss während der Mischzeit signifikanter Austausch zwischen freien und gebundenen Zustand erfolgen. Dadurch darf die Bindung nicht zu stark sein. Transfer-NOE-Spektren sind im allgemeinen auf Dissoziationskonstanten zwischen $10^{-3} – 10^{-7}$ M beschränkt.

Ebenfalls auf NOE-Effekte beruhen die folgenden Methoden: Das WATERlogsy-Experiment, zur Detektion von Bindung, basiert auf der Unterscheidung des Vorzeichens des NOEs von freiem Wasser auf kleine Moleküle (positiv) und von gebundenem Wasser auf kleine Moleküle (negativ) *(36, 37)*. Bindende und nicht-bindende Moleküle haben somit im NMR-Spektrum unterschiedliche Vorzeichen und können so unterschieden werden. Das *reverse* NOE-*pumping* Experiment hingegen überträgt Magnetisierung von bindenden Molekülen auf den makromolekularen Rezeptor. Es handelt sich hierbei um ein Differenzexperiment; bei einem der Experimente wird ein Relaxationsfilter verwendet, so dass die Proteinmagnetisierung wieder im Gleichgewicht ist und daher Magnetisierung vom Liganden auf den Rezeptor übertragen werden kann. Durch Subtraktion von einem Referenzexperiment werden die bindenden Komponenten sichtbar *(38)*.

Die Arbeiten von Fesik *et al.* haben ebenfalls einen grossen Zuspruch in der pharmazeutischen Industrie gefunden. Die SAR by NMR Methode basiert auf der Beobachtung von Unterschieden in der ^{15}N-chemischen Verschiebungen des Proteins bei Komplexierung mit Liganden – wodurch Bindung detektiert werden kann (*30*). Bei vorheriger Interpretation der verwendeten 2D ^{1}H-^{15}N HSQC-NMR-Spektren des Proteins lässt sich zudem die Bindungsdomäne des Rezeptor-Proteins ermitteln. Mit dieser Methode besteht weiterhin die Möglichkeit unter Sättigungsbedingungen der ersten Bindungsstelle, eine zweite, benachbarte Bindungsstelle zu lokalisieren. Aus dieser Information lässt sich unter Umständen aus zwei niedrigaffinen Liganden ein verknüpfter Ligand herstellen, der eine signifikant verbesserte Bindungsaffinität besitzt. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist, dass ^{15}N-isotopenmarkierte

Proteine oder Proteinfragmente bis zu einer Grösse von ca. 30 kDa verwendet werden können. Durch den Einsatz von TROSY-Spektren wird gegenwärtig diese Grenze hin zu grösseren Proteinen verschoben. Es muss zudem ein sehr effizientes Expressions-System vorliegen, da vergleichsweise große Mengen an Protein nötig sind. Als weitere Einschränkung gilt hier, dass membranständige Proteine nicht untersucht werden können.

Jüngst wurde eine weitere Methode vorgestellt, eine zweite Bindungsstelle zu lokalisieren. Hierbei wird der Ligand, der spezifisch an die erste Bindungsstelle bindet, mit einem Spin-Label versehen. Das Spin-Label besteht aus einer Gruppe, die ungepaarte Elektronen enthält und daher eine sehr schnelle T_2-Relaxation von Protonen, die sich in der Umgebung zu diesem Elektron befinden, bewirkt (*39*). Nun kann nach einem zweiten Liganden – der in naher Umgebung zu dem ersten Liganden liegt – gesucht werden. Zusätzlich zu einer Substanzmischung wird der mit dem Spin-Label versehene Ligand in die NMR-Probe gegeben. Die Bindung in der Umgebung des ersten Liganden wird dadurch sichtbar, dass die Resonanzen des zweiten Binders verschwinden oder deutlich in ihrer Intensität vermindert werden. Der Vorteil gegenüber SAR by NMR liegt darin, dass die Proteingrösse unerheblich ist und aufgrund der guten Empfindlichkeit auch die benötigte Proteinmenge deutlich reduziert werden kann.

1D NMR-Methoden, wie Diffusions- oder Relaxations-editierte NMR-Spektren bieten ebenfalls die Möglichkeit Bindungsaktivität nachzuweisen *(40-45).* Sie haben wie die Transfer-NOE-Technik den Nachteil, dass bestimmte Ligandenüberschüsse eingehalten werden müssen. Besonders bei Substanzmischungen aus natürlichen Quellen oder synthetisierten kombinatorischen Bibliotheken kann in den seltensten Fällen davon ausgegangen werden, dass alle Verbindungen in gleichen Molaritäten vorliegen. Die Untersuchung der chemischen Verschiebung ist ebenfalls eine Methode, die seit vielen Jahren angewandt wird, um sowohl Bindung als auch Affinitäten zu bestimmen *(46-48).*

Die Verwendung des intermolekularen Sättigungstransfer zwischen gesättigtem Protein und gebundenem Liganden zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung wurde erstmals 1979 von K. Akasaka vorgestellt *(*49*).* Der erste Einsatz von 1D intermolekularen NOE-Differenzspektren geht auf Umemoto *et al.* zurück *(50).* Die NOE-*pumping* Methode beruht ebenfalls auf der Übertragung von

Magnetisierung vom Protein auf bindende Liganden, benötigt aber einen Diffusionsfilter, was die Empfindlichkeit reduziert *(51)*.

1.7 Oberflächen Plasmonen Resonanz

Die SPR-Technik (surface plasmon resonance) verwendet evaneszierende Wellen, um den Brechungsindex einer Lösung in der Nähe der Sensoroberfläche zu bestimmen. Es ist ein optisches Verfahren und dadurch sehr empfindlich – nur minimale Mengen eines immobilisierten Bindungspartners werden benötigt. Der immobilisierte Bindungspartner kann dabei sowohl der makromolekulare Rezeptor, als auch der niedermolekulare Ligand sein. Wird nun ein Bindungspartner zu der Lösung über der Sensoroberfläche gegeben, reichert sich dieser durch die Komplexbildung an der Oberfläche an. Die dadurch hervorgerufene Änderung des Brechungsindexes der Lösung über der Sensoroberfläche korreliert mit der Massenzu- oder abnahme des Sensors während der Komplexreaktion (Abbildung 1).

Aus den zeitlichen Signalverläufen der Assoziations- und Dissoziationsphase lassen sich die Zeitkonstanten der Komplexbildung – also die Assoziations- und Dissoziationsraten bestimmen. Diese kinetischen Daten erlauben im Normalfall auch eine Bestimmung der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante – also der Dissoziationskonstante des eingesetzten Liganden. SPR ist eine der wenigen Methoden, mit der die Möglichkeit besteht, kinetische Informationen mit einem geringen Aufwand zu erlangen. Sehr schnelle Austauschprozesse sind jedoch nicht mehr auswertbar. Bei Saccharid-Rezeptor-Wechselwirkungen sind die Wechselzahlen im Normalfall sehr hoch, und die Kinetik lässt sich aufgrund des steilen Anstiegs und Abfalls nicht mehr akkurat bestimmen. In solchen Fällen lässt sich die Dissoziationskonstante nur über Konzentrationsreihen bestimmen und nicht mehr aus den Austauschkinetiken (*52-54*).

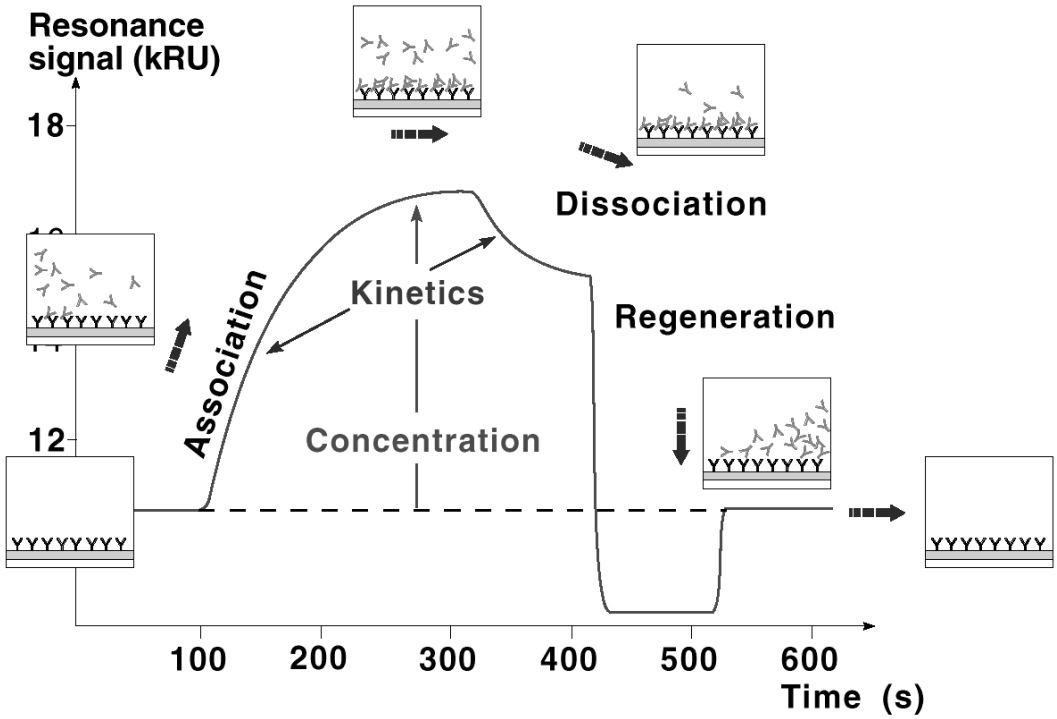

Abbildung 1. Schematische Darstellung eines SPR-Laufes. Die Basislinie repräsentiert die Phase, in der nur Probenpuffer über den Chip läuft. Bei Zugabe eines Bindungspartners zur Lösung macht sich dies über eine Massenzunahme auf den Chip bemerkbar, die in sogenannten *resonance units* (RU)-Werten ausgedrückt wird (Assoziation). Diese Assoziationsphase wird von der Dissoziationsphase abgelöst, bei der auf Puffer umgeschaltet wird (Dissoziation). Bemerkbar macht sich dies durch den Abfall der RU-Werte. Über einen Regenerierungsschritt – etwa über einen sauren Puls – wird die Ausgangssituation wiederhergestellt und eine weitere Messung kann vorgenommen werden (Regeneration).

1.8 Glycostrukturen in biologischen Systemen

Kohlenhydrate haben in der Natur eine Vielzahl bedeutender Funktionen. Zum einen besitzen Saccharide eine wichtige Stützfunktion in Form von Chitin oder Cellulose, zum anderen dienen sie als Energiespeicher in Form von Glycogen und Stärke. Daneben sind sie als sogenannte Glycokonjugate in Glycoproteinen oder Glycolipiden vorhanden. Als solche sind sie an elementaren Prozessen wie Zell-Zell-Erkennung, Gast-Wirt-Interaktionen und Zell-Differenzierung beteiligt (*55*). Die Zucker-Reste an Glycosphingolipiden beispielsweise bestimmen die drei humanen Blutgruppenepitope A, B und 0. Onkogene Zellen präsentieren häufig fehlerhafte Glycostrukturen auf ihren Zelloberflächen. Diese Tumor-assoziierten Glyco-strukturen sind oftmals die direkte Folge von veränderter Enzymaktivität der

Glycosyltransferasen bzw. Glycosidasen. Hierbei wurde vorgeschlagen, die veränderten Glycanmuster auszunutzen, um gezielt nur die vom Krebs befallenen Zellen unschädlich zu machen. Auch Bakterien bilden über die feinen Haare auf ihrer Oberfläche, den sogenannten Pili, den ersten Kontakt zu einer Wirtszelle. Sie verwenden die Saccharidreste des Wirts als Andockstelle. Ein weiteres prominentes Beispiel ist der Entzündungsprozess, dessen erste Schritte über die Wechselwirkung des Tetrasaccharids sLe^x und seinem Rezeptor E-Selektin vermittelt werden. Kohlenhydrate sind folglich in Form von Glycokonjugaten durch ihre exponierte Lage an der Zelloberfläche geradezu prädestiniert dazu, den ersten Kontakt zu vermitteln. Die Aufklärung der molekularen Grundlage der Wechselwirkung mit den entsprechenden Zucker-bindenden Proteinen ist daher von grosser Bedeutung und ein wichtiger Forschungszweig.

In Glycoproteinen kommen im wesentlichen zwei Arten von Verknüpfungen des Glycans vor. Die sogenannten *N*-Typ-Glycoproteine, die über die Seitenkette eines Asparagin-Restes des Proteins verknüpft sind und die *O*-Typ-Glycoproteine, die über die Seitenketten eines Serin- oder Threonin-Restes verknüpft sind. Da in dieser Arbeit ein Asialo-Decasaccharid des komplexen Typs untersucht wurde, wird hier detaillierter auf die *N*-Typ-Glycoproteine eingegangen. Sie haben eine Core-Region aus fünf Zuckern gemeinsam. Diese besteht aus zwei β1-4 glycosidisch verknüpften GlcNAc-Resten am reduzierenden Ende, an denen eine verbrückende β1-4 verknüpfte Mannose hängt. Von dieser Mannose gehen dann je eine α1-3 und eine α1-6 glycosidisch verknüpfte Mannose ab. *N*-Typ-Glycoproteine werden in drei verschiedene Arten eingeteilt – den hochmannosidischen-Typ, den Komplex-Typ und den Hybrid-Typ (siehe Abbildung 2). Innerhalb dieser Typen gibt es eine weitere Unterscheidung in der Anzahl der Ketten – auch Antennen genannt. Das Komplex-Typ Oligosaccharid kommt hauptsächlich in höheren Lebewesen vor, wobei die Anzahl der Antennen aus (Sialyl-)Lactosamin-Sequenzen zwischen 1 und 6 variiert. Bei einigen Glycoproteinen des Komplex-Typ ist das GlcNAc am nicht-reduzierenden Ende mit einem α-L-Fucose-Rest verknüpft.

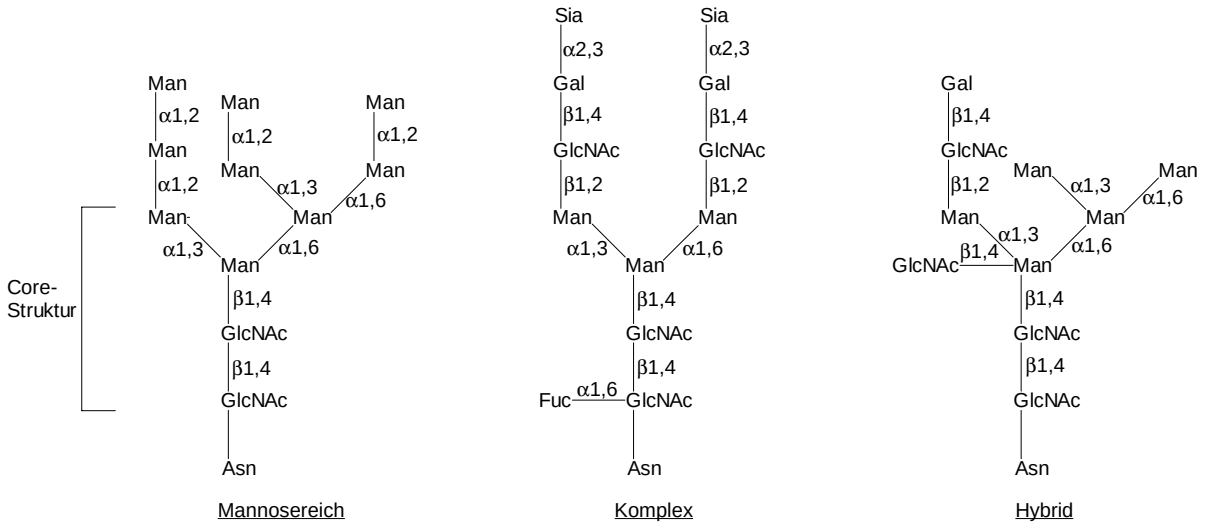

Abbildung 2. Strukturen der drei Arten von *N*-Typ-Glycoproteinen. Das Mannosereiche, das Komplex-Typ- und das Hybrid-Typ-Glycoprotein. Gemeinsam haben sie die aus dem $GlcNAc_2Man_3$-Pentasaccharid bestehende Core-Region.

1.9 Pflanzliche Lektine

Die Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen pflanzlicher Lektine unter biophysikalischen Aspekten ist von grossem Interesse – auch wegen der Bedeutung und Häufigkeit dieser Art von Interaktionen innerhalb der humanen Physiologie. Zum Beispiel haben Lektine einen grossen Anteil an dem bahnbrechenden Erfolg Paul Ehrlichs zu Anfang des 20 Jahrhunderts in der Immunologie – auch wenn hier die Eigenschaft ausgenutzt wurde, dass toxische Lektine wirksame Antigene sein können. Die Eigenschaft einiger Lektine rote Blutkörperchen zu agglutinieren trat erst in den fünfziger Jahren in den Vordergrund (*56*). Der Tatsache, dass manche Lektine zwischen verschiedenen humanen Blutgruppenepitopen unterscheiden können, verdanken sie auch ihren Namen. Aufgrund dieser Spezifität wurde ihnen der Name Lektin gegeben, der aus dem lateinischen Wort *legere* stammt, das Auswählen bedeutet.

Die Wechselwirkung zwischen einzelnen Sacchariden und Proteinen zeichnet sich im Normalfall durch nur geringe Affinität aus – die Dissoziationskonstanten liegen im milli- bis mikromolaren Bereich. Eine Erhöhung der Affinität gelingt daher nur über die Erweiterung der Anzahl an Bindungspartnern – ein Multivalenz-Effekt der Avidität genannt wird (*57*). Die oben beschriebene Eigenschaft einiger Lektine, stark agglutinierend zu wirken, besitzen diese nur, wenn sie mehrere Saccharid-

Bindungsstellen besitzen und somit quervernetzende Fähigkeiten haben. Es gibt auch Lektine mit nur einer Bindungsstelle. Eine weitgehend akzeptierte Definition der Lektine lautet: "Lektine sind zuckerbindende Proteine nicht immunogenen Ursprungs, die keine enzymatische Aktivität aufweisen." (*58*).

Welche Rolle die Lektine in ihrer natürlichen Umgebung spielen, ist immer noch weitgehend ungeklärt. Spekuliert wird unter anderem über Transport- oder Verteidigungsfunktionen. Am häufigsten können Lektine aus den Wurzeln oder Samen isoliert werden, sie sind jedoch nicht auf diese Bereiche beschränkt.

Lektine sind häufig aus nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten aufgebaut, entweder aus identischen Monomeren, wie das *Aleuria Aurantia* Agglutinin (AAA) und Weizenkeim Agglutinin (WGA) oder aber aus unterschiedlichen Monomeren, wie beispielsweise das *Ricinus Communis* Agglutinin (RCA_{120}). Das Lektin RCA_{120} ist selbst ein Glycoprotein, es trägt also Saccharidreste. Andere hingegen tragen kaum Zuckerstrukturen, wie WGA. Die Spezifität der Lektine wird üblicherweise über die jeweiligen Mono- oder Oligosaccharide bestimmt, die spezifisch die Agglutination inhibieren. Über solche Tests wurde eine Vielzahl von Lektinen charakterisiert, die gezielt an Galactose-, Fucose-, Mannose- oder Glucose-Reste binden. Die Verwendung der Lektine ist somit eng mit ihrer Spezifität verknüpft – sei es um über Affinitäts-Chromatographie bestimmte Glycoproteine zu isolieren oder um das Glycan selbst zu identifizieren.

Weizenkeim Agglutinin

Das Weizenkeim Agglutinin (WGA) ist ein Lektin, das aus *triticum vulgaris* isoliert wird. Es hat Spezifität für GlcNAc sowie für die β-1-4 verknüpften Oligomere von GlcNAc. Die Affinität des Monosaccharids ist nur gering, erhöht sich aber mit der Anzahl an verknüpften GlcNAc-Einheiten, bis etwa zum unverzweigten Pentamer. WGA ist ein ausserordentlich stabiles dimeres Lektin, das durch seinen hohen Anteil an Cystein- und Glycin-Resten charakterisiert ist. Die beiden identischen monomeren Untereinheiten haben eine Molmasse von je 18 kDa. Zum Teil gibt es Abweichungen zwischen den Publikationen was die Anzahl an Bindungsstellen betrifft. Es wurden bis zu vier unabhängige Bindungsstellen pro Monomer beschrieben – von denen jedoch nur zwei hohe Affinitäten besitzen (*59*, *60*). Ein weiteres interessantes Merkmal dieses Lektins ist, dass der erkannte Zucker

GlcNAc nicht in Pflanzen auftritt, wodurch die eigentliche Funktion des Lektins schwer erklärbar ist.

Aleuria aurantia Agglutinin

Das aus dem Pilz Orangenbecherling (*Aleuria aurantia*) isolierbare Lektin erkennt terminale Fucosen. Das Protein liegt in Lösung als Dimer aus zwei identischen nicht-kovalent verknüpften Untereinheiten mit einer Molmasse von je 36 kDa vor und ist nicht glycosyliert. Im Gegensatz zu anderen Fucose-bindenden Lektinen haben die benachbarten Saccharideinheiten, als auch das Verknüpfungsmuster keinen Einfluss auf die Affinität (*61*). Im Widerspruch hierzu konnten jedoch Debray und Montreuil zeigen, dass die α-1-6 verknüpften L-Fucosen in einem Hemagglutinations-Assay die höchste Affinität besitzen (*62*). Dieses Ergebnis wurde in einer Studie über die Retardationszeiten an einer AAA-Sepharose-Säule bestätigt. Hier wurden ebenfalls α-1-6 verknüpfte L-Fucosen am proximalen GlcNAc als essentiell beschrieben (*63*). Das Lektin konnte 1989 kloniert und exprimiert werden (*64*, *65*).

Ricinus communis Agglutinin

Die *Ricinus communis* Pflanze stammt ursprünglich aus tropischen Gebieten und wird hauptsächlich wegen des Rizinusöls, das aus den Bohnen gewonnen werden kann, angebaut. Die Bohnen enthalten zwei verschiedene Kohlenhydrat-bindende Proteine. Ersteres ist das hochtoxische Protein Ricin, welches aus zwei Untereinheiten mit unterschiedlichen Funktionen besteht; eine Lektin-Domäne, über die es die terminalen Galactosereste an der Zelloberfläche bindet und eine zweite Domäne, mit der es, sobald es in die Zelle gelangt ist, irreversibel an Ribosomen bindet. Schon wenige Moleküle reichen aus, um die Proteinbiosynthese zu verhindern und die Zelle zu töten. Somit gehört Ricin zu den giftigsten bekannten Verbindungen. Interessanterweise war Ricin das erste identifizierte Lektin – es wurde 1888 von H. Stillmark isoliert. Stillmark registrierte die agglutinierende Wirkung des Extraktes und schrieb ihr die Toxizität zu, was sich später als Irrtum herausstellte, da die agglutinierende Wirkung hauptsächlich vom zweiten aus der Bohne isolierbaren Lektin stammt, dem *Ricinus communis* Agglutinin (RCA_{120}).

Wegen seiner deutlich geringeren Toxizität wurde hier das *Ricinus communis* Agglutinin mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Es ist ein aus vier Untereinheiten aufgebautes As-sB Homodimer. Die Saccharid-bindende Domäne ist in der B-Untereinheit lokalisiert und erkennt spezifisch terminale Galactosen. Es ist nur ein sehr schwaches Zellgift, das nicht über den Intestinaltrakt aufgenommen wird und rote Blutkörperchen nur dann schädigen kann, wenn es intravenös verabreicht wird. Aufgrund seiner quervernetzenden Fähigkeiten ist RCA_{120} im Gegensatz zum Ricin ein stark agglutinierendes Protein.

2 Problemstellung

Die hier präsentierte Arbeit soll die Einsatzmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie zur Beobachtung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Bindungsprozessen demonstrieren. Schwerpunkt liegt dabei auf einer im Laufe dieser Arbeit entwickelten Methode. Für das hier vorgestellte Sättigungstransfer-Differenz (STD) NMR-Experiment soll anhand von Modellsystemen der Einsatzbereich dieser Methode bestimmt werden.

Im wesentlichen werden hier die Voraussetzungen für den Einsatz der STD-NMR-Spektroskopie als Screening-Verfahren und zur Bestimmung des Bindungsepitops von Liganden behandelt. Der mittels diesem Verfahren analysierbare Bereich der Dissoziationskonstanten – sowie ihr Einfluss auf die Empfindlichkeit der Methode soll ebenso geprüft werden. Ein weiterer zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Frage, inwieweit der Einsatz von mehrdimensionaler STD-NMR-Spektroskopie möglich ist, und welche Vorteile sich hieraus ergeben. Zudem soll geprüft werden, inwieweit Titrations- und Kompetitionsexperimente eine Klassifizierung der Bindungsaffinität und Bindungsspezifität der hier untersuchten Lektin-Saccharid-Komplexe erlauben. Desweiteren wird getestet, wie weit – und unter welchen Bedingungen – die Proteinkonzentration minimiert werden kann. Diskutiert werden soll auch unter welchen Umständen diese Methode gegenüber den heute üblicherweise eingesetzten HTS-Verfahren und anderen NMR-basierten Screening-Methoden vorzuziehen ist.

3 Theorie

3.1 Relaxation

3.1.1 Die T_1-Relaxationszeit

Die T_1-Relaxationszeit wird auch longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit genannt und beschreibt, wie schnell sich die Gleichgewichts-magnetisierung nach einer Störung wieder einstellt. Nach einem 90°-Puls präzediert die Magnetisierung um die z-Achse in der xy-Ebene. Durch die Spin-Gitter-Relaxation gelangt die Magnetisierung mit der Zeitkonstante T_1 wieder zurück in ihr Gleichgewicht. Wie der Name schon sagt, handelt es sich um die Übertragung von Energie vom Spinsystem auf die Umgebung oder das "Gitter". Die T_1-Relaxationszeiten durchlaufen ein Minimum bei $\omega\tau_c \approx 1.12$, d.h. für 500 MHz bei Molekülen mit einer Grösse von ca. 1-2 kDa (siehe Abbildung 3). Die üblichste Methode zur Messung von T_1-Relaxationszeiten ist die *inversion-recovery* Methode (*66, 67*).

Gemäss Abbildung 3 haben kleine Moleküle lange T_1-Relaxationszeiten und verfügen wegen ihrer sehr schnellen Umorientierung kaum über Spin-Spin-Relaxationsmechanismen. Mittelgrosse Moleküle mit Korrelationszeiten im Bereich von ca. 10^{-9} [s], besitzen die kürzesten T_1-Relaxationszeiten. Dies entspricht je nach Spektrometerfrequenz und Temperatur einer Molekülgrösse von ca. 1-2 kDa. Moleküle mit einer Molmasse oberhalb von ca. 10 kDa haben wieder längere T_1-Relaxationszeiten. Sie besitzen langsamere Korrelationszeiten, was die Spin-Spin-Wechselwirkung sehr effektiv macht und sich in kurzen T_2-Relaxationszeiten bemerkbar macht.

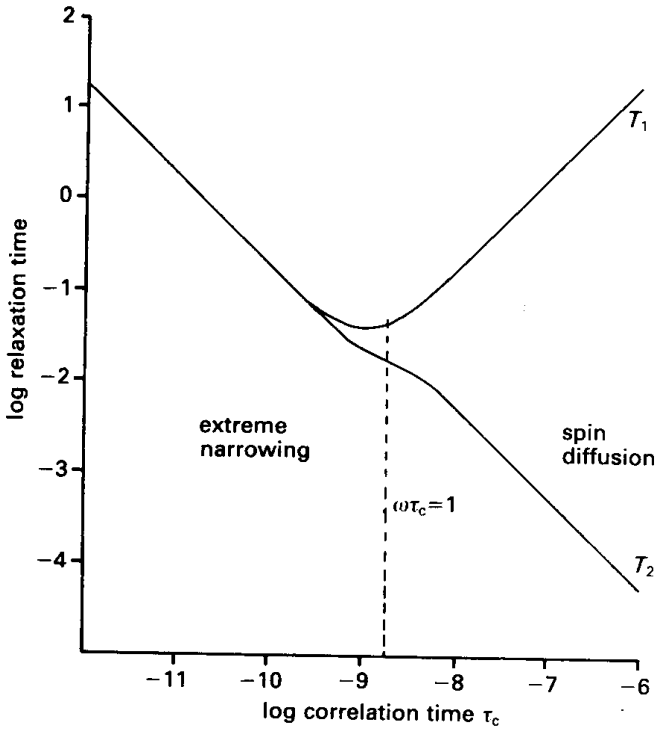

Abbildung 3 Logarithmische Darstellung der T_1- und T_2-Relaxationszeiten gegenüber der Korrelationszeit τ_c, die ein Maß für die Beweglichkeit von Molekülen ist. Grosse Moleküle bewegen sich langsam, haben folglich lange Korrelationszeiten. Die T_1-Relaxationszeit durchläuft ein Minimum bei $\omega\tau_c = 1$, das Minimum ist also zusätzlich abhängig von der Spektrometerfrequenz. Die T_2-Relaxationszeit wird mit zunehmender Molekülgrösse immer kürzer, dies ist auch ein Grund dafür, dass sehr grosse Proteine schlecht mit NMR-Spektroskopie untersucht werden können.

3.1.2 Die T_2-Relaxationszeit

Die T_2-Relaxationszeit wird auch transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit genannt und beschreibt, wie schnell die durch den 90°-Puls in der xy-Ebene erzeugte Phasenkohärenz verloren geht. Hierbei muss zwischen zwei Anteilen an der messbaren T_2-Relaxationszeit (T_2^*) unterschieden werden. Der eine Anteil ist abhängig von der Homogenität des B_0 Magnetfeldes – bei sehr kleinen Molekülen liefert diese einen grossen Beitrag zu der messbaren T_2^*-Relaxationszeit. Der andere Anteil ist abhängig von den Spin-Spin-Wechselwirkungen, die ein Auffächern der Phasenkohärenz bewirken. Dieses Auffächern entsteht dadurch, dass die einzelnen magnetischen Dipole, die zur makroskopischen Magnetisierung beitragen leicht unterschiedliche Präzessionsfrequenzen haben. Über diesen Prozess wird folglich

keine Gleichgewichtsmagnetisierung entlang der z-Achse wiederhergestellt, sondern lediglich Magnetisierung auf der xy-Achse verteilt. Dies hat auch zur Folge, dass T_2 nur kleiner oder gleich T_1 sein kann. Die T_2-Relaxationszeiten sind umgekehrt proportional zur Molekülgrösse, d.h. die transversale Relaxation wird mit zunehmender Molekülgrösse immer effektiver. Eine Folge für Makromoleküle ist, dass die Magnetisierung in der xy-Ebene sehr schnell ihre Kohärenz verliert und somit nicht als NMR-Signal detektierbar ist. T_2-Relaxationszeiten werden mit Spin-Echo-Methoden, wie der *cpmg*-Sequenz (Carr - Purcell - Meiboom - Gill) bestimmt.

3.2 Sättigung

Die Sättigung von NMR-Resonanzen mit einem RF-Puls bei einer bestimmten Frequenz führt dazu, dass diese Signale im NMR-Spektrum keine beobachtbare Intensität mehr besitzen. Während der Sättigung bei einer bestimmten Resonanzfrequenz rotiert die Magnetisierung analog zur freien Präzession nach einem 90°-Puls, in einer zx- bzw. zy-Ebene. Durch Relaxation während der Einstrahldauer und der Inhomogenität des B_1-Feldes verringert sich die Grösse des Vektors, der der eingestrahlten Resonanz entspricht. Die Zeitkonstante mit der dieser Vektor kleiner wird wurde von Torrey in Analogie zu den besser bekannten T_1- und T_2-Relaxationszeiten als $T_{2\rho}^{*}$ bezeichnet (*68, 69*). Sie setzt sich aus einem Relaxationsteil und einem Inhomogenitätsteil zusammen. Für den Relaxationsteil gilt folgende Gleichung:

$$\frac{1}{T_{2\rho}} = \frac{1}{2}\left[\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2}\right]$$

Diese Gleichung gibt wider, dass die Magnetisierung sowohl longitudinale als auch transversale Anteile besitzt. Bei Makromolekülen dominieren die sehr kurzen T_2-Zeiten die obige Gleichung und sind daher für die Sättigungseffizienz entscheidend. Der Inhomogenitätsteil wird folgendermassen definiert:

$$\frac{1}{T_{2\rho}^{*}} = \frac{1}{T_{2\rho}} + \left[\frac{\gamma \Delta B_1}{2\pi}\right]$$

ΔB_1 entspricht der Variation des B_1-Feldes in der Sättigungsregion der NMR-Probe. Wie schon bei der T_2^{*}-Zeit (siehe Abschnitt 3.1.2) ist diese direkt detektierbare Relaxationszeit $T_{2\rho}^{*}$ kürzer, als die tatsächliche $T_{2\rho}$-Relaxationszeit.

Eine sehr weit verbreitete Einsatzmöglichkeit dieser Methode ist die Wasserunterdrückung über einen sogenannten Vorsättigungspuls. Aber auch die früher sehr häufigen *steady-state* 1D NOE-Differenzmessungen wurden über diese Art der Vorsättigung aufgenommen.

3.3 Spin-Diffusion

Spin-Diffusion ist ein Begriff aus der Strukturaufklärung mittels NOE-Daten. Er beschreibt den indirekten Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen über einen Dritten (*70).* Grosse Anteile an Spin-Diffusion in einem System verhindern eine exakte Bestimmung von Atomabständen aus NOE-Daten, da die genaue Herkunft der Magnetisierung nicht mehr nachvollziehbar ist. Besonders effizient ist die Spin-Diffusion in Makromolekülen, in denen sie eine Gleichverteilung der Magnetisierung bewirkt *(71-73).* Sie tritt dann auf, wenn die Kreuzrelaxationsrate gross gegenüber der T_1-Relaxationszeit wird. Das bedeutet, bevor die Energie an das Gitter abgegeben werden kann, verteilt sie sich von Kern zu Kern über das gesamte Molekül. Es handelt sich dabei um die in grossen Molekülen sehr effizienten Nullquantenübergänge. Dies ist auch der Grund für das Angleichen der T_1-Relaxationszeiten bei Molekülen ab einer bestimmten Grösse. Die T_1-Relaxation solcher Makromoleküle verläuft hauptsächlich über Gruppen im Protein, die flexibel sind oder über die Spin-Rotation-Relaxation der selbst im Protein frei drehbaren Methylgruppen. Als Maß für die Effektivität der Spin-Diffusion kann die T_2-Relaxationszeit betrachtet werden, je kürzer T_2, desto effizienter ist die Spin-Diffusion (*74).* Der Darstellung in Abbildung 3 kann entnommen werden, dass Spin-Diffusion berücksichtigt werden muss, wenn der Wert von $\omega\tau_c$ = 1.12 überschritten wird und die T_1- und T_2-Zeiten auseinander laufen. Das heißt, der Anteil an Spin-Diffusion wird mit zunehmender Molmasse immer grösser. Proteine mit $\omega\tau_c >> 1.12$ befinden sich in einem Bereich der allgemein auch als Spin-Diffusions-Limit bezeichnet wird.

3.4 Schneller und langsamer Austausch

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte beruhen auf Prozessen, die schnell gegenüber der T_1-Relaxationszeit des Liganden sind. Unter diesen Umständen werden gemittelte Werte für die Direkte- und Kreuzrelaxationsrate des gebundenen bzw. freien Zustand erhalten. Ist der Austausch auch schnell gegenüber den

Unterschieden in der chemischen Verschiebung, so wird ein gemitteltes Signal erhalten, das anteilig Merkmale des freien und gebundenden Zustands enthält.

Die Linienverbreiterung der Liganden in Gegenwart von Rezeptor kann zwei Ursachen haben: Zum einen die schnellere T_2-Relaxationszeit des Liganden im gebundenen Zustand und zum anderen die unterschiedliche chemische Verschiebung im freien und gebundenem Zustand ($\delta\omega$) (siehe Abbildung 4). Je grösser der Unterschied $\delta\omega$ ist, desto breiter kann das resultierende Signal werden (*75*).

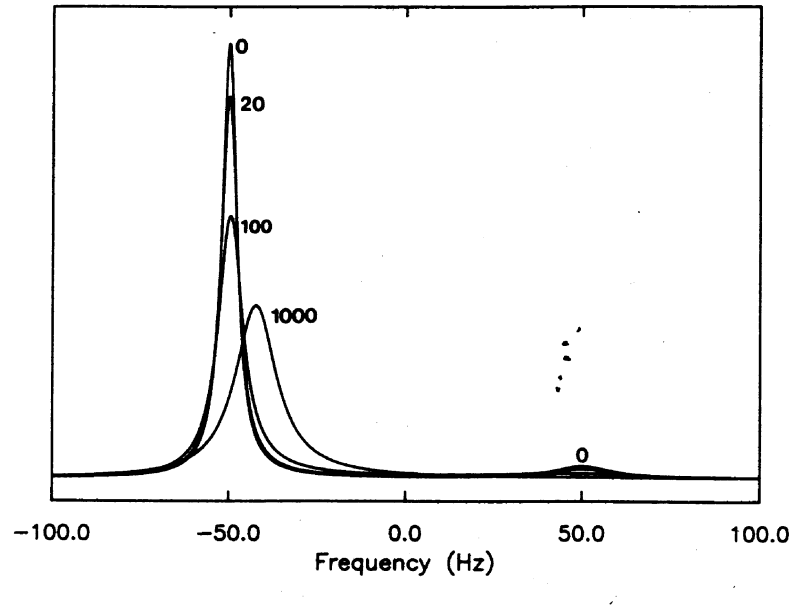

Abbildung 4. Veränderung der Linienform bei Übergang vom langsamem zu schnellem Austausch auf der Skala der chemischen Verschiebung $\Delta\omega$ [Hz] als Funktion der Dissoziationsrate k_{off}, die von den Zahlen über den Signalen repräsentiert werden. Die NMR-chemische Verschiebung des ungebundenen bzw. gebundenen Liganden liegen bei - 50 Hz respektive + 50 Hz, die Linienbreiten für $k_{off} = 0$ betragen 5 Hz bzw. 20 Hz. Es wird von einer Dissoziations-konstante K_D von 0.01 mM und einem zehnfachen Ligandenüberschuss ausgegangen.

Folglich können unter diesen Umständen keine getrennten Liganden-resonanzen für den freien und gebundenen Zustand analysiert werden. Dies ist der Grund dafür, dass die klassischen Sättigungstransfer-Experimente – wie sie in Kapitel 3.5 beschrieben sind – auf den schnellen chemischen Austausch nicht anwendbar sind.

3.5 Sättigungstransfer NMR-Spektroskopie

Sättigungstransfer NMR-Spektren werden seit fast 40 Jahren zur Untersuchung der chemischen Austauschrate verwendet. Erste Untersuchungen wurden von Forsén und Hoffman 1963 publiziert (*76, 77)*. Jedoch wurden mit dieser Methode bislang nur Systeme untersucht, in denen je eine diskrete Resonanz für den freien bzw. gebundenen Zustand beobachtbar ist (*78-80*). Beispielsweise lassen sich Eigenschaften wie gehinderte Rotation, bei der ebenfalls zwei getrennte Signale auftreten, gut untersuchen. Auch langsame Austauschprozesse zwischen freiem und gebundenem Zustand eines Moleküls können analysiert werden. Da zwei diskrete Signale erforderlich sind, reduziert sich die Anwendungsmöglichkeit auf Systeme, die eine langsame Umorientierung bzw. sehr langsame Wechselzahlen besitzen. Es handelt sich dabei um die Beobachtung der Intensität eines ungesättigten Signals bei Sättigung einer anderen Resonanz. Zum Vergleich müssen auch hier immer Referenzspektren aufgenommen werden. Die Aufnahme von Referenzspektren ist deshalb nötig, weil ein Sättigungspuls keine kohärente Magnetisierung erzeugt und somit kein NMR-Signal liefert. In den meisten Fällen lässt sich so schnell die Geschwindigkeitskonstante des Austauschprozesses bestimmen.

Forsén und Hoffman benutzen als Basis für ihre Theorie an dieser Stelle die von McConnell modifizierten Bloch´schen Gleichungen, die den Effekt des chemischen Austausches mit berücksichtigen. Angenommen wird ein Kern X der im reversiblen Wechsel zwischen zwei nicht-equivalenten Zusänden A und B ist (*76, 81, 82*).

$$A \underset{1/\tau_B}{\overset{1/\tau_A}{\rightleftharpoons}} B$$

τ_A und τ_B stehen für die Lebensdauer der jeweiligen Zustände. Es können dann vier Zeitkonstanten $T_{1A,}$ $T_{1B,}$ T_{2A} und T_{2B} definiert werden. Diese Zeitkonstanten liefern ein Mass für die Lebensdauer der jeweiligen Spinzustände (T_1) und entsprechend für die Phasenkohärenz (T_2), sie berücksichtigen jedoch noch nicht den Effekt des chemischen Austausches. Die tatsächlichen Lebensdauern eines Spin-zustandes τ_{1A} und der entsprechenden Phasenkohärenz τ_{2A} sind aufgrund des Austauschprozesses kürzer.

$$\frac{1}{\tau_{1A}} = \frac{1}{T_{1A}} + \frac{1}{\tau_A} \qquad \text{und} \qquad \frac{1}{\tau_{2A}} = \frac{1}{T_{2A}} + \frac{1}{\tau_A}$$

Analoge Gleichungen können für den Zustand B aufgestellt werden. Aufgrund der zum Teil nur kurzen T_2-Relaxationszeiten konzentrierten sich Forsén und Hoffman auf die T_1-Relaxationszeiten, um aus diesen Informationen über die Kinetik von Austauschprozessen zu erhalten. M_z^A und M_0^A sind die z-Magnetisierung von X in Zustand A, bzw. die Gleichgewichtsmagnetisierung von X in Zustand A. Die Zeitabhängigkeit der z-Magnetisierung von X ist durch die folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dM_z^A}{dt} = \left(\frac{M_0^A}{T_{1A}}\right) - \left(\frac{M_z^A}{\tau_{1A}}\right) + \left(\frac{M_z^B}{\tau_B}\right)$$

Sättigt man nun den Zustand B durch kontinuierliche Einstrahlung mit einem selektiven RF-Feld, fällt der hintere Term weg und die Lösung ist unabhängig von M_z^B.

$$M_z^A = M_0^A\left[C\exp\left(\frac{-t}{\tau_{1A}}\right) + \frac{\tau_{1A}}{T_{1A}}\right]$$

wobei die Integrationskonstante C von den Anfangsbedingungen abhängig ist. Die *steady-state* Lösung dieser Gleichung bei Sättigung von B lautet:

$$M_z^A(t \to \infty) = M_0^A\left(\frac{\tau_{1A}}{T_{1A}}\right)$$

die Gleichgewichtsmagnetisierung wird durch einen einfachen exponentiellen Abfall mit der Zeitkonstante τ_{1A} erreicht. Aus der Kombination von *steady-state* und zeitabhängigen Messungen lassen sich nun die beiden unbekannten Terme und somit die Austauschkinetik bestimmen.

Wie oben beschrieben, ist bei einem System, welches sich auf der NMR-Zeitskala der chemischen Verschiebung in schnellem Austausch befindet, eine Unterscheidung von gebundenen und freien Resonanzen nicht mehr möglich. Das heisst, es gibt keine Möglichkeit gezielt nur eine der Resonanzen zu sättigen, während man die andere Resonanz beobachtet. Deshalb können die ursprünglichen Sättigungstransfer NMR-Experimente nicht für diese schnell austauschenden Systeme eingesetzt werden und die oben abgebildeten Gleichungen können nicht mehr angewandt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Das STD-NMR-Experiment

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Sättigungstransfer-Differenz (STD)-NMR-Experiment weiterentwickelt, dass der direkten Identifizierung und Charakterisierung von kleinen Molekülen mit Bindungsaffinität gegenüber makromolekularen Rezeptoren dient *(83, 84)*.

Dieses Verfahren wurde erstmals im Verlauf dieser Arbeit zum Screening von Substanzbibliotheken auf bindungsaktive Substanzen – sowie zur Bestimmung des Bindungsepitops von Liganden eingesetzt. Der Vorteil dieses Verfahrens ist seine sehr hohe Empfindlichkeit bei schnell austauschenden Molekülen, was sich durch kurze Messzeiten und geringen Substanzbedarf manifestiert. Die für dieses Experiment nötigen Voraussetzungen und Eigenschaften werden im folgenden vorgestellt.

Wie im Abschnitt 3.3 auf Seite 25 erläutert, befinden sich grosse Biomoleküle, wie Proteine oder Antikörper, im Spin-Diffusions-Limit. Die selektive Sättigung einiger Proteinresonanzen führt daher zu einer schnellen Verteilung der Magnetisierung über das gesamte Makromolekül – und zwar um so schneller, je grösser das Protein ist. Daher bedeutet die Proteingrösse keine Einschränkung für dieses NMR-Experiment, solange es sich im Spin-Diffusions-Limit befindet, welches ab ca. 10 kDa erreicht ist. Eine weitere Eigenschaft der ^{1}H-NMR Proteinspektren ist, dass sie eine sehr grosse Linienbreite besitzen, die selbst im negativen ppm-Bereich sowie im Bereich jenseits der 10 ppm noch Intensität besitzen. Somit besteht die Möglichkeit, selektiv Proteinresonanzen ausserhalb des spektralen Fensters der Ligandenresonanzen, die im Bereich von ca. 0 – 9 ppm liegen, zu sättigen, und dennoch schon nach einer sehr kurzen Sättigungszeit nahezu eine Gleichverteilung der Magnetisierung über das gesamte Protein zu erhalten. Hierbei sollte angemerkt werden, dass prinzipiell alle Liganden auf ihre Bindungsaktivität getestet werden können, die sich nicht selbst im Spin-Diffusions-Limit befinden.

Die NMR-Spektren, bei denen der Rezeptor vorgesättigt wird, werden im folgenden als On-Resonance Spektren bezeichnet. Das heisst, vor dem ^{1}H-Anregungspuls sind alle Proteinresonanzen entweder deutlich in ihrer Intensität

vermindert oder gar vollständig gesättigt. Sie haben dann im NMR-Spektrum keine sichtbare Intensität. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Aufnahme von STD-NMR-Spektren ist, dass die Sättigung lediglich inkohärente Magnetisierung erzeugt, die nicht in einem NMR-Experiment detektiert werden kann. Aus diesem Grund können die Sättigungseffekte nur durch den Vergleich zu NMR-Spektren sichtbar gemacht werden, die nicht zuvor gesättigt wurden. Dazu werden Referenz- oder Off-Resonance NMR-Experimente aufgenommen, bei denen der selektive Vorsättigungspuls beispielsweise bei 40 ppm stattfindet also ausserhalb des spektralen Fensters des Rezeptors. Der Rezeptor wird daher in diesem Experiment nicht gesättigt und behält seine normale Intensität (*85)*. Die Differenz zwischen dem Off-Resonance und dem On-Resonance Spektrum wird in Folge als STD-NMR-Spektrum bezeichnet. Sichtbar sind in diesen Spektren alle Signale von Substanzen, die von dem Vorsättigungspuls in ihrer Intensität erniedrigt wurden, also alle Teile des Liganden, die mit dem Protein interagieren.

Kleine Liganden haben in Lösung typischerweise scharfe Signale und zeigen keine Spin-Diffusion. Eine selektive Einstrahlung ausserhalb des spektralen Fensters der Liganden hat deshalb keinen direkten Einfluss auf ihre Signalintensitäten. In Abbildung 5 wird verdeutlicht, welchen Effekt der Vorsättigungspuls auf Moleküle hat, die in reversiblem Austausch mit dem Protein stehen. In der Abbildung ist dieser kinetische Prozess durch die Assoziationsrate k_{on} und Dissoziationsrate k_{off} dargestellt. Während der Zeit, die ein Ligand im gebundenen Zustand vorliegt, erhalten Protonen in naher räumlicher Umgebung über den intermolekulare Magnetisierungstransfer Sättigung vom Protein. Diese partiell gesättigten Liganden (hier ellipsenförmig dargestellt) gelangen über chemischen Austausch wieder in den freien Zustand, wo sie detektiert werden können. Die Signalintensität der Liganden ist im Sättigungstransfer-NMR-Spektrum vermindert. Bei der Differenzbildung, d.h. Subtraktion des Sättigungstransfer-NMR-Spektrums von einem ungesättigten NMR-Spektrum, bleiben nur Signale von Liganden übrig, deren Intensität exakt der Verringerung der Signalintensität im Sättigungstransfer-NMR-Spektrum entspricht. Das Ergebnis ist ein STD-NMR-Spektrum, das in Abhängigkeit vom Sättigungsgrad verschieden grosse Signale enthält.

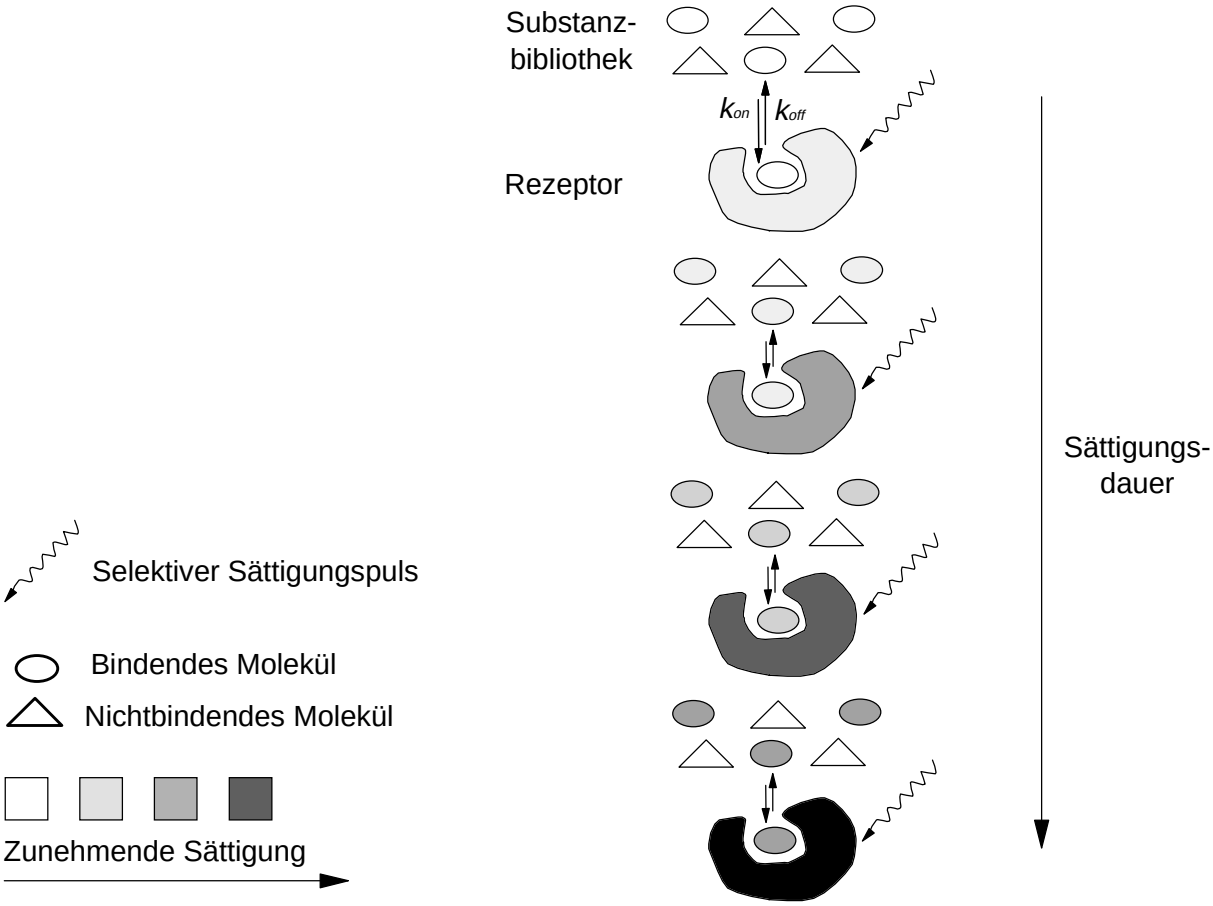

Abbildung 5. Illustration des Sättigungstransfer-Experiments zum Screening von Bibliotheken auf bindende Komponenten. Der selektive Puls sättigt nur einige Proteinresonanzen. Über Spin-Diffusion wird die Sättigung über das gesamte Protein verteilt. Die ellipsenförmig dargestellten bindenden Moleküle haben direkten Kontakt zur Proteinoberfläche. Ihre Signale werden daher über den intermolekularen Sättigungstransfer ebenfalls gesättigt. Die Signale der hier dreieckig dargestellten nicht-bindenden Moleküle werden nicht gesättigt und ihre Signale werden daher durch die Differenzbildung ausgelöscht.

Die Grösse der STD-Signale ist unter anderem abhängig davon, wie lange die Vorsättigungsphase andauert, wie stark der Ligand gebunden wird und wie gross der Ligandenüberschuss ist. Konkurrierend zur Sättigung wirkt die T_1-Relaxationszeit des Liganden im freien Zustand, also die Zeit, mit der die Gleichgewichtsmagnetisierung wieder eingestellt wird. Nicht-bindende Liganden (hier dreieckig dargestellt) erfahren keine Sättigung über das Protein und somit keine Verminderung der Signalintensität bei dem On-Resonance Experiment. Die Resonanzen dieser Liganden werden folglich bei der Differenzbildung vollständig abgezogen und liefern im STD-NMR-Spektrum keine Signale. Das STD-NMR-Experiment eignet sich somit sehr gut zum Nachweis von Bindungsaktivität.

Eine weitere Eigenschaft dieser Spektren ist, dass die Grösse der STD-Effekte zwar eine Abhängigkeit vom Ligandenüberschuss zeigen, sich der STD-Effekt jedoch dabei einem Maximum annähert. Daher läuft man nicht Gefahr, bei grossen Überschüssen die bindenden Moleküle zu übersehen, wie es beim Transfer-NOE-Spektrum passieren kann. Da prinzipiell ein normales 1D NMR-Spektrum erhalten wird, lässt sich bei einfachen Liganden das bindende Molekül sofort identifizieren. Da sich das STD-Verfahren auch auf mehrdimensionale ^{1}H-NMR-Spektren übertragen lässt, wie beispielsweise TOCSY-Spektren oder invers detektierte HSQC-Spektren, können auch komplexere Moleküle oder Mischungen mit n-dimensionalen NMR-Verfahren untersucht werden.

Das Potential dieser Methode zur Detektion von Bindungsaffinität wurde aufgrund eines Zufalls von mir bemerkt. Die Signalintensitäten von bindenden und nicht-bindenden Substanzen, in Gegenwart eines makromolekularen Rezeptors, zeigten bei zwei NMR-Spektren, die mit unterschiedlichen Wasserunterdrückungs-methoden aufgenommen wurden, unterschiedliche Intensitäten. Beim NMR-Spektrum, das mit der üblichen Wasservorsättigung über eine *continuous wave* Einstrahlung von 2 s aufgenommen wurde, waren die Signalintensitäten des bindenden Moleküls, im Vergleich zu dem NMR-Spektrum, das mit einer WATERGATE-Pulssequenz aufgenommen wurde, deutlich reduziert. Der Vorsättigungspuls auf die HDO-Resonanz hatte die, ebenfalls bei dieser Frequenz vorhandenen, Rezeptorsignale mitgesättigt. Da die WATERGATE-Methode ohne Vorsättigung auskommt, handelt es sich beim Vergleich der Signalintensitäten zwischen den beiden oben genannten NMR-Experimenten um ein STD-NMR-Spektrum. Der Unterschied zu den hier vorgestellten STD-NMR-Experimenten liegt darin, dass dieser Effekt nun gezielt zur Identifizierung und Charakterisierung von Bindungsaktivität ausgenutzt wurde. Es zeigte sich, dass dieser Sättigungstransfer-Effekt schon von K. Akasaka (*49*), Umemoto *et al.* (*50*) und Poppe *et al.* (*86*) verwendet wurde, um Ligandenbindung zu detektieren. Jedoch wurde er nie zum Screening verwendet oder systematisch zur Analyse von Bindung untersucht, wie es in dieser Arbeit geschehen ist.

Als Screening-Methode eignen sich die STD-NMR-Experimente sehr gut, da sich auch überlappende Signale von bindenden und nicht-bindenden Substanzen im STD-NMR-Spektrum nicht auslöschen. Die Verwendung der STD-NMR-Spektren als Screening-Methode wird in den folgenden Abschnitten 4.2 und 4.3 behandelt.

Im Abschnitt 4.4 wird hauptsächlich eine andere Eigenschaft der STD-NMR-Spektren im Vordergrund stehen. Mit diesen Spektren besteht die Möglichkeit schnell und auf einer atomaren Ebene die Bindungsepitope von Liganden zu bestimmen. Die Grösse der STD-Effekte innerhalb eines Liganden ist stark von der Nähe der jeweiligen Protonen zur Rezeptorprotonen abhängig. Diese Abstandsabhängigkeit des STD-Effekts ermöglicht folglich eine Bestimmung derjenigen Bereiche des Liganden, die den grössten Kontakt zur Proteinoberfläche besitzen. Über eine solche Analyse lassen sich Aussagen darüber machen, welche Bereiche des Liganden einen grossen Kontakt zum Protein besitzen und daher einen hohen Beitrag zur Bindungsaffinität leisten. Im Hinblick auf eine anschliessende Optimierung der Leitstrukturen sind solche Daten äusserst hilfreich, da sie aufzeigen, in welche Richtung die Liganden verändert werden sollten.

4.2 Weizenkeim Agglutinin

Das Lektin Weizenkeim Agglutinin bzw. *Wheat germ agglutinin* (WGA) bindet spezifisch Saccharide, die terminal GlcNAc oder dessen 1-4 verknüpften Oligomere tragen (*87*). Das Lektin ist ein Homodimer mit einer Molmasse von ca. 36 kDa und besitzt je Monomer mindestens eine Saccharid-Bindungsdomäne. Anhand von GlcNAc in Gegenwart von WGA werden die Möglichkeiten untersucht, STD-NMR-Experimente zum Screening zu verwenden. Die experimentell bestimmten Dissoziationskonstanten der Saccharide variieren je nach Assay erheblich. Bei einer kalorimetrischen Studie besass das Monosaccharid GlcNAc eine Dissoziations-konstante von 2.5 mM, *N*,*N´*-Diacetyl-Chitobiose 1.9×10^{-4} M und *N*,*N´*,*N´´*-Triacetyl-Chitotriose 9×10^{-5} M, während das entsprechende Pentasaccharid einen Wert von 5.3×10^{-5} M erreichte (*88*). Andere Studien, die Fluoreszenz-Assays und Gleich-gewichtsdialyse verwendeten, kamen zu Ergebnissen bei denen die Affinitäten um einen Faktor zwischen 5 – 10 höher lagen (*89*, *90*). Zusätzlich hat WGA auch Affinität gegenüber *N*-Acetyl-D-neuraminsäure – wenn auch um etwa einen Faktor 2 - 3 geringer als gegenüber GlcNAc.

4.2.1 *N*-Acetyl-D-glucosamin

1D STD-Screening-Experimente

Die folgenden Beispiele sollen verdeutlichen, dass das STD-Verfahren sich sehr gut zum screenen von Substanzmischungen eignet. Zusätzlich wird gezeigt, dass auch schwach bindende Liganden mittels STD-NMR-Spektroskopie problemlos und effizient detektiert werden können. Diese niedrigaffinen Liganden können mit üblichen HT-Screening-Verfahren nur schwer detektiert werden.

Andere NMR-basierte Screening-Verfahren erreichen sehr schnell dann ihre Grenzen, wenn strukturell verwandte Substanzen getestet werden müssen. Besonders häufig ist das bei kombinatorischen Bibliotheken der Fall – die Variation besteht oft nur aus dem Austausch einer funktionellen Gruppe. Solche Substanzbibliotheken bestehen dann aus Molekülen, die sehr ähnliche NMR-Spektren liefern. Aufgrund der starken Signalüberlagerungen sind Mischungsspektren nur schwer auswertbar. Ein Beispiel solcher Mischungen sind Saccharid-Bibliotheken, die besonders im Bereich der Ringprotonen nur sehr schwer zugänglich sind. Um die Leistungsfähigkeit der STD-NMR-Spektren zu verdeutlichen, wurde eine Substanzmischung aus sechs nicht-bindenden Sacchariden, zusätzlich zu dem bindenden Monosaccharid GlcNAc erstellt. Es wurde ein Anomerengemisch von GlcNAc eingesetzt, wobei das Anomerenverhältnis zwischen der α- und der β-Konfiguration etwa bei 4 zu 3 lag. Die Zusammensetzung der Substanzmischung ist wie folgt: α/β-D-GlcNAc, 1 mM; α-D-Man-OMe, 1 mM; α-D-Gal-OMe, 1 mM; α-L-Fuc-OMe, 1 mM; β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-OMe, 1 mM; β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-O-Allyl, 1 mM; D-Raffinose, 1 mM. Die WGA-Konzentration in Lösung war 45 µM bezogen auf die Bindungsplätze und der Ligandenüberschuss betrug somit ≈ 20:1.

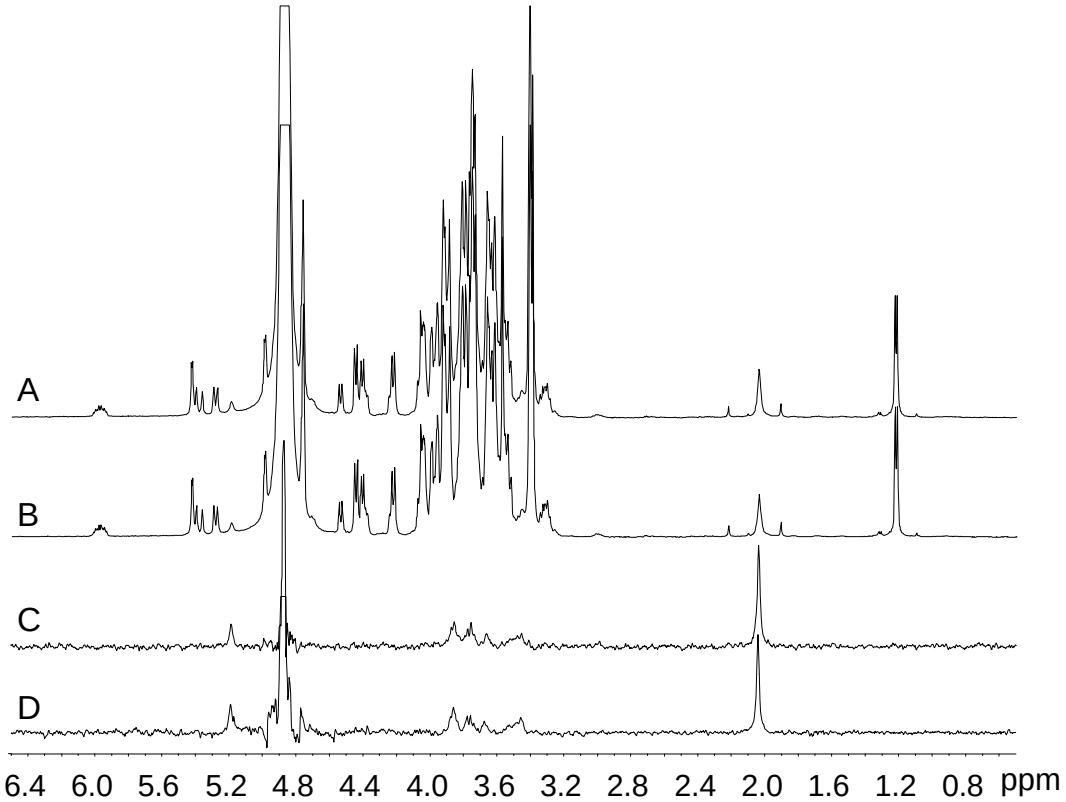

Abbildung 6. STD-NMR-Spektren zur Charakterisierung von Liganden mit Bindungsaffinität. A) 1D-^{1}H-NMR-Spektrum einer Mischung aus sieben Sacchariden in Gegenwart von WGA und Off-Resonance-Einstrahlung bei 30 ppm. B) 1D-^{1}H-NMR-Spektrum mit On-Resonance-Einstrahlung bei 10 ppm. C) Differenzspektrum von A) und B) ergibt das Sättigungstransfer-Differenz NMR-Spektrum. D) STD-NMR-Referenzspektrum von WGA nur in Gegenwart von GlcNAc. Die Spektren C) und D) wurden mit je 128 Scans für die On- und Off-Resonance-Spektren aufgenommen und intern über den Phasenzyklus abgezogen. In den Spektren C) und D) sind ausnahmslos Resonanzen von GlcNAc zu beobachten.

Abbildung 6 (A) zeigt das 1D-^{1}H-NMR-Spektrum der Bibliothek bei Einstrahlung im Off-Resonance Bereich bei 30 ppm. Abbildung 6 (B) zeigt das 1D-^{1}H-NMR-Spektrum der gleichen NMR-Probe, bei On-Resonance Einstrahlung auf das Protein bei 10 ppm. Aufgrund starker Signalüberlappung, besonders im Bereich der Ringprotonen, kann die bindende Komponente nicht durch Vergleich der Intensitätsunterschiede zwischen den Spektren (A) und (B) identifiziert werden. Erst das Differenzspektrum in Abbildung 6 (C) ermöglicht auch die Signalzuordnung im Bereich der Ringprotonen, was die Identifizierung von GlcNAc ermöglicht. Es wurde das Pulsprogramm *stdslsp* verwendet, dass über einen Spin-Lock-Puls nach dem Anregungspuls die schnell relaxierenden Proteinresonanzen eliminiert (*91*). Zum

Vergleich wurde das STD-NMR-Spektrum in Abbildung 6 (D) nur mit GlcNAc und WGA in der Lösung aufgenommen. Die beiden Spektren (C) und (D) sind identisch, was beweist, dass alle nichtbindenden Saccharide im STD-NMR-Spektrum (C) vollständig abgezogen wurden. Die STD-NMR-Experimente benötigten mit insgesamt 256 Scans ca. 20 Minuten bei einer Proteinmenge von 45 µM und einem 20-fachen Ligandenüberschuss. Die Vorteile auch 1D STD-NMR-Spektren aufnehmen zu können, sind offensichtlich. Durch die kurzen Akquisitionszeiten und den Einsatz von Mischungen können sehr viele Substanzen innerhalb von wenigen Tagen auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Besonders bei nicht-trennbaren Mischungen aus kombinatorischen Ansätzen oder Naturextrakten hat dieses Verfahren seine Stärken.

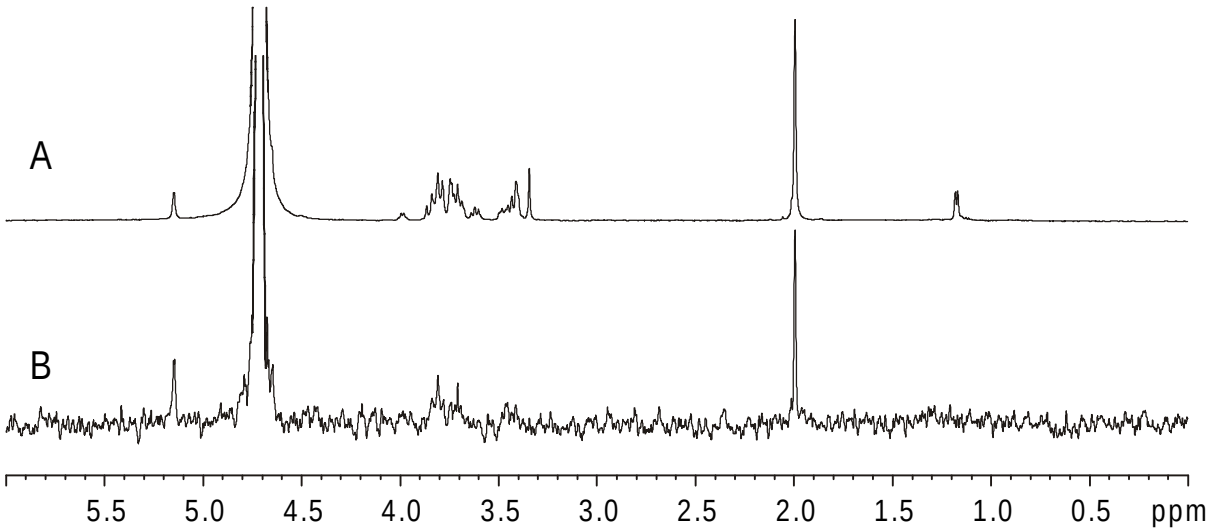

Abbildung 7. A) Referenzspektrum einer Mischung von 1 nmol WGA und 200 nmol GlcNAc und 80 nmol α-L-FucOMe. B) STD-NMR-Spektrum der Mischung. Die Messzeit betrug bei 1 k Scans etwa eine Stunde. Die On-Resonance Frequenz wurde auf 7 ppm eingestellt und die Sättigungszeit betrug 2 s.

Eine Abschätzung der minimale benötigten Proteinkonzentration erfolgte mit einer Probe aus etwa 1 nmol WGA (18 µg) und einer Mischung aus 200 nmol GlcNAc (44 µg) als Binder und 80 nmol α-L-FucOMe (15 µg) zur Kontrolle als nicht-Binder. Abbildung 7 (B) zeigt das mit einer Anzahl von 1k Scans, bei einer Messzeit von etwas über einer Stunde, erhaltene STD-NMR-Spektrum. Man erreicht in diesem STD-NMR-Spektrum kein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, kann aber eindeutig die GlcNAc-Signale identifizieren. Keine Signale der nicht-bindenden Substanz α-L-FucOMe erscheinen im STD-NMR-Spektrum. Dies beweist die hohe Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments, so dass auch sehr gering konzentrierte NMR-Proben

vermessen werden können. Dadurch wird in einen Konzentrationsbereich an Protein vorgedrungen, der bislang mit NMR-basierten Methoden kaum zugänglich war.

2D STD-Screening-Experimente

Die sehr guten Ergebnisse der 1D STD-NMR-Spektren zum Screening von Bibliotheken gaben Anlass, auch 2D STD-NMR-Verfahren an Substanzmischungen zu testen. Da es sich bei der STD-Methode um ein Vorsättigungs-Experiment handelt, lassen sich alle Pulssequenzen, die mit einer Protonenanregung beginnen, so modifizieren, dass auch entsprechende STD-NMR-Experimente durchführbar sind. Wegen der grossen Bedeutung von TOCSY-Spektren zur Identifizierung von komplexen Molekülen werden im folgenden STD-TOCSY-Spektren diskutiert (*92*, *93*).

Abbildung 8 zeigt in Spektrum (A) das mit Off-Resonance Einstrahlung aufgenommene normale TOCSY-Spektrum der Substanzmischung. Es handelt sich dabei um die selbe NMR-Probe, die auch im 1D STD-NMR-Experiment verwendet wurde. Das STD-TOCSY-Spektrum (B) enthält nur Signale der bindenden Komponente GlcNAc. Dieses Spektrum zeigt, dass beispielsweise die Kreuzpeaks von H6 auf H5 der Fucose bei 1.2 ppm auf 3.9 ppm vollkommen ausgelöscht wurden, während die Kreuzpeaks ausgehend von dem Signal des H1-Protons des α-GlcNAc bei ca. 5.1 ppm deutlich erkennbar bleiben. Das Potential dieser Methode wird dadurch, dass auch 2D NMR-Experimente aufgenommen werden können, enorm erhöht. Selbst aus komplexen Mischungen ist dann eine schnelle und eindeutige Identifizierung der bindenden Komponente möglich. Ein weitere Ausweitung der 2D Screening-Experimente auch auf heteronukleare NMR-Experimente wird in Abschnitt 4.3.1 beschrieben.

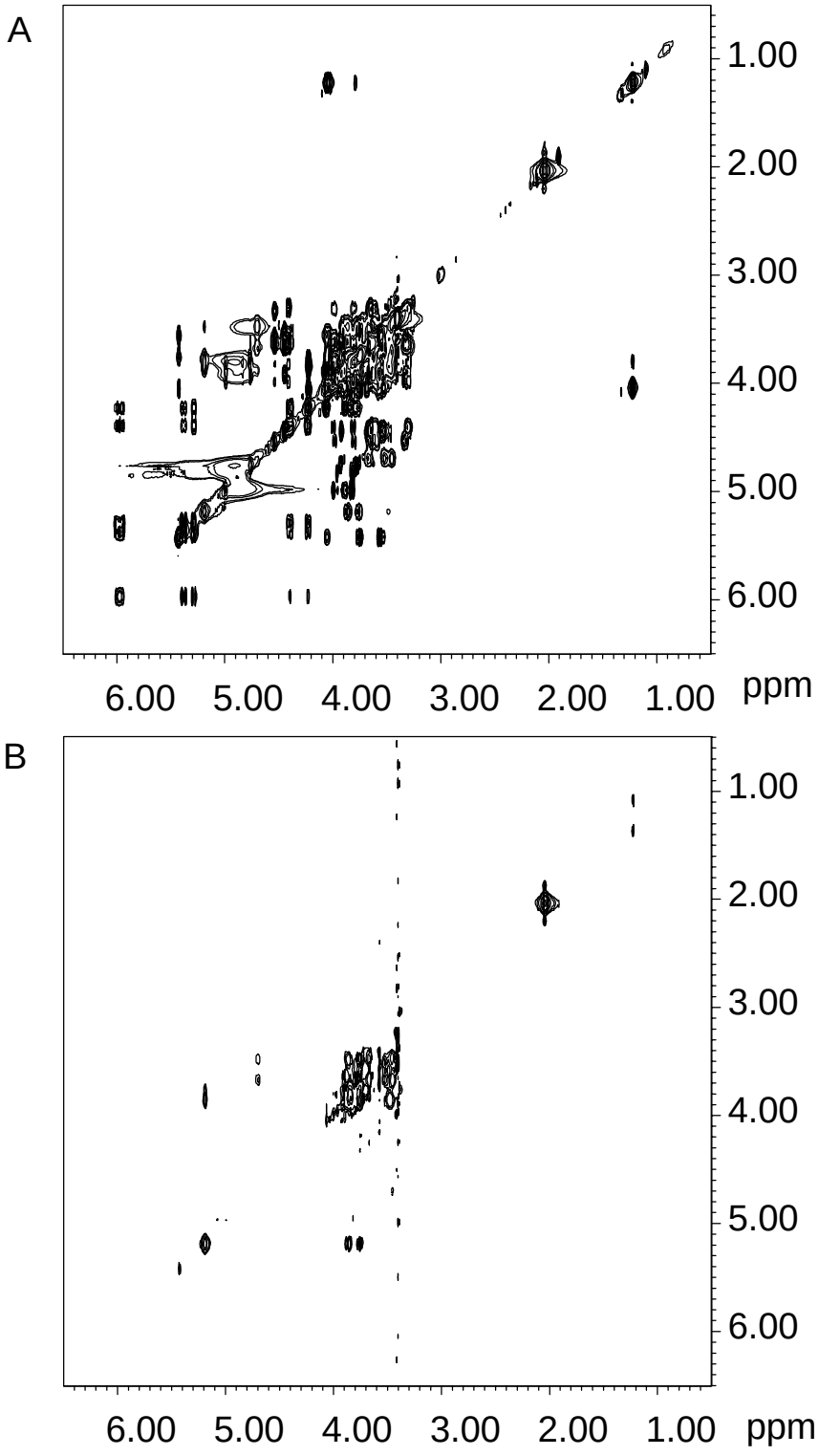

Abbildung 8. TOCSY-NMR-Spektren zur Identifizierung bindender Liganden. A) TOCSY-Spektrum einer Mischung von sieben Sacchariden und WGA mit Off-Resonance Einstrahlung bei 20 ppm. B) STD-TOCSY-Spektrum mit On-Resonance Einstrahlung bei 7 ppm. Einzig Signale der bindenden Komponente GlcNAc bleiben übrig.

STD-Titrationsexperimente

Für die hier durchgeführten STD-Titrationsexperimente wurde eine definierte Menge an Lektin vorgelegt und eine entsprechende Menge an, in D_2O-Puffer gelöstem, Monosaccharid zugegeben. Auftretende Verdünnungseffekte wurden vernachlässigt, da es sich um hoch konzentrierte Saccharid-Lösungen handelte. Nach jeder Zugabe einer entsprechenden Menge an Ligand, wurde ein Referenz- und STD-NMR-Spektrum aufgenommen und die jeweiligen Signalintensitäten bestimmt. Diese wurden anschliessend gegen die entsprechende Ligandenkonzentration aufgetragen. Das STD-Titrationsexperiment erfolgte hier durch Zugabe eines Anomerengemisches von GlcNAc zu einer WGA-Probe mit ca. 22 nmol Bindungsstellen (44 µM). Die Zuckerkonzentration wurde mittels einer 300 mM GlcNAc-Lösung eingestellt. Die durch die Titration erhaltenen STD-NMR-Spektren sind in Abbildung 9 abgebildet. Die Sättigungszeit, die On-Resonance Frequenz und die Anzahl der Scans war bei allen Spektren identisch. Die STD-NMR-Spektren sind maßstabsgetreu abgebildet und die Erhöhung der Signalintensität mit zunehmendem Ligandenüberschuss wird deutlich.

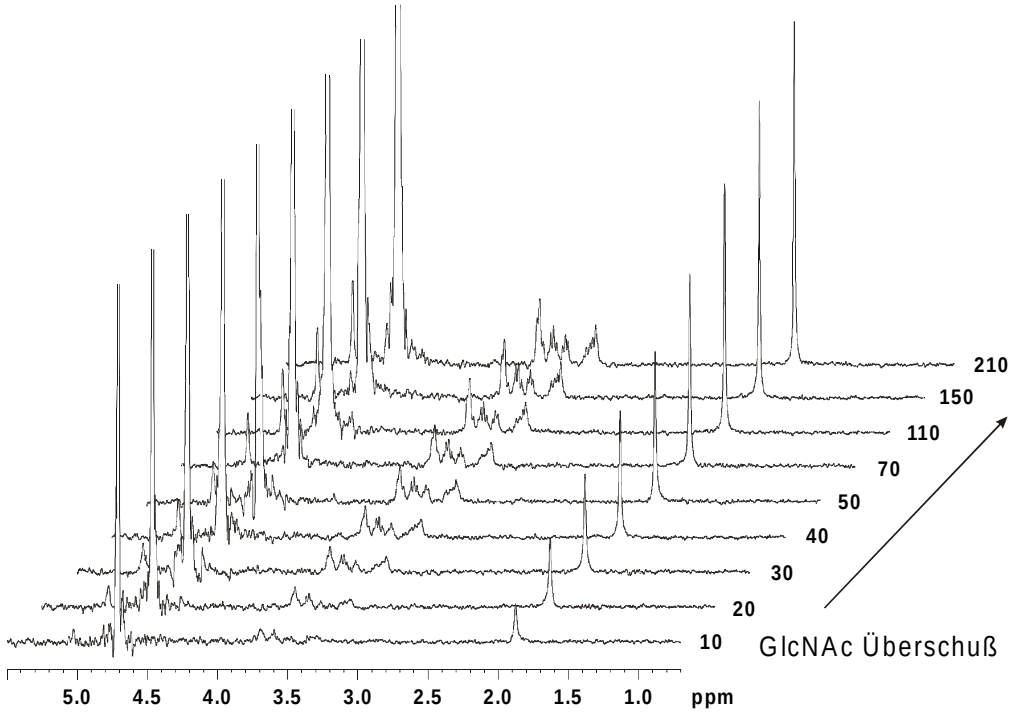

Abbildung 9. Darstellung der STD-Titrations-Spektren von α/β-GlcNAc zu WGA in gestapelter Form. Der Ligandenüberschuss wurde in einem Bereich zwischen 10- und 210-fach gewählt. Die On-Resonance Frequenz wurde auf 7 ppm eingestellt.

Die Intensitäten der STD-Signale steigen besonders im Anfangsbereich der Titration stark an, da bei niedrigen Konzentrationen zum Teil noch nicht alle Bindungsplätze besetzt sind. Die Konzentrationsabhängigkeit der absoluten STD-Signale wird jedoch nicht nur von der Belegung des Rezeptors mit Liganden bestimmt. Bei hohen Überschüssen entsteht eine Limitierung aufgrund der Wechselzahlen, also der Anzahl an Liganden, die während einer festgelegten Zeit gesättigt werden können.

Daher ist im Gegensatz zu anderen NMR-basierten Bindungsstudien, bei der Aufnahme von STD-NMR-Spektren eine Einhaltung bestimmter Liganden-konzentrationen bzw. -überschüsse nicht so kritisch. Im Gegenteil, es ist bei Proben mit undefiniertem Protein- oder Ligandengehalt eher von Vorteil mit einem hohen Überschuss an Liganden zu arbeiten, da dann auch die STD-Signalintensität am grössten ist. Im Falle eines zu hohen Überschusses können zwar nicht alle Ligandenresonanzen gesättigt werden, über die Differenzbildung werden die Signale der nicht-gesättigten Liganden abgezogen und stören die Analyse nicht. Anders als bei den Transfer-NOE-Untersuchungen maskiert ein zu hoher Überschuss daher nicht die Information, ob eine bindende Substanz in der Probe enthalten ist.

Um eine vergleichbare Einheit für die jeweiligen STD-Titrationsexperimente (siehe Kapitel 4.4) und die entsprechenden Saccharid-Lektin-Systeme zu haben, wurde der STD-Amplifikations-Faktor eingeführt. Er ist wie folgt definiert:

$$\text{STD - Amplifikations - Faktor} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \times \text{Ligandenüberschuss}$$

I_0 = Signalintensität im NMR-Spektrum ohne Sättigung des Proteins

I_{sat} = Signalintensität im NMR-Spektrum mit Sättigung des Proteins

I_0- I_{sat} entspricht der Signalintensität im STD-NMR-Spektrum

Die Definition des STD-Amplifikations-Faktors beinhaltet, dass die Protein-konzentration ausgemittelt wird, um einzelne Titrationsexperimente miteinander vergleichen zu können. Der Grund dafür, dass nicht einfach der prozentuale Sättigungsgrad als Einheit gewählt wird, ist, dass dieser Sättigungsgrad sehr stark vom Ligandenüberschuss abhängig ist. Der oben definierte STD-Amplifikations-Faktor ist hingegen direkt ein Mass für die absolute STD-Signalintensität. Eine auch quantitative Vergleichbarkeit ist nur dann gegeben, wenn bei den Liganden die jeweils gleichen Protonen verglichen werden und angenommen wird, dass der

Bindungsmodus sich nicht stark ändert. Zudem können die Daten nicht quantitativ zwischen zwei verschiedenen Rezeptoren verglichen werden, da die Sättigungseffizienz von System zu System verschieden ist. Die Liganden-konzentration sollte ebenfalls deutlich höher sein als die des Proteins, da sonst keine Amplifikation des Proteinsignals möglich ist. Anderenfalls kann eine Situation entstehen, in der sich trotz gleicher Ligandenkonzentration die STD-Amplifikations-Faktoren unterscheiden.

Ein anderer Vorteil, der mit der Einführung des STD-Amplifikations-Faktors zusammenhängt, ist, dass dieser Wert auch beschreibt um wieviel das STD-Signal von einem Ligandenproton gegenüber dem Signal eines Proteinprotons unter den gegebenen Bedingungen verstärkt wird. Dies ermöglicht eine Abschätzung der für die einzelnen STD-NMR-Experimente nötigen Proteinkonzentrationen. Bei einer Proteinkonzentration von 44 µM, wie sie hier vorlag, bedeutet dies für den STD-Amplifikations-Faktor von 16 des Signals der *N*-Acetylgruppe von GlcNAc eine aktive Konzentration von etwa 0.7 mM (siehe Abbildung 10). Da die STD-NMR-Spektren im Differenzmodus aufgenommen werden, muss zusätzlich ein Faktor zwei an Messzeit berücksichtigt werden. Der STD-Amplifikations-Faktor ist also auch eine wertvolle Hilfe zur Abschätzung von Messzeiten und Proteinbedarf.

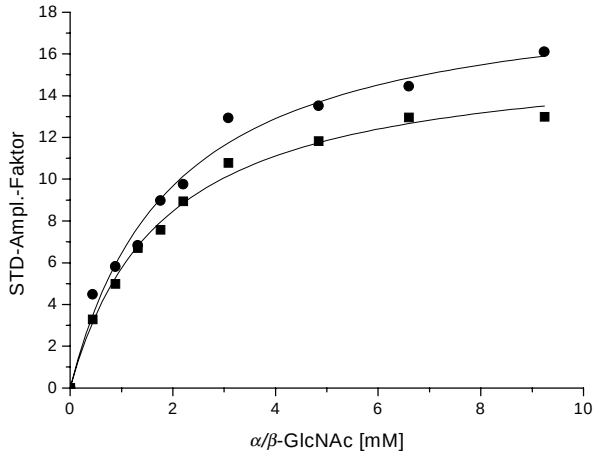

Abbildung 10. Auftragung des STD-Amplifikations-Faktors gegen die Ligandenkonzentration für die α-H1- (Quadrate) und Methylgruppen-Protonen der *N*-Acetylgruppe (Kreise). Diese Kurve wurde durch Integration der in Abbildung 9 dargestellten STD-NMR-Spektren erhalten.

Die Quadrate in Abbildung 10 geben den STD-Intensitätsverlauf des α-H1-Protons, bei einer chemischen Verschiebung von 5.1 ppm, mit zunehmender Ligandenkonzentration wieder. Die Kreise stellen entsprechend den Verlauf der STD-Signalintensität der *N*-Acetylgruppe bei 2 ppm dar. Beide Gruppen zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf und erreichen hohe STD-Amplifikations-Faktoren. Die STD-Signalintensität des anomeren Protons streut über einen gewissen Bereich, was durch die Nähe dieser Resonanz zum HDO-Signal zu erklären ist. Die Ausläufer der HDO-Resonanz stören die Basislinie in diesem Frequenzabschnitt in einem höheren Maße. Die Intensitäten der beiden abgebildeten Signale erreichen bei grossen Ligandenkonzentrationen STD-Amplifikations-Faktoren von weit über 12 bzw. 16. Dies ist charakteristisch für Liganden, die sich im schnellen Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand befinden. Dadurch kann das Ligandensignal um ein Vielfaches gegenüber dem Proteinsignal amplifiziert werden.

Bestimmung des Bindungsepitops

Die STD-NMR-Spektren zeigen eine Abhängigkeit der Signalintensität, die hauptsächlich vom Abstand zwischen Proteinprotonen und den Ligandenprotonen abhängig ist.

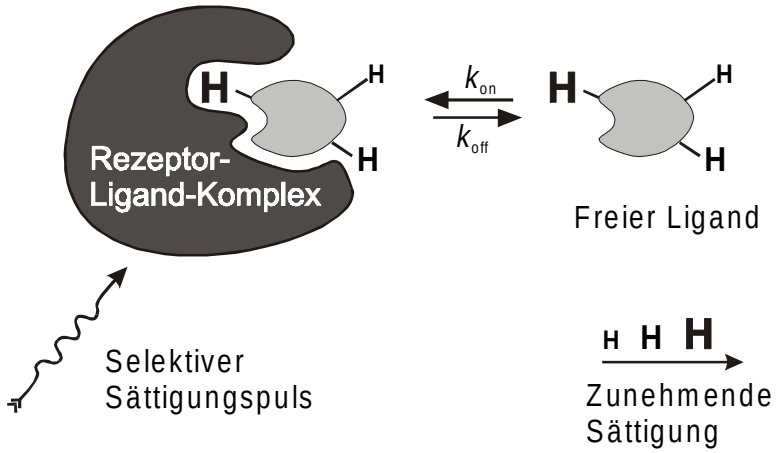

Abbildung 11. Illustration des STD-Experiments zur Bestimmung von Bindungsepitopen des Liganden. Die Regionen des Liganden, die in naher räumlicher Umgebung zu Proteinprotonen sind, zeigen die grösste Sättigung und sind hier mit dem grossen H gekennzeichnet. Je weiter entfernt von Proteinprotonen die Ligandenprotonen sind, desto geringer fällt die Sättigung aus und um so kleiner wird das H.

Abbildung 11 illustriert diesen Zusammenhang. Je näher ein Ligandenproton an der Proteinbindungstasche sitzt, desto grösser wird die Sättigung dieses Protons

ausfallen. Dies hängt mit der Abstandsabhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate zusammen. Da es diese Kreuzrelaxation zwischen Protein- und Ligandenprotonen im gebundenen Zustand ist, welche die Sättigung überträgt, können STD-NMR-Spektren auch dazu verwendet werden, das Bindungsepitop des Liganden zu bestimmen. Die STD-Signale von Molekülgruppen innerhalb eines Liganden, die einen hohen Beitrag zur Bindung haben, liefern grössere Intensitäten. Solche STD-Signale von Gruppen, die weiter entfernt sind, liefern dementsprechend kleinere Intensitäten (*83*, *94*). Eine detailliertere Diskussion der auftretenden Effekte wird in Abschnitt 4.4 erfolgen.

Für die Bestimmung des Bindungsepitops wurde in diesem Fall das STD-NMR-Experiment bei einer Einstrahlfrequenz von 6.6 ppm gewählt. Nur vier Resonanzen von dem Anomerengemisch von GlcNAc konnten einzeln integriert werden. Es handelte sich dabei um die Signale der beiden anomeren Protonen, das β-H2 Proton und das Signal der *N*-Acetylgruppe, wobei auch dies einem gemittelten Signal der α- und β- anomeren Verbindung entsprach. Aufgrund der sehr starken Überlappung der Signale der α- und β-Anomeren im Bereich der Ringprotonen, konnte dieser Bereich nicht quantitativ zur Aufklärung des Bindungsepitops herangezogen werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass die β-H1 Resonanz von GlcNAc in den STD-NMR-Spektren kaum Intensität besitzt. Obwohl WGA die β-1-4 verknüpften Oligomere von GlcNAc erkennt, hat das entsprechende β-anomere Proton beim Monosaccharid offenbar kaum Kontakt zur Proteinoberfläche. Hier ist wichtig zu erwähnen, dass das Anomerenverhätnis von α zu β hier bei etwa 4 zu 3 liegt. Die verringerte Intensität ist somit nicht allein durch die niedrigere Konzentration des β-Anomeren zu erklären.

Die Region der Ringprotonen zeigte im Mittel STD-Amplifikations-Faktoren, die etwa halb so gross waren wie die der *N*-Acetylgruppe. Einzig die α- und β-H2-Protonen hatten in den STD-NMR-Experimenten einen ähnlich hohen STD-Amplifikations-Faktor wie die *N*-Acetylgruppe. Schon die beiden α- und β-H3-Protonen fallen um etwa 50% gegenüber den H2-Protonen in ihrer Intensität ab. Das determinierende Epitop bei der Bindung des Monosaccharids ist folglich eher dem reduzierenden Ende des Monosaccharids zuzuordnen. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den von K. Umemoto *et al.* gemachten Untersuchungen überein (*50*). Auch die *N*-Acetylgruppe hat einen entscheidenden Beitrag zur Bindungsaffinität,

was ebenfalls von den in der Literatur gefundenen Daten gestützt wird (*50, 95*). Wobei zum Teil die Studien mit dem WGA eng verwandten Lektinen, wie Hevein (*96*) und den B und C Bindungsdomänen des *barley* Lektins (*97*) durchgeführt wurden. In der Literatur wurde für die Bindungsstudien immer Chitobiose – also das *β*-1-4-verknüpfte Disaccharid verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die nicht-reduzierende Zuckereinheit die wichtigeren Kontakte zur Bindungstasche hat, in sehr guter Übereinstimmung zu unseren Daten. Aus dem hier vorliegenden Anomerengemisch können keine Angaben gemacht werden, ob eines der beiden Anomeren stärker bindet.

Die von C. S. Wright veröffentlichten Röntgenstrukturuntersuchungen machten deutlich, dass bei der Chitobiose der nicht-reduzierende Zucker einen grösseren Beitrag zur Bindung besitzt. Hier sind besonders die Wasserstoffbrücken der 3´-Hydroxygruppe und des 2´ *N*H-Protons zu benennen, die sich auch bei allen anderen Untersuchungen als entscheidend herausstellten *(59, 60)*. Die Bedeutung der 3-OH-Gruppen konnte in den STD-NMR-Experimenten nicht wiedergefunden werden. Man darf dabei nicht vergessen, dass einzig die Nähe von Proteinprotonen zu Ligandenprotonen ausschlaggebend für die Grösse des STD-Amplifikations-Faktors ist und daher über die Bedeutung von Wasserstoffbrücken nur indirekt Aufschluss erhalten werden kann.

Kronis und Carver untersuchten die Lektin-Saccharid-Wechselwirkung hauptsächlich unter thermodynamischen und kinetischen Aspekten. Sie untersuchten die Bindung von *N*-Acetyl-sialyllactose gegenüber WGA. Wie schon oben beschrieben bindet letzterer um einen Faktor 2-3 schwächer als GlcNAc. Dennoch zeigen ihre Untersuchungen einige für Zucker typischen Merkmale auf. (*98-100*). Sie wiesen den Hauptanteil der Bindungsaffinität der Ausbildung von spezifischen Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kontakten zu. Der negative Entropie-Term in diesem System zeigt, dass eine ausgeprägte Enthalpie-Entropie-Kompensation vorliegt. Ihren Berechnungen zu Folge würde eine Reduzierung des Entropie-Termes um nur 50%, zu einem etwa mikromolaren Binder führen – im Gegensatz zu dem hier vorliegenden millimolaren Binder. Diese Entropie-Barriere impliziert, dass der freie Zustand einen höheren Grad der Unordnung besitzt als der gebundene. Die Reduzierung der Unordnung kann dabei sowohl am Liganden, als auch am Protein stattfinden (*101)*.

STD-NMR-Experimente in H_2O

Wie bei dem vorherigen Experiment wurde eine Probe einer Mischung aus WGA und GlcNAc eingesetzt. In diesem Fall handelte es sich jedoch nicht um eine Substanzmischung und als Lösungsmittel wurde eine 9 zu 1 Mischung von H_2O zu D_2O verwendet. Der Einsatz der standardmässig verwendeten Wasserunterdrückung durch eine Vorsättigung der Wasserresonanz ist in diesem Fall nicht möglich. Die Vorsättigung der Wasserresonanz einer H_2O-haltigen Probe erfolgt mit etwa der gleichen Leistung und Dauer wie die STD-Vorsättigung des Proteins, was eine deutliche Erniedrigung der Empfindlichkeit von STD-NMR-Spektren zur Folge hätte. Sowohl im On-Resonance, als auch im Off-Resonance Spektrum würde das Protein eine starke Sättigung erfahren, wodurch der Intensitätsunterschied zwischen dem On und dem Off-Resonance Experiment zunichte gemacht wird.

Ein alternative Wasserunterdrückung bietet hier das WATERGATE Pulsprogramm aus der Standard Bruker Pulsprogramm Bibliothek (*102-104).* Es verwendet eine Serie von 6 Hartpulsen – dem sogenannten 3-9-19 *Pulssandwich,* um die Inversion einer definierten Region zu erreichen. Hierbei kann das Inversionsfenster so gewählt werden, dass genau die Wasserresonanz ausgespart bleibt. Ein Gradient vor der Serie von Hartpulsen sowie ein weiterer Gradient mit gleichem Vorzeichen nach dem *Pulssandwich* führen dazu, dass nur die invertierte Region im Spektrum Signale erzeugen. Da die Wasserregion ausgespart wurde, liefert sie im WATERGATE-Spektrum keine Signale. Ein weiterer Vorteil ist, dass die WATERGATE-Pulsfolge erst ganz am Schluss der Sequenz liegt und somit nicht die Vorsättigung des Proteins behindert.

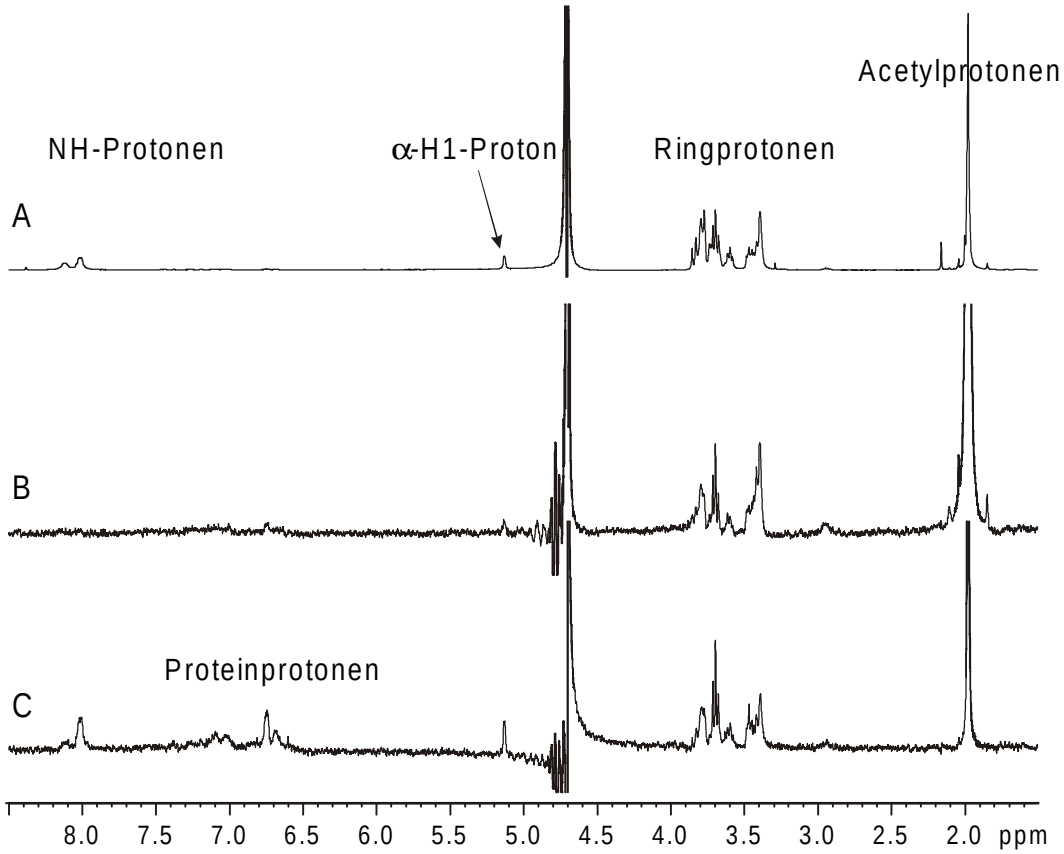

Abbildung 12. A) Referenzspektrum einer Mischung von WGA (76 µM) und GlcNAc (100-facher Überschuss; 7.5 mM). B) STD-NMR-Spektrum bei einer On-Resonance Einstrahlung bei 0.6 ppm. C) STD-NMR-Spektrum einer Mischung von WGA und GlcNAc bei einer On-Resonance Einstrahlung bei 6.6 ppm.

Abbildung 12 zeigt das ^{1}H-WATERGATE-Referenzspektrum in (A) sowie zwei STD-NMR-Spektren mit unterschiedlichen On-Resonance Einstrahlfrequenzen. (B) zeigt das STD-NMR-Experiment *std19slsp* bei einer Einstrahlung bei 0.6 ppm und (C) das STD-NMR-Experiment mit Einstrahlung bei 6.6 ppm. Die Qualität der in H_2O gemessenen STD-NMR-Experimente ist sehr gut. Dieses Pulsprogramm wurde auch zur Untersuchung von Peptiden und Glycopeptiden in Wechselwirkung mit dem monoklonalen Antikörper SM3 verwendet (*105*).

Der Unterschied, der durch den Wechsel der Einstrahlfrequenz hervorgerufen wird, ist erheblich. Anschaulich wird dies anhand der Signale der NH-Protonen bei 8 ppm – sowie der Protonen der Methylgruppe bei 2 ppm. Im STD-NMR-Experiment (B) haben die beiden NH-Protonen von α- und β-GlcNAc keine messbare Intensität, während das Signal der Methylgruppe ein extrem grosses STD-Signal liefert. Anders im STD-NMR-Experiment (C), hier hat die Methylgruppe eine um den Faktor 9

verminderte Intensität gegenüber Spektrum (B), während die beiden NH-Protonen nunmehr eine Intensität aufweisen, die etwa dem Sättigungsgrad des anomeren Protons entspricht.

Hervorzuheben ist hier die Tatsache, dass offenbar keine Spin-Diffusion innerhalb des Liganden stattfindet, während er sich im gebundenen Zustand befindet. Obwohl die Methylgruppe im STD-NMR-Spektrum (B) einen prozentualen Sättigungswert von 27% erreicht, erfahren die NH-Protonen keine Sättigung. Der Abstand der NH-Protonen zu denen der Methylgruppe liegt unter 5 Å, der Magnetisierungstransfer im gebundenen Zustand sollte also möglich sein. Der 100-fache Überschuss an Ligand und die hohe Wechselzahl des Liganden zwischen freiem und gebundenem Zustand sind jedoch offenbar gross genug, um diese intramolekulare Spin-Diffusion zu unterbinden.

Es besteht also eine Abhängigkeit zwischen der Einstrahlfrequenz und der STD-Intensität der Ligandensignale. Ist diese Abhängigkeit einzig auf die unterschiedliche Sättigungseffizienz der Aromaten- bzw. Aliphatensignale des Proteins zurückzuführen, wie von *Umemoto et al.* (*50*) postuliert wurde? Es ist unwahrscheinlich, dass zwar die Methylgruppe der *N*-Acetylgruppe einen sehr dichten Kontakt zu aliphatischen Gruppen an der Proteinoberfläche hat, das *N*H-Proton der Acetylgruppe hingegen so weit entfernt liegt, dass es keinerlei Sättigung von diesen Gruppen bekommt (siehe Spektrum (B) in Abbildung 12). So wie die Daten sich in diesem Fall präsentieren, scheint zusätzlich zur Abstands- auch eine Frequenzabhängigkeit zu bestehen. Diese liesse sich mit der folgenden Beziehung beschreiben: Die Sättigung von Proteinresonanzen einer definierten chemischen Verschiebung führt bei Ligandenresonanzen, die eine ähnliche chemische Verschiebung besitzen, zu einer effizienteren Sättigung. Besonders bei dem hier untersuchten Lektin WGA und dem in Abschnitt 4.3.2 untersuchten Lektin AAA ist diese Frequenzabhängigkeit sehr stark ausgeprägt. Bei diesen Systemen wurden starke Linienverbreiterungen registriert, die durch den chemischen Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand verursacht werden (*106*).

Interessanterweise hatte die Einstrahlfrequenz bei den in Abschnitt 4.4 diskutierten RCA_{120}-Saccharid-Komplexen nur einen minimalen Einfluss auf die relativen STD-Intensitäten. Dort wurden keine Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen freiem und gebundenem Zustand registriert und auch die Linienverbreiterung war nicht so stark ausgeprägt. Ob diese starke Linien-

verbreiterung der Grund für die Abhängigkeit von der Einstrahlfrequenz ist, muss noch getestet werden.

4.3 *Aleuria aurantia* Agglutinin

Das Lektin *Aleuria aurantia* Agglutinin (AAA) bindet spezifisch Saccharide, die terminale α-L-Fucose enthalten (*107*). Das Lektin ist ein Homodimer mit einer Molmasse von ca. 72 kDa und besitzt je Monomer eine Saccharid-Bindungsdomäne. Als Rezeptor eignet es sich gut für STD-NMR-Experimente, da es eine ausgeprägte Spin-Diffusion besitzt. Auch die Dissoziationskonstanten der vermessenen Fucose-haltigen Saccharide befinden sich in einem Bereich, der sich gut für die STD-NMR-Untersuchungen eignet. Drei Saccharide unterschiedlicher Grösse, Methyl-α-L-fucosid, 2´-L-Fucosyl-D-lactose und das Lewis^b-Hexasaccharid (Difucosyl-Hexaose) wurden mit STD-NMR-Experimenten untersucht.

4.3.1 Methyl-α-L-fucosid

1D STD-Screening-Experimente

Das Monosaccharid α-L-FucOMe bindet mit einer Dissoziationskonstante K_D von 1.6×10^{-5} M an das Lektin AAA – und liegt somit in einem Bereich der sich gut mit der STD-NMR-Methode analysieren lässt (*108*).

Abbildung 13 (A) zeigt das NMR-Spektrum einer Mischung aus 16 verschiedenen Zuckern, von denen ausschliesslich α-L-FucOMe von dem Lektin erkannt wird. Die Mischung bestand aus folgenden Sacchariden: α-L-FucOMe; α-D-ManOMe; α-D-GalOMe; β-D-GalOMe, β-D-Gal-(1→4)-β-D-GlcOMe; β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-OAllyl; D-Raffinose; D-Trehalose; D-Maltose; D-Xylose; D-Fructose; D-Galactose; D-Sorbose; Cellobiose; Mannitol; D-Lactose. Die einzigen dispergierten Signale im Referenzspektrum, sind die im Bereich der anomeren Protonen und die H6-Methylgruppe der Fucose. Alle anderen Protonen der Saccharide sind über den Bereich von 3.2 bis 4.2 ppm verteilt – und somit nicht zuzuordnen. Es handelt sich damit, NMR-spektroskopisch gesehen, auch hier um eine anspruchsvolle Substanzmischung aus sehr ähnlichen Verbindungen. Eine NMR-Bindungsstudie – beispielsweise über Linienverbreiterungsanalysen – zur eindeutigen Identifizierung der bindenden Substanz ist somit ausgeschlossen. Die Differenzbildung im STD-

NMR-Spektrum ist hier von grossem Vorteil. Der Vergleich der Signalintensitäten der On- und Off-Resonance-Spektren ist für die Analyse von Mischungen ungeeignet, da nur über die Differenzbildung die geringen Unterschiede in den überlagerten Regionen sichtbar gemacht werden können.

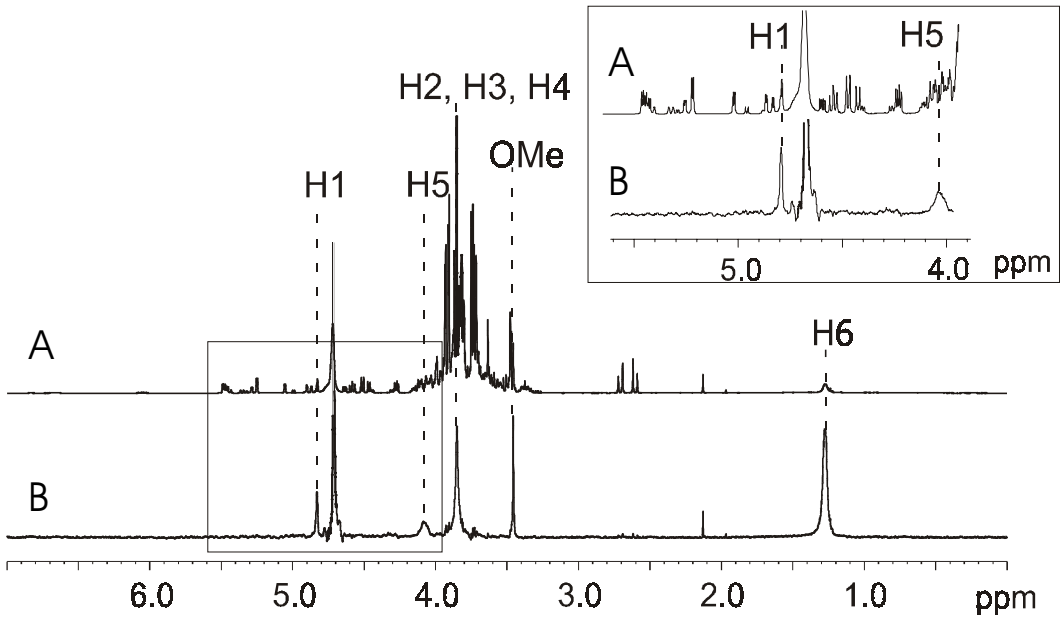

Abbildung 13. A) Referenzspektrum von Methyl-α-L-fucosid (5 mM) und einer Mischung aus 15 weiteren Mono-, Di-, und Trisacchariden (je 3 mM, siehe Text), die keine Fucose-Reste enthalten. Der vergrösserte Bereich enthält die Resonanzen der anomeren Protonen und des H5-Protons der Fucose. Alle Resonanzen nichtbindender Moleküle sind im STD-NMR-Spektrum B) durch Subtraktion eliminiert.

Das nicht maßstabsgetreu dargestellte STD-NMR-Spektrum (B) zeigt nur Signale des Monosaccharids α-L-FucOMe, alle Resonanzen der anderen 15 Substanzen aus Spektrum (A) wurden über die Differenzbildung ausgelöscht. Diese Saccharide hatten während der Sättigungsdauer keinen Kontakt zum Protein. Das resultierende STD-NMR-Spektrum enthält somit einzig Signale des bindenden Monosaccharids α-L-FucOMe. Von entscheidender Bedeutung ist hier, dass selbst der im Referenzspektrum stark überlagerte Bereich der Ringprotonen gut auswertbar ist. Sogar die H2-, H3- und H4-Protonen, die bei etwa 3.85 ppm liegen und vollständig von den anderen Ringprotonen verdeckt wurden, können nun identifiziert werden. Das Signal der H6-Methylprotonen bei 1.27 ppm ist ebenfalls leicht bestimmbar. Der vergrösserte Ausschnitt in Abbildung 13 zeigt nur den Bereich der anomeren Protonen. Alle Resonanzen der nicht-bindenden Saccharide wurden auch hier vollständig subtrahiert – übrig bleiben nur die Fucose-Signale des

H1-Protons, bei 4.83 ppm, und des H5-Protons, bei 4.1 ppm. Selbst in der Nähe des HDO-Signals funktioniert die Subtraktion problemlos.

Die hohe Empfindlichkeit dieser Methode wurde dadurch demonstriert, dass für diese Probe schon ca. 14 nmol AAA (bezogen auf das Dimer) ausreichten. Dies entspricht bei 500 µL Lösungsmenge einer Konzentration an Bindungsstellen von 56 µM (bei einer Bindungsstelle pro Monomer). Für die hier gezeigten STD-NMR-Experimente wurde ein 90-facher Überschuss an α-L-FucOMe benutzt, einer 5 mM Ligandenkonzentration entsprechend. Alle anderen Saccharide wurden in einer 3 mM Konzentration vorgelegt. Für das hier gezeigte STD-NMR-Experiment wurden insgesamt 64 Scans akkumuliert, was einer Akquisitionszeit von ca. 6 Minuten entspricht. Das STD-NMR-Spektrum hat dennoch eine gute Signalintensität und ist gut auswertbar.

2D STD-Screening-Experimente

2D STD-TOCSY-Spektrum: Erneut wurde die Mischung aus 16 Sacchariden, die schon für die 1D STD-NMR-Spektren zum Einsatz kam, vermessen. Die beiden TOCSY-Spektren sind in Abbildung 14 dargestellt. Spektrum (A) zeigt das stark überlagerte Referenzspektrum, bei dem einzelne Spuren der Saccharide aus der Region der anomeren Protonen identifiziert werden können. Charakteristisch für die Fucose ist der Kreuzpeak der H6-Methylprotonen auf die H5-Protonen, von 1.27 ppm auf 4.1 ppm, der als einziger eindeutig zuweisbar ist. Bei dem STD-TOCSY-Spektrum (B) sind, wie schon bei dem 1D STD-NMR-Spektrum, fast alle Signale ausgelöscht. Identifizierbar sind hier die Kreuzpeaks von dem H1- auf das H2-Proton von 4.83 ppm auf 3.85 ppm und der Kreuzpeak vom H5-Proton auf die H6-Methylprotonen, wobei das Diagonalsignal des H5-Protons, vermutlich wegen seiner grossen Breite, im Spektrum (B) nicht sichtbar ist. Die H2-, H3- und H4- Protonen liegen bei 3.85 ppm sehr dicht beisammen und zeigen dadurch untereinander keine Kreuzsignale. Zudem reicht der TOCSY-Transfer im Spinsystem der Fucose nur von dem H1-Proton bis zu dem H4-Proton, da die $^{3}J_{H4,\ H5}$ Kopplung unter 2 Hz liegt, wodurch die Effizienz des TOCSY-Transfers so drastisch abnimmt, dass keine Kreuzsignale beobachtbar sind. Auch die *O*-Methylgruppe ist von den anderen Spinsystemen isoliert und nur das Diagonalsignal bei 3.45 ppm ist detektierbar.

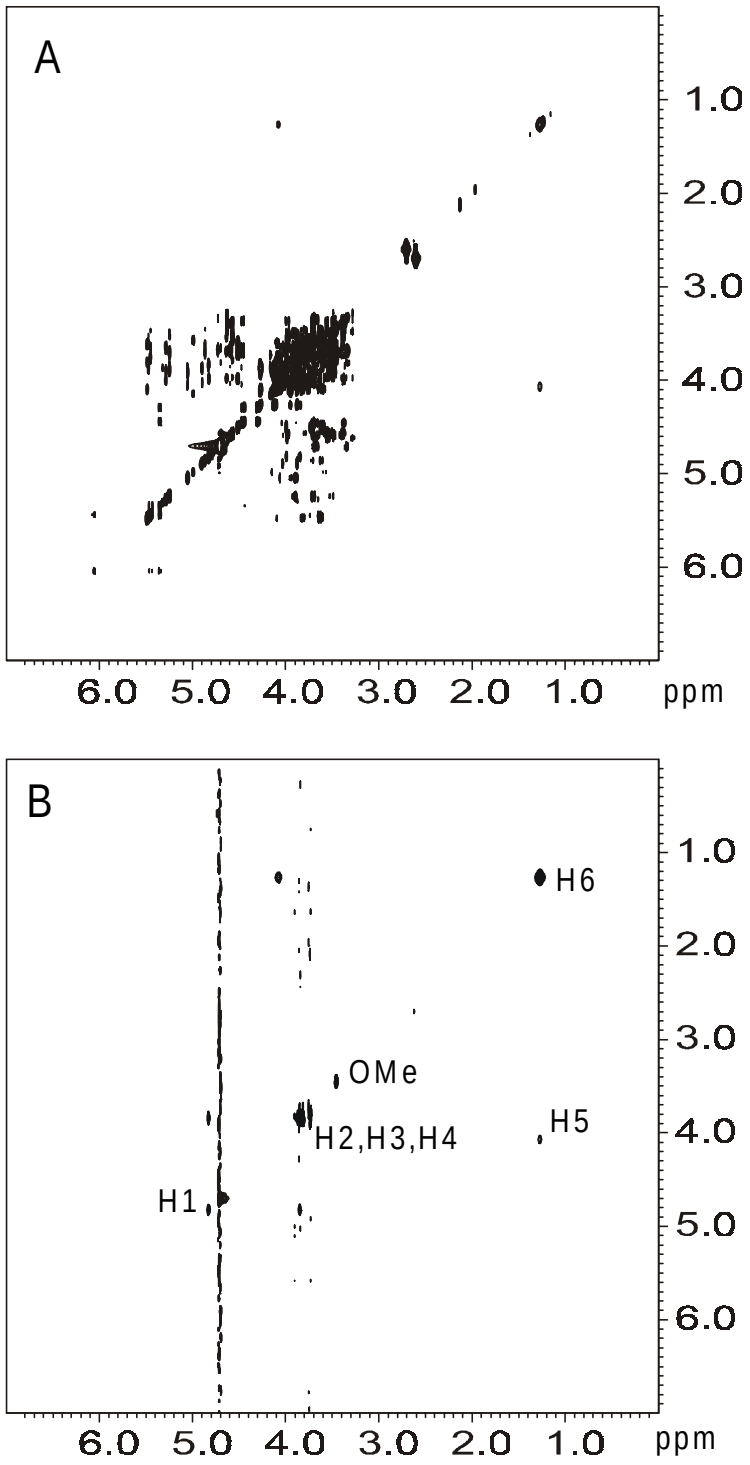

Abbildung 14. A) Referenz TOCSY-Spektrum, B) STD-TOCSY-Spektrum einer Mischung aus 15 nicht-bindenden Sacchariden und dem bindenden α-L-FucOMe (5 mM) in Gegenwart von 56 µM AAA.

Die STD-TOCSY-Spektren zeigen eine ausgezeichnete Unterdrückung von Signalen nichtbindender Substanzen. Sämtliche Kreuzsignale der nicht-bindenden

Substanzen wurden durch die Subtraktion vollständig eliminiert. Selbst die Diagonalsignale lassen sich, bis auf das des H5-Protons, noch gut analysieren. Dadurch wird gezeigt, dass auch grosse Substanzmischungen mit 2D STD-Experimenten auf Bindungsaktivität getestet werden können.

2D STD-HSQC-Spektrum: Die Skala der chemischen Verschiebung ist bei Protonen stark limitiert, da sie sich im Normalfall auf den Bereich zwischen 0 und 10 ppm beschränkt. Eine Erweiterung des STD-Verfahrens in Richtung heteronuklearer Experimente ist daher wünschenswert. Besonders in Fällen, wo eine eindeutige Aufklärung der Ligandensignale auf der Protonenskala wegen Überlappung nicht mehr möglich ist, eignen sich ^{13}C- oder ^{15}N-Spektren besonders gut.

Eine wichtige Überlegung bei der Aufnahme von STD-NMR-Spektren ist, dass für grosse Moleküle der heteronukleare NOE sich dem Wert 0 nähert. Der homonukleare NOE bei Protonen ist für kleine Moleküle positiv und erreicht einen Wert von +50%. Bei mittelgrossen Molekülen hat der NOE einen Nulldurchgang und bei Makromolekülen erreicht er einen Wert von –100%. Da bei STD-Experimenten der intermolekulare NOE von Proteinen auf kleine Liganden im gebundenen Zustand beobachtet wird, kommt es zu einer Verringerung der Intensität. Dagegen verringert sich der heteronukleare ^{13}C{^{1}H} NOE von +200% für kleine Moleküle, auf 0% für Makromoleküle. Der ^{15}N{^{1}H} NOE erreicht seinen maximalen Wert von -400% bei kleinen Molekülen und erreicht dann bei grossen Molekülen ebenfalls 0%. Für STD-Messungen ist der intermolekulare NOE entscheidend. Dies hat zur Folge, dass keine heteronuklearen NOEs von Protonen auf ^{13}C oder ^{15}N-Kerne beobachtbar sind. Dennoch lassen sich die auch die chemischen Verschiebungen dieser Kerne aus Mischungen ermitteln, wenn man invers aufgenommene XH-Korrelationsspektren im STD-Modus aufsetzt, wie weiter unten beschrieben wird. Neben Protonen ist der ^{19}F-Kern der Einzige, der häufig vorkommt, die nötige Empfindlichkeit mit sich bringt und bei Makromolekülen einen von Null verschiedenen NOE hat. Dessen NOE hat, wie im ^{1}H-homonuklearen Fall, einen Nulldurchgang und geht von positiven Werten für kleine Moleküle, zu negativen Werten für grosse Moleküle über.

Wie oben aufgeführt, besteht die Möglichkeit heteronukleare STD-NMR-Experimente durchzuführen. Da die STD-NMR-Experimente mit einer Vorsättigung arbeiten, können alle Experimente, die mit einem Anregungspuls auf der

Protonenfrequenz beginnen, zu STD-NMR-Experimenten modifiziert werden. Die geringe natürliche Häufigkeit und Empfindlichkeit von ^{13}C- bzw. ^{15}N-Kernen in der NMR-Spektroskopie haben zu einer Vielzahl von invers aufgenommenen – also Protonen detektierten – NMR-Experimenten geführt. Diese invers aufgenommenen Spektren haben den Vorteil, deutlich empfindlicher als die direkt detektierten ^{13}C- bzw. ^{15}N-NMR-Spektren zu sein. Wir haben hier ein auf Empfindlichkeit optimiertes HSQC-Spektrum so modifiziert, dass es als STD-NMR-Spektrum aufgenommen werden kann (*109*). Die Empfindlichkeits-Erhöhung um einen Faktor von ca. $\sqrt{2}$ ist hier dadurch bedingt, dass zwei zuvor orthogonal zueinander stehende Magnetisierungs-Komponenten refokussiert werden können und somit reine Absorptions-Spektren mit einer verbesserten Empfindlichkeit liefern. Bei allen invers detektierten NMR-Spektren handelt es sich um sogenannte *round trip* Pulssequenzen. Das bedeutet, die erste Anregung erfolgt auf dem Protonenkanal; die so erzeugte Magnetisierung wird auf die ^{13}C-Kerne übertragen und von dort wieder zurück auf die Protonen transferiert, wo sie detektiert werden. Da die erste Anregung auf dem Protonenkanal stattfindet, kann folglich das STD-NMR-Experiment mit einer normalen Protonen-Vorsättigung durchgeführt werden.

In Abbildung 15 sind HSQC-Spektren einer Substanz-Mischung aus 6 Sacchariden dargestellt. (A) zeigt das Referenz- oder Off-Resonance-Spektrum, während in (B) das entsprechende STD-Differenzspektrum abgebildet ist. Aus dem Muster der Resonanzenverteilung lässt sich schnell erkennen, dass es sich um eine Mischung aus Zuckern handelt. Typisch sind hier die ^{13}C-chemischen Verschiebungen um 100 ppm für die anomeren Protonen; desweiteren ist der Bereich der Ringprotonen mit Verschiebungen zwischen 60 und 80 ppm und der aliphatische Bereich mit Signalen um die 20 ppm charakteristisch für Saccharide. Trotz Aufspaltung in zwei verschiedene Dimensionen ist auch hier noch eine deutliche Überlappung im Bereich der Ringprotonen zu verzeichnen.

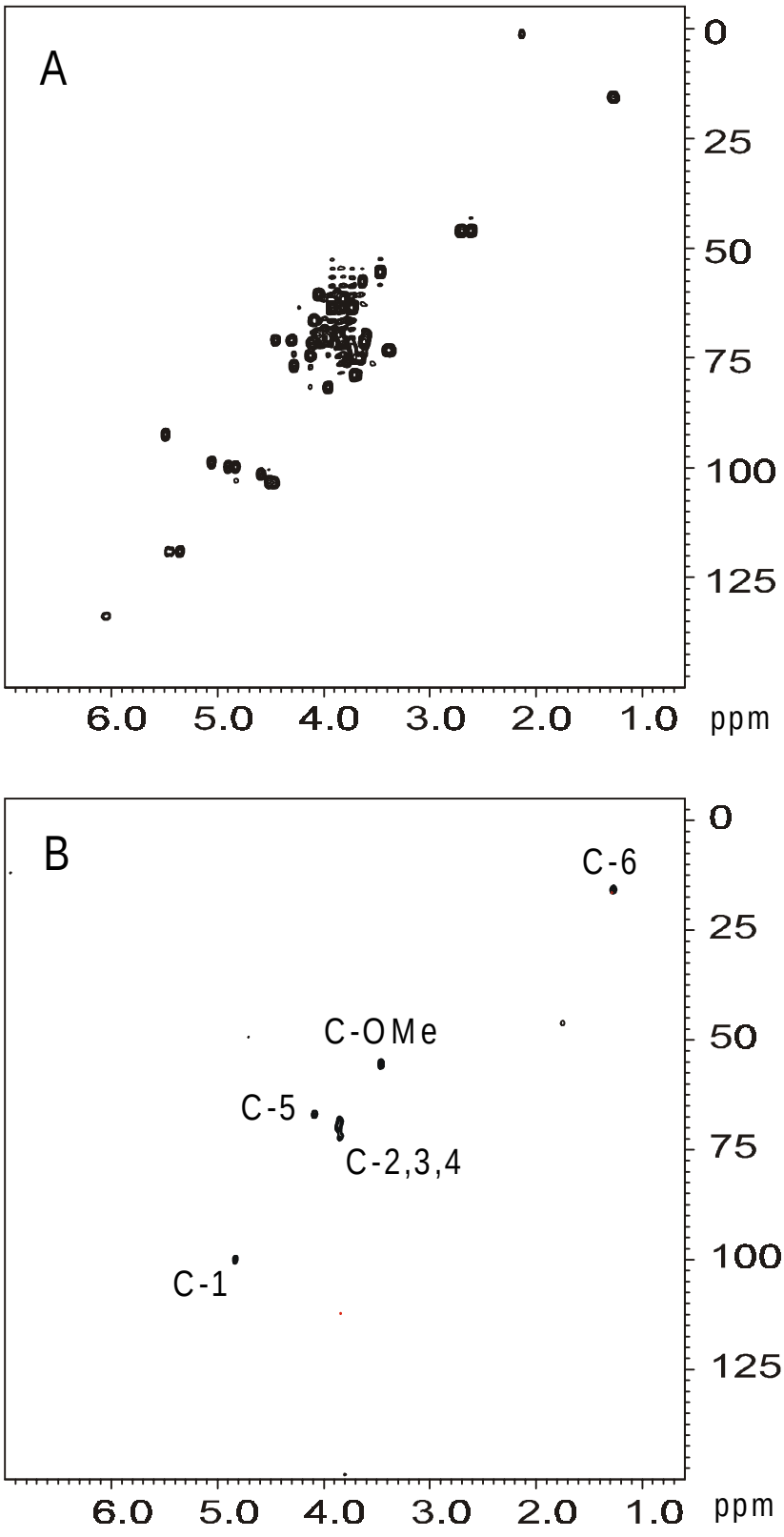

Abbildung 15. A) Referenz HSQC-Spektrum, B) STD-HSQC-Spektrum einer Mischung aus 5 Sacchariden und dem bindenden α-L-FucOMe in Gegenwart von 56 µM AAA.

Das in Abbildung 15 (B) dargestellte STD-HSQC-Spektrum zeigt einzig die Resonanzen der Fucose; die Signale der nichtbindenden Zucker wurden wie bei dem STD-TOCSY-Spektrum subtrahiert. Die C-H-Verschiebung der C1-Position erscheint bei einer $^{13}C/^{1}H$-Verschiebung von 100.1/4.83 ppm, C2 bei 68.5/3.85 ppm, C3 bei 70.0/3.86 ppm, C4 bei 72.1/3.84 ppm, C5 bei 67.1/4.09 ppm, C6 bei 15.9/1.27 ppm und letztlich die *O*-Methylgruppe bei 55.6/3.46 ppm. Durch Aufnahme der STD-HSQC-Spektren lassen sich selbst die auf der Protonenskala stark überlagerten Resonanzen der drei Ringprotonen H2, H3 und H4 aus der Substanzmischung problemlos aufklären. Diese Spektren sind dadurch ein sehr hilfreiches Mittel zur Identifikation von komplexen, bioaktiven Komponenten aus Mischungen.

Die Empfindlichkeit dieser HSQC-Spektren ist relativ zu den normalen XH-Korrelations-Spektren zwar hoch, dennoch wurde für dieses STD-HSQC-Spektrum eine Akquisitionszeit von 60 Stunden benötigt. Solche Spektren eignen sich somit nicht für den routinemässigen Einsatz als Screening-Verfahren – solange mit Liganden gearbeitet wird, die nicht isotopenmarkiert sind. Für nicht isotopenmarkierte Liganden muss ein besonderes Interesse vorliegen, um solche Messzeiten zu rechtfertigen. Bei der hier vorliegenden Mischung hätte das 1D-STD-NMR-Spektrum schon völlig ausgereicht und das war innerhalb weniger Minuten aufgenommen. Dennoch eignete sich diese Probe gut, um das Potential dieser Methode zu demonstrieren. Durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration, der Verwendung von Shigemi-NMR-Röhrchen oder der Aufnahme auf sehr empfindlichen Hochfeld-NMR-Geräten mit Cryo-Probenkopf lässt sich die Messzeit deutlich reduzieren. Somit sollten diese heteronuklearen NMR-Experimente in Zukunft nicht nur gelabelten Liganden vorbehalten sein.

STD-Titrationsexperimente

Das Titrationsexperiment erfolgte durch Zugabe von α-L-FucOMe zu einer AAA-Probe mit ca. 16.5 nmol Fucose-Bindungsstellen (33 µM). Aufgrund extrem starker Linienverbreiterung bei niedrigen Konzentrationen von α-L-FucOMe, konnten erst bei höheren Ligandenkonzentrationen verlässliche Werte erhalten werden. Selbst bei einer Konzentration von 0.5 mM (einem 15-fachen Überschuss entsprechend) waren die Signale des anomeren Protons und des H5-Protons in den STD-NMR-Spektren nur schwer identifizierbar. Auch die anderen Protonen

erreichten erst bei Konzentrationen von 1 mM und mehr eine gut auswertbare Linienform (siehe auch unten im Abschnitt: Einfluss der Bindung auf die chemische Verschiebung). Die STD-Amplifikations-Faktoren bei niedrigen Konzentrationen sind folglich mit einem grösseren Fehler behaftet. Wie bei den vorherigen Titrationen strebt auch hier der STD-Amplifikations-Faktor mit zunehmender Konzentration einem Maximum entgegen. Besonders die intensivsten STD-Signale – hier diejenigen der H6-Methylgruppe und die der drei Ringprotonen H2, H3 und H4 – steigen trotz hoher Ligandenkonzentration weiter deutlich an. Anders die *O*-Methylgruppe: Sie zeigt zum einen nur schwache STD-Amplifikations-Faktoren, und zum anderen ist der Anstieg bei hohen Konzentrationen nur noch sehr gering. Ein typisches Merkmal für eine Gruppe, die nur schwach mit dem Protein in Kontakt steht.

Warum ändert sich das Verhältnis der STD-Intensitäten verschiedener Ligandenprotonen mit zunehmender Konzentration? Für den hier vorliegenden schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala ist eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung, dass bei niedrigen Überschüssen ein einzelner Ligand mehrmals während der Sättigungszeit Kontakt zum Protein haben kann. Somit können auch entferntere Protonengruppen – vermittelt über die sehr stark wechselwirkenden Protonen – gesättigt werden. Protonen, die in unmittelbarem Kontakt zur Oberfläche stehen, werden bei niedrigen Überschüssen zu einem sehr hohen Prozentsatz gesättigt, wie beispielsweise der Abbildung 29 entnommen werden kann. Kommt ein Ligand in die Bindungstasche, der schon vorgesättigte Protonen besitzt, dann können diese Protonen im gebundenen Zustand ihre Sättigung auf Liganden-protonen übertragen, die keine direkte Sättigung vom Protein bekommen können.

Bei hohen Überschüssen sind die STD-Effekte – pro Ligandmolekül gesehen – sehr klein. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein vorgesättigter Ligand in die Bindungsstelle gelangt, sinkt mit zunehmender Konzentration. Protonengruppen des Liganden, die nicht direkt gesättigt werden, haben somit keine Möglichkeit, über schon vorgesättigte Protonen Magnetisierung zu verlieren, da im freien Zustand kein effektiver Sättigungstransfer erfolgt. Beim ersten Kontakt mit dem Protein werden nur die direkt mit dem Protein wechselwirkenden Protonen gesättigt, also solche, die mindestens ein Proteinproton in ≤ 5 Å Entfernung aufweisen. In dem Fall, dass der Ligand ein weiteres Mal am Rezeptor bindet, kann diese Sättigung weitergeleitet werden. Bindet er aufgrund der hohen Ligandenkonzentration jedoch nur einmal, so bleibt die Magnetisierung bei diesem Proton stehen.

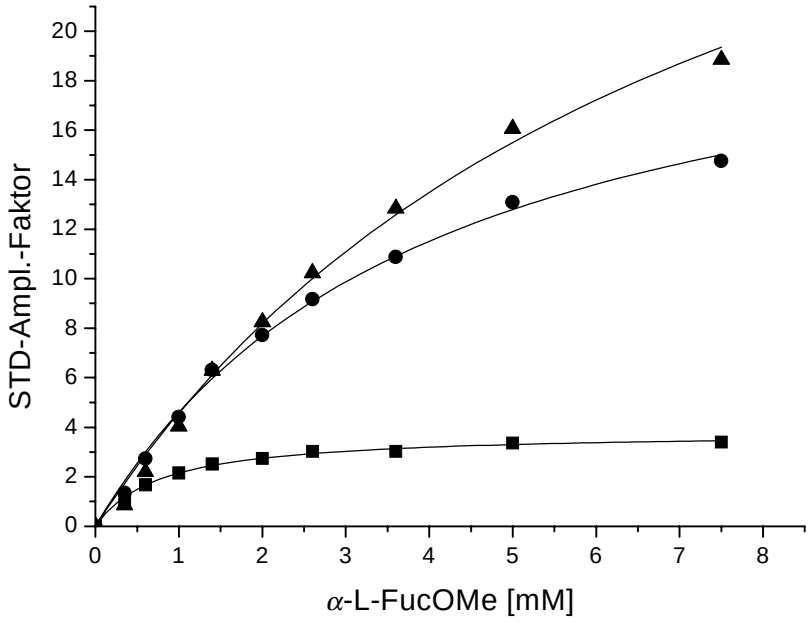

Abbildung 16. Titration von α-L-FucOMe zu einer Probe von AAA (33 µM). Die Dreiecke repräsentieren das Signal der H6-Methylgruppe, die Kreise die gemittelten Signale der H2-, H3-, und H4-Protonen und die Quadrate das Signal der *O*-Methylgruppe. Die Sättigungszeit betrug 2 Sekunden, die On-Resonance Frequenz wurde auf -0.4 ppm und die Off-Resonance Frequenz auf 30 ppm eingestellt.

Die Daten in Abbildung 16 zeigen eine gute Übereinstimmung mit dieser Erklärung. Bei einer Konzentration von 0.5 mM sind die H6-Protonen und die Protonen der *O*-Methylgruppe fast zu gleichen Teilen gesättigt. Hingegen erreicht bei einer Konzentration von 7.5 mM der STD-Amplifikations-Faktor der H6-Methylgruppe einen Wert von 16, während die *O*-Methylgruppe gerade einmal einen Wert von 3 erreicht hat. Mit zunehmender Konzentration laufen die STD-Amplifikations-Faktoren der direkt und der indirekt gesättigten Protonen immer weiter auseinander. Eine eingehende Diskussion dieser Effekte wird in Abschnitt 4.4.3 bei der Titration von β-GalOMe zu einer RCA_{120}-Probe erfolgen (siehe Abbildung 34).

Anders ist die Situation bei stark bindenden Liganden, also solchen, die eine lange Aufenthaltsdauer am Protein besitzen. Hier reicht die lange Aufenthaltsdauer im gebundenen Zustand aus, um die Magnetisierung über reltiv weite Bereiche des Liganden zu verteilen, selbst wenn der Ligand nur einmal in die Bindungstasche

gelangt. Bei solchen Liganden reichen auch hohe Überschüsse nicht aus, um eine Bestimmung des Bindungsepitops durchzuführen.

Den STD-NMR-Experimenten zufolge hat die Fucose bei der Wechselwirkung mit AAA einen sehr hohen k_{off}-Wert. Die STD-Amplifikations-Faktoren von α-L-FucOMe erreichen zum Teil Werte von über 15 Einheiten. Das sind Werte die selbst bei dem sehr schwachen Binder α-GalOMe und RCA_{120} nicht auftraten (Kapitel 4.4.2), wobei unklar ist, inwieweit sich diese Werte für Proteine unterschiedlicher Grösse vergleichen lassen. Eindeutiger ist, dass sich auch sehr hohe Konzentrationen noch effektiv sättigen lassen, was nur mit einem schnellen Durchsatz an Molekülen erklärbar ist.

STD-Sättigungszeitexperimente

Bei der höchsten eingesetzten α-L-FucOMe Konzentration (7.5 mM) wurde die Abhängigkeit der STD-Amplifikations-Faktoren verschiedener Resonanzen von der Sättigungszeit untersucht.

Die STD-Intensität der Signale der H6-Methylgruppe steigt eindeutig am schnellsten an und erreicht schon nach etwa 3 Sekunden ein Plateau. Die weitere Verlängerung der Sättigungszeit über 3 Sekunden bewirkt nur noch geringfügige Steigerungen der STD Intensität. Zudem hat dieses Signal nicht die Verzögerung, die bei den anderen beiden abgebildeten Resonanzen beobachtbar sind. Der Kurvenverlauf der STD-Signale der H6-Methylgruppe ist charakteristisch für Gruppen, die stark und direkt mit Proteinprotonen wechselwirken. Der Kurvenverlauf der STD-Signale der anderen beiden Gruppen zeigt bei kurzen Sättigungszeiten eine niedrigere Intensität und hat einen sigmoiden Verlauf. Besonders die STD-Signale der *O*-Methylgruppe zeigen eine starke Verzögerung und erreichen zudem nur geringe STD-Amplifikations-Faktoren – ein deutlicher Hinweis auf eine grössere Entfernung zu Proteinprotonen.

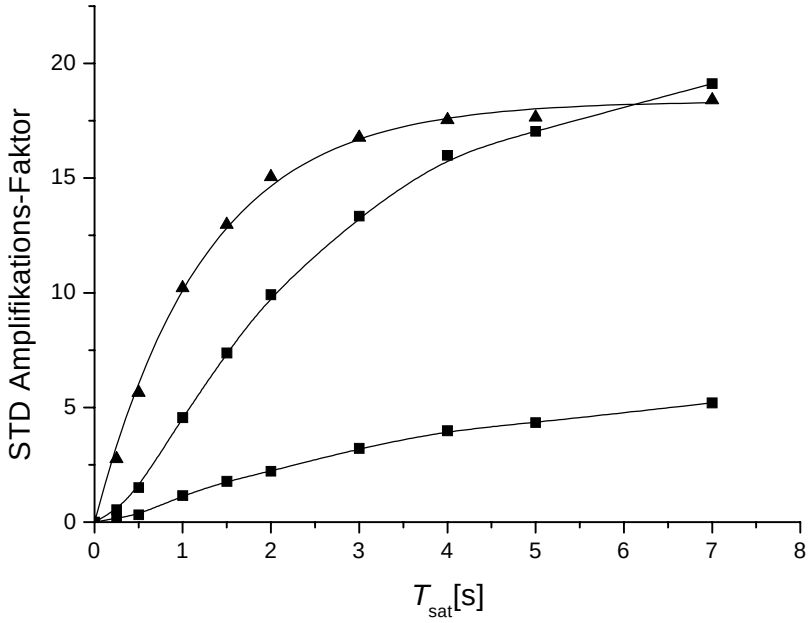

Abbildung 17. Auftragung der Sättigungszeit T_{sat} gegen den STD-Amplifikations-Faktor. Dreiecke repräsentieren die Intensitäten der H6-Methylgruppe, Kreise die der *O*-Methylgruppe und Quadrate die gemittelten Intensitäten der H2-, H3- und H4-Protonen. Die Konzentration an AAA betrug 33 μM, die an α-L-FucOMe 7.5 mM.

Interessant ist der Kurvenverlauf der Signale der H2-, H3- und H4-Protonen, der einem gemittelten Wert der drei Signale entspricht. Sie zeigen bei kurzen Sättigungszeiten eine kleine Verzögerung, was auf eine zumindest teilweise indirekt erhaltene Sättigung schliessen lässt. Andererseits erreichen diese Protonen bei langen Sättigungszeiten von 7 s sehr hohe STD-Amplifikations-Faktoren, die diejenigen der H6-Methylgruppe sogar noch übertreffen. Da es sich um ein gemitteltes Integral der drei Protonen handelt, kann nicht bestimmt werden, ob alle drei Protonen oder nur einzelne der drei Protonen eine längere T_1-Relaxationszeit haben als die H6-Methylgruppe. Der Gleichgewichtszustand wird daher erst bei längeren Sättigungszeiten erreicht und die STD-Amplifikations-Faktoren erlangen höhere Werte, wie der obigen Abbildung zu entnehmen ist.

Bestimmung des Bindungsepitops

Die Daten aus den Titrations- und Sättigungszeitexperimenten ergänzen sich zu einem einheitlichen Bild. Den grössten Sättigungsgrad erreicht die H6-

Methylgruppe. Die STD-Intensität steigt schon bei kurzen Sättigungszeiten sehr stark an, während die Signale der anderen Protonen eine leichte zeitliche Verzögerung besitzen. Auch bei der Titration besass diese Gruppe immer den höchsten STD-Effekt. Die Signale der drei Ringprotonen sind nicht getrennt voneinander untersuchbar und erreichen erst bei langen Sättigungszeiten ihren Maximalwert, was ein Indiz für einen grösseren Abstand zur Proteinoberfläche ist.

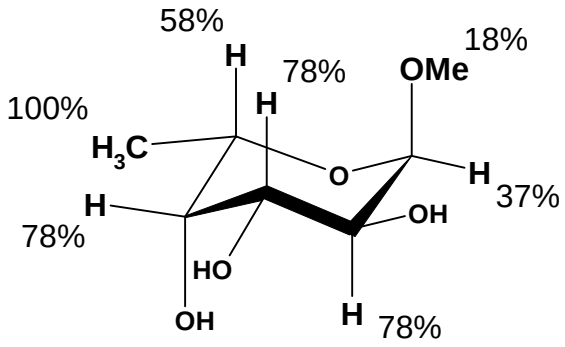

Abbildung 18. Relative Signalintensitäten von α-L-FucOMe bestimmt aus dem STD-NMR-Titrationsexperiment bei der höchsten Ligandenkonzentration von 7.5 mM (Abbildung 16), bei einer On-Resonance Frequenz von -0.4 ppm. Die Sättigungszeit betrug 2 Sekunden. Das grösste Signal – hier das der H6-Methylgruppe – bekam den Wert 100% zugeteilt. Alle anderen Signalintensitäten wurden zu diesem Signal referenziert.

Normiert man den maximalen STD-Effekt mit 100% auf die H6-Methylgruppe, so erlangen die drei STD-Signale der H2-, H3- und H4-Protonen einen relativen STD-Effekt von 78% bei einer Sättigungszeit von 2 Sekunden und einer Konzentration von 7.5 mM. Den niedrigsten STD-Effekt von nur 18% und die am stärksten ausgeprägte Verzögerung hat die Resonanz der *O*-Methylgruppe, die am reduzierenden Ende liegt. Die Spezifität von AAA kann daher dem nicht reduzierenden Ende der Fucose zugewiesen werden. Dies steht in Einklang zu der in der Literatur beschriebenen Spezifität des Lektins gegenüber terminalen Fucosen (*62, 63, 107*).

Einfluss der Bindung auf die chemische Verschiebung

Es wurde eine Untersuchung der chemischen Verschiebung bei Titration von α-L-FucOMe zu einer Probe von AAA durchgeführt. Denn eine extreme Linienverbreiterung könnte bewirken, dass trotz des grossen Abstandes der On-Resonance Frequenz zu der Resonanz der H6-Methylgruppe von 1.7 ppm, der selektive Sättigungspuls die Ausläufer zumindest teilweise direkt sättigt. Diese

Beobachtung wurde in der nachfolgenden Untersuchung der 2´-L-Fucosyl-D-lactose ebenfalls gemacht, und ist dort weiter diskutiert. In Abbildung 19 ist die Veränderung der chemischen Verschiebung der H6-Methylgruppe bei Erhöhung der Konzentration von H nach A dargestellt. Die Tieffeldverschiebung mit zunehmender Konzentration ist klar erkennbar. Extrapoliert auf einen 1:1 Verhältnis von Ligand zu Protein erfährt das H6-Signal im gebundenen Zustand eine Hochfeldverschiebung um ca. 0.8 ppm. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration ist im Vergleich zum NMR-Spektrum ohne Protein eine deutliche Linienverbreiterung zu beobachten.

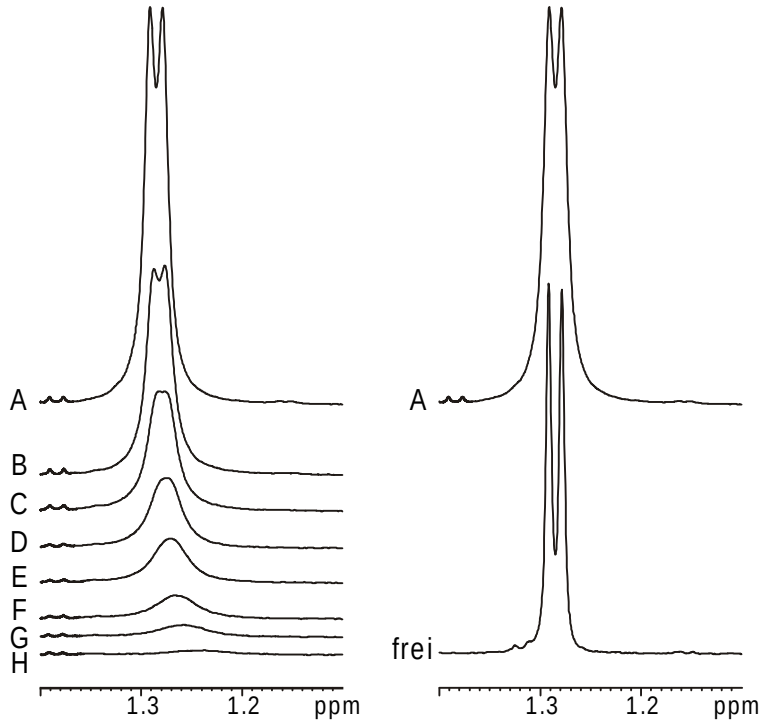

Abbildung 19. Links sind die Signale der H6-Methylgruppe von α-L-FucOMe bei Titration zu einer AAA Probe (33 μM) abgebildet. A: 7.5 mM; B: 5.0 mM; C: 3.6 mM; D: 2.6 mM; E: 2.0 mM; F: 1.4 mM; G: 1.0 mM und H: 0.6 mM. Rechts ist das Signal der H6-Methylgruppe bei der höchsten eingesetzten Konzentration im Vergleich zu der gleichen Resonanz in Abwesenheit von AAA abgebildet.

4.3.2 2´-α-L-Fucosyl-D-lactose

Das in der humanen Milch vorkommende Trisaccharid 2´-α-L-Fucosyl-D-lactose (2´FL) hat wie α-L-FucOMe eine inhibitorische Wirkung auf AAA. Kochibe und Furukawa fanden, dass das Lektin in einem Hemagglutinations-Test durch eine 1.6 mM Konzentration der 2´FL vollständig inhibiert wurde.

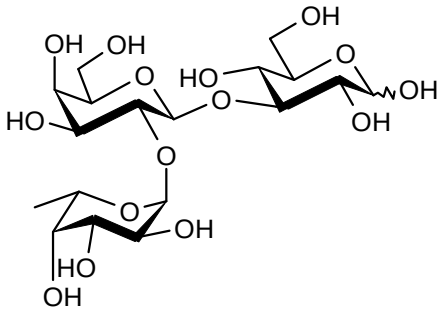

Abbildung 20. Strukturformel des Trisaccharids 2´-α-L-Fucosyl-D-lactose.

Bestimmung des Bindungsepitops

Die Bestimmung des Bindungsepitops erfolgte aus einer Probe bestehend aus ca. 1 mM 2´FL in Gegenwart von 5 nmol AAA (10 µM Bindungsplätze). In Abbildung 21 sind das Referenzspektrum (A) und zwei STD-NMR-Spektren abgebildet. Die beiden STD-NMR-Spektren unterscheiden sich nur in der Frequenz der On-Resonance Einstrahlung. Bei dem oberen der beiden STD-NMR-Spektren (B) wurde eine Frequenz im Bereich der Aromatenprotonen des Proteins gewählt (6.7 ppm). Das untere der STD-NMR-Spektren (C) hingegen wurde bei einer On-Resonance Einstrahlung von –0.3 ppm aufgenommen. Alle anderen Aufnahme- und Prozessierungsparameter sind bei den beiden STD-NMR-Spektren gleich – sie sind jedoch nicht maßstabsgetreu abgebildet.

Im Bereich der Anomeren- und Ringprotonen lässt sich ein Unterschied in der Qualität der STD-NMR-Spektren beobachten. Das STD-NMR-Spektrum (B) hat in diesem Bereich eine höhere Intensität. Besonders ausgeprägt ist der Unterschied zwischen den beiden STD-NMR-Spektren bei den H6-Methylgruppe der Fucose bei ca. 1.2 ppm. In absoluten Intensitäten gemessen hat die H6-Methylgruppe im STD-NMR-Spektrum (C) eine mehr als doppelt so grosse Intensität wie im STD-NMR-Spektrum (B). Auch die Intensität des anomeren Protons H1 der Fucose ist in seiner STD-Intensität in den beiden Spektren deutlich verschieden. In diesem Fall ist jedoch die Intensität im STD-NMR-Spektrum (B) um fast die Hälfte grösser als im Spektrum (C). Die beiden STD-NMR-Spektren unterscheiden sich einzig in der Frequenz der On-Resonance Einstrahlung, was somit der Grund für die Intensitätsdifferenz ist.

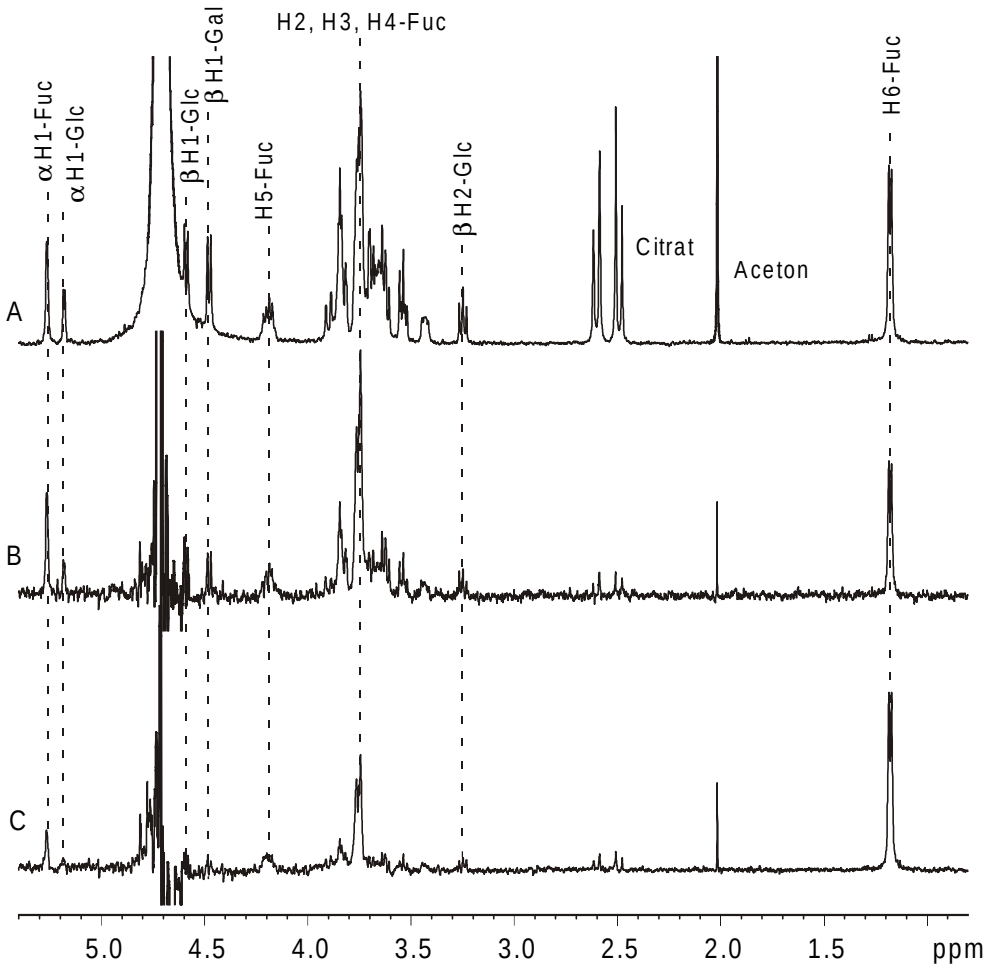

Abbildung 21. A) Referenzspektrum der 2´-L-Fucosyl-D-lactose (ca. 1mM) und AAA (10 µM) B) STD-NMR-Spektrum bei einer On-Resonance Einstrahlfrequenz von 6.7 ppm. C) STD-NMR-Spektrum bei einer On-Resonance Einstrahlfrequenz von - 0.3 ppm.

Die aus den gezeigten Experimenten erhaltenen Daten wären gut durch unselektive Sättigungspulse erklärbar. Die erhöhten Intensitäten im Bereich der Einstrahlposition wäre somit auf eine direkte Sättigung von Ligandensignalen zurückzuführen. Die STD Screening-Experimente sowie die STD-NMR-Experimente in Abwesenheit von Protein zeigten jedoch, dass dies hier nicht der Fall ist.

Auch die Restintensität der in der Probe enthaltenen Verunreinigungen, wie das Citrat und Aceton stammen nicht von direkter Sättigung. Die Intensität dieser Substanzen in den STD-NMR-Spektren ist auf ihre sehr langen T_1-Relaxationszeiten zurückzuführen. Die Repetitionsrate von etwa 8 Sekunden pro Scan ist bei Molekülen mit sehr langen T_1-Relaxationszeiten nicht ausreichend, um die vollständige Rückkehr ins Gleichgewicht zu ermöglichen. Bei verlängerten Relaxationsdelays verringerte sich die STD-Intensität dieser Moleküle deutlich.

Eine mögliche Erklärung für diese Effekte ist, dass trotz der schnellen Spin-Diffusion der Magnetisierung innerhalb des Proteins, Ligandenprotonen, die sich nahe an den direkt gesättigten Proteinprotonen befinden, einen effektiveren Sättigungstransfer erfahren. Bei Einstrahlung auf die Aromatenprotonen des Proteins würden folglich Ligandenprotonen, die direkt mit diesen wechselwirken stärker gesättigt. Umgekehrt werden bei Einstrahlung auf den aliphatischen Protonenbereich diejenigen Ligandenprotonen stärker gesättigt, die mit den aliphatischen Proteinprotonen wechselwirken. Die Grösse der beiden Lektine WGA (MW: 36 kDa für das Dimer) und AAA (MW: 72 kDa für das Dimer) reicht eventuell nicht aus, um eine effiziente Gleichverteilung der Sättigung über das gesamte Protein zu gewährleisten. Dies würde die Abhängigkeit der STD-Intensität der Ligandensignale von den direkt gesättigten Proteinprotonen erklären.

Beim reinen Proteinspektrum von WGA ist diese Abhängigkeit der Einstrahlfrequenz direkt beobachtbar(nicht gezeigt). Der Frequenzbereich, der sich in der Nähe der Einstrahlfrequenz befindet, hat auch im Differenzspektrum eine höhere STD-Intensität. Dieser Vorzug gegenüber Proteinfrequenzen, die sich in einem ähnlichen spektralen Bereich zur Einstrahlfrequenz befinden, könnte sich folglich auch in der Intensität der verschiedenen Ligandenfrequenzen wiederfinden, wie von Umemoto *et al.* postuliert wurde (*50*). Bei der Bestimmung des Bindungsepitops des Liganden muss daher auch dieser Zusammenhang berücksichtigt werden. Umemoto *et al.* nutzten diese Abhängigkeit von der Einstrahlfrequenz aus, um – bei kurzen Vorsättigungszeiten – diejenigen Ligandenprotonen zu bestimmen, welche nahe an den vorgesättigten Proteinprotonen lagen *(50).*

Frequenz/Signal	H1-Fuc	H1-α-Glc	H1-β-Glc	H1-β-Gal	H5-Fuc	H2-, H3-, H4-Fuc	H6-Fuc
6.7 ppm	16.4	10.3	4.3	5.0	9.1	12.6	12.0
-0.3 ppm	12.0	9.9	2.6	2.6	13.4	13.2	32.7

Tabelle 1. Abhängigkeit der STD-Intensität in % ($I_{STD}/I_0 \times 100$), gegenüber der Einstrahl-frequenz in ppm.

In Tabelle 1 sind die aus den jeweiligen STD-NMR-Spektren erhaltenen STD-Effekte zusammengefasst. Einige der dispergierten Protonen sowie der Bereich der H2-, H3- und H4-Protonen wurde separat integriert. Hier wurden nicht die Intensitäten auf das stärkste Signal referenziert, sondern die relativen STD-Effekte in Prozent angegeben. Die relativen Signalintensitäten der beiden STD-NMR-Spektren

zeigen meist nur geringe Unterschiede. Sehr deutlich hingegen fällt die STD-Intensität der H6-Methylgruppe im STD-NMR-Spektrum (B) ab, bei dem die Aromatenprotonen gesättigt wurden. Mit der von Umemoto *et al.* verwendeten Erklärung würde dies für die H6-Methylgruppe bedeuten, dass sie sich im gebundenen Zustand sehr dicht an aliphatischen Proteingruppen befindet, und so effizienter gesättigt wird.

Eine andere Erklärung ist die, dass wegen der starken Linienverbreiterung der H6-Methylgruppe, bei einer etwa um 1.7 ppm hochfeld-verschobenen Einstrahlfrequenz, die Ausläufer dieses extrem breiten Signals direkt gesättigt werden (vergleiche auch α-L-FucOMe). Dies erklärt den drastischen Unterschied zwischen den beiden STD-NMR-Spektren (B) und (C) besser, da die STD-Intensitäten der anderen Signale nicht die extrem starken Abweichungen zeigen. Wie schon zuvor diskutiert tritt diese stake Abhängigkeit der STD-Intensität von der Einstrahlfrequenz verstärkt nur bei dem hier untersuchten System und bei WGA auf. Die Linienbreite der Saccharide in Gegenwart von RCA_{120} ist nur sehr gering – was wohl hauptsächlich an den geringen unterschieden der chemischen Verschiebung der Liganden im freien und gebundenem Zustand liegt. Sowohl bei AAA, als auch bei WGA traten sehr starke Linienverbreiterungseffekte auf. Die zumindest teilweise direkte Sättigung der Ausläufer von stark verbreiterten Ligandensignalen ist für diese Effekte momentan die wahrscheinlichste Erklärung. Dieses muss jedoch weiter untersucht werden. Die Konsequenz dieser Beobachtung ist daher, dass besonders bei einer starken Linienverbreiterung der Ligandensignale auch die On-Resonance Frequenz einen grossen Einfluss auf die Bestimmung des Bindungsepitops haben kann. Die Bestimmung des Bindungsepitops von α-L-FucOMe ist von diesem Effekt ebenfalls beeinflusst worden. Die On-Resonance Sättigung im aliphatischen Frequenzabschnitt, hat somit besonders bei der H6-Methylgruppe zu einer deutlich erhöhten STD-Intensität geführt.

4.3.3 Le^b-Hexasaccharid

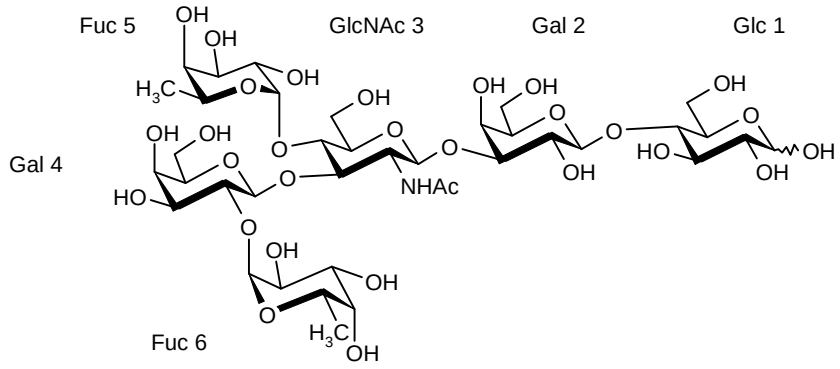

Abbildung 22. Strukturformel des Le^b-Hexasaccharids.

Bestimmung des Bindungsepitops

Das in Abbildung 22 dargestellte Le^b-Hexasaccharid besitzt zwei terminale Fucose-Reste, und wird daher ebenfalls von AAA erkannt. Hier wurde eine Einstrahlung im Tieffeldbereich bei 9 ppm gewählt. Daher sind die hier bestimmten Sättigungsgrade mit den aus dem Spektrum (B) in Abbildung 21 gewonnenen Daten der 2´-α-L-Fucosyl-D-lactose vergleichbar. Das in Abbildung 23 (B) dargestellte STD-NMR-Spektrum bestätigt diese Annahme. Wie zu erwarten war, haben die STD-Signale der beiden terminalen Fucosen die höchste Intensität. Fuc-5 ist α-1-4-glycosidisch an GlcNAc-3 verknüpft, während Fuc-6 α-1-2-glycosidisch an Gal-4 verknüpft ist. Die höchste Intensität hat das H1 Proton des Fuc-6-Restes, das auf 100% normiert wurde. Das anomere Proton des Fuc-5-Restes erreicht nur einen Wert von ca. 80%. Die H5-Protonen der Fucose hingegen zeigen identische Sättigungswerte von etwa 65 %. Die geringste Sättigung innerhalb der Fucosen erhalten die Signale der H6 Protonen mit ca. 55%. Die STD-Intensitäten der beiden Fucosen zeigen somit keine eindeutige Bevorzugung seitens des Proteins für das eine oder andere Verknüpfungsmuster. Die Intensitäten der dispergierten Protonen der Gal-4 und GlcNAc-3-Reste zeigen Werte von ca. 40 – 45%, während die STD-Intensitäten des Signals von α-H1 GlcNAc-1 am reduzierenden Ende nur Sättigungswerte von ca. 25% erreicht.

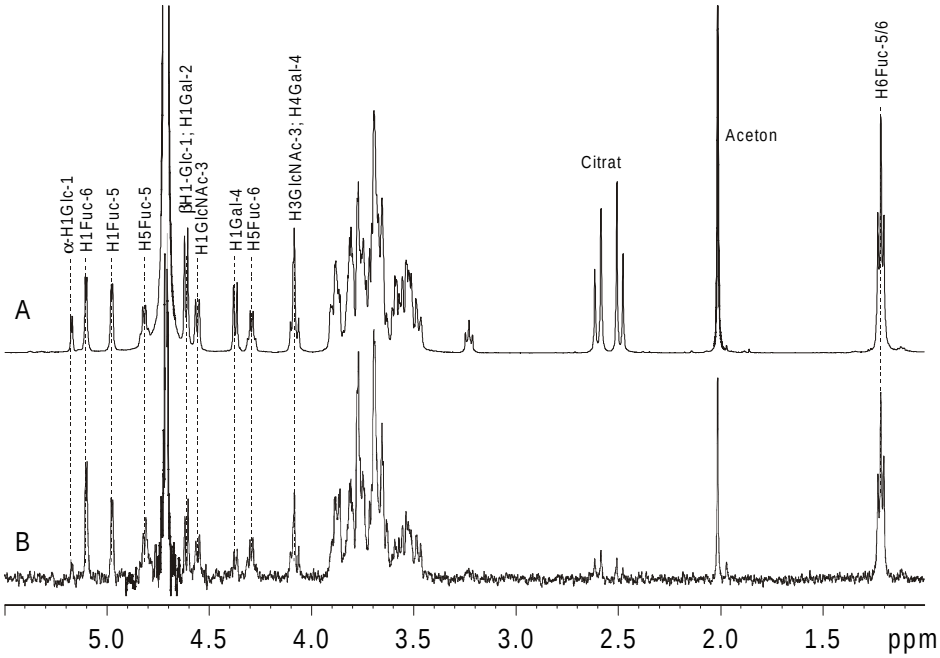

Abbildung 23. A) 1D ^{1}H-NMR-Referenzspektrum des Le^{b}-Hexasaccharids (2 mM) und AAA (10 µM Bindungsplätze) B) STD-NMR-Spektrum. Die On-Resonance Frequenz wurde hier bei 9 ppm festgelegt.

Abbildung 24 zeigt ein gutes Beispiel für den Einsatz des STD-TOCSY-Experimentes zur Bestimmung von Bindungsepitopen. In (A) ist das Referenz-experiment der NMR-Probe dargestellt, das nur den Liganden ohne das Protein enthält. In (B) ist ein STD-TOCSY in Gegenwart von ca. 10 µM Bindungsplätzen AAA dargestellt, bei dem jedoch nur die intensiven Signale gezeigt werden. Die Signale gehören zu den Ligandenresten, welche die grösste Nähe zum Protein aufweisen. Die Probe ist identisch zu derjenigen, mit der die 1D STD-NMR-Experimente gemacht wurden. In Spektrum (B) sind fast ausschliesslich Kreuzsignale zu sehen, die von den beiden terminalen Fucosen Fuc-5 und Fuc-6 stammen. Im STD-TOCSY (C) sind auch solche Kreuzsignale zu sehen, die geringere Intensitäten besitzen. In diesem Spektrum sind folglich auch Kreuzsignale von den zu den Fucosen benachbarten Saccharidresten Gal-4, GlcNAc-3 und zum Teil Gal-2 zu sehen. Schneidet man das 2D Spektrum noch niedriger, so werden auch die Signale des am reduzierenden Ende gelegenen Glc-1-Restes deutlich (hier nicht gezeigt). Über die Einstellung der Höhe der Kontourlinien im 2D Experiment ist eine erste und schnelle Vorauswahl über die für die Bindungsaffinität signifikanten Ligandenbereiche möglich. Die STD-Intensitäten des Le^{b}-Hexasaccharids fallen kontinuierlich vom nicht-reduzierenden Ende, an dem die Fucosen liegen, zum reduzierenden Ende, an

dem GlcNAc-1 liegt, ab. So lassen sich schnell und bequem die Fucosen als das determinierende Epitop bestimmen (*83*).

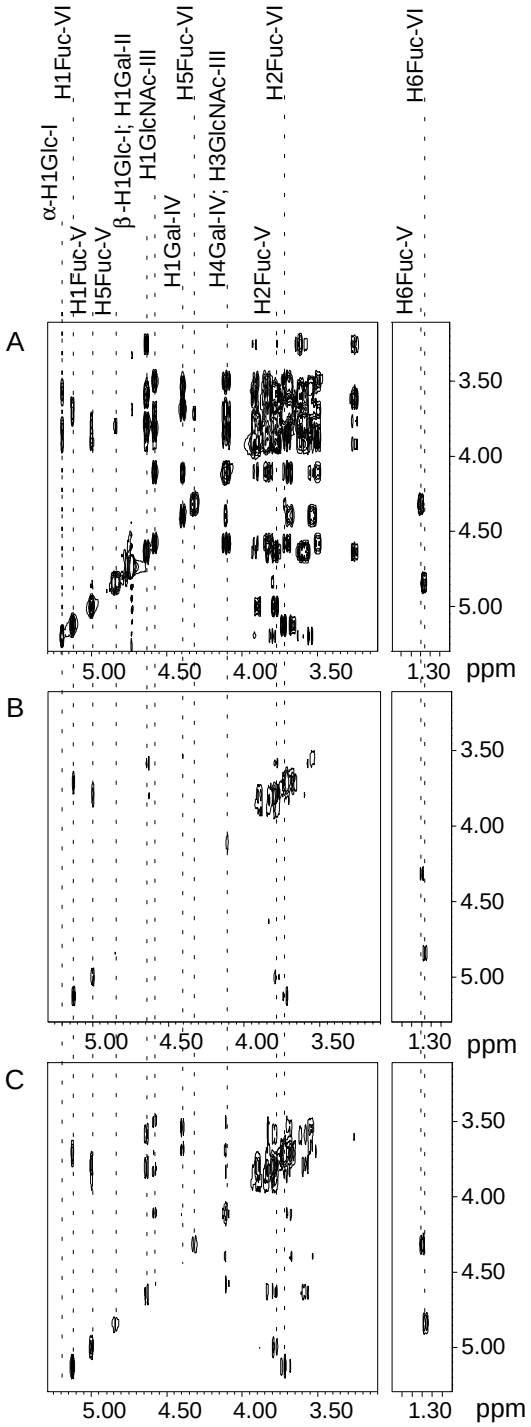

Abbildung 24. (A) Referenz TOCSY-Spektrum, (B) STD-TOCSY-Spektrum des Le^b-Hexasaccharids in Gegenwart von AAA, das nur die intensivsten Signale zeigt. (C) STD-TOCSY-Spektrum wie in (B), aber mit Kontourlinien auch für geringere Intensitäten.

4.4 *Ricinus communis* Agglutinin

Das Lektin *Ricinus communis* Agglutinin (RCA_{120}) ist ein Heterodimer mit einer Molmasse von 120 kDa und besteht aus zwei, über Disulfidbrücken verknüpfte, As-sB Untereinheiten. Es ist spezifisch für Saccharide, die eine terminale Galactose enthalten. Die STD-NMR-Untersuchungen wurden mit vier Liganden unterschiedlicher Affinität durchgeführt. Die Affinität zu RCA_{120} steigt in der Reihe: α-GalOMe, β-GalOMe, LacNAc und dem Asialo-Komplex-Typ biantennären Decasaccharid, NA_2 (*111, 122*).

4.4.1 Der RCA_{120}-Rezeptor

Die Eignung des RCA_{120}-Rezeptors für STD-NMR-Untersuchungen lässt sich gut anhand der reinen Protein ^{1}H-NMR-Spektren verdeutlichen. Abbildung 25 (A) zeigt die typischen breiten Resonanzen eines Biomoleküls dieser Grössenordnung. Die wenigen, scharfen Resonanzen stammen von Verunreinigungen im Puffer. Als Beweis für die Effektivität der Spin-Diffusion, wird hier die Signalintensität des Referenzspektrums (A), mit der des STD-NMR-Spektrums (B) verglichen. Das Differenzspektrum wurde mit der Pulssequenz *stdsp* aufgenommen, also ohne Spin-Lock-Filter. Die On-Resonance Frequenz bei -2 ppm gewählt, während eine Off-Resonance Frequenz von 30 ppm festgelegt wurde.

Anfangs wurde die Vorsättigung des Proteins mit einem *continuous wave*-Puls durchgeführt, der standardmässig bei Spektren mit hohem H_2O-Gehalt zur Wasserunterdrückung verwendet wird. Diese Vorsättigung besteht aus einem Rechteckpuls mit sehr geringer Leistung. Im Vergleich zu den später eingesetzten selektiven Pulsen lieferte diese Art der Anregung zwar um etwa 30% höhere STD-Ligandensignale, jedoch war die nötige Selektivität nicht gegeben. Daher wurde eine alternative Form der Vorsättigung gesucht. Gute Ergebnisse lieferten sogenannte *pulse trains*, die aus einer Folge von selektiven Gauss-Pulsen mit einer Länge von 50 ms bestanden. Die Stärke des selektiven Pulses betrug $(\gamma/2\pi) \times B_1 = 86.6$ Hz. Eine weitere Erhöhung der Stärke des Sättigungspulses führt zu keiner Verbesserung der Signalintensität, solange direkt auf Proteinresonanzen eingestrahlt wurde. Eine Erhöhung der Leistung führte lediglich zu einer geringeren Selektivität, daher wurden alle weiteren STD-NMR-Experimente mit dieser Pulsstärke durchgeführt. Auch verschiedene Formen der selektiven Pulse, wie beispielsweise E-Burp, die eine

breiteres Anregungsprofil haben, zeigten nur marginale Unterschiede in der Qualität der STD-NMR-Spektren. Daher wurde in allen weiteren Experimenten mit einem Gauss-förmigen selektiven Puls gearbeitet, der keine Anregung ausserhalb der gewünschten Bandbreite zeigte (*110*).

Von entscheidender Bedeutung ist die Frequenz der On-Resonance Einstrahlung. Die effektivste Sättigung wurde dann erreicht, wenn die Einstrahlung direkt auf Proteinresonanzen erfolgte und nicht nur auf die Ausläufer der breiten Signale. Dies war aber nur bedingt möglich, da oft auch Ligandenresonanzen in diesem Frequenzbereich vorlagen. Daher musste zum Teil die Sättigung des Proteins im negativen Frequenzbereich bzw. im Bereich jenseits von 10 ppm erfolgen.

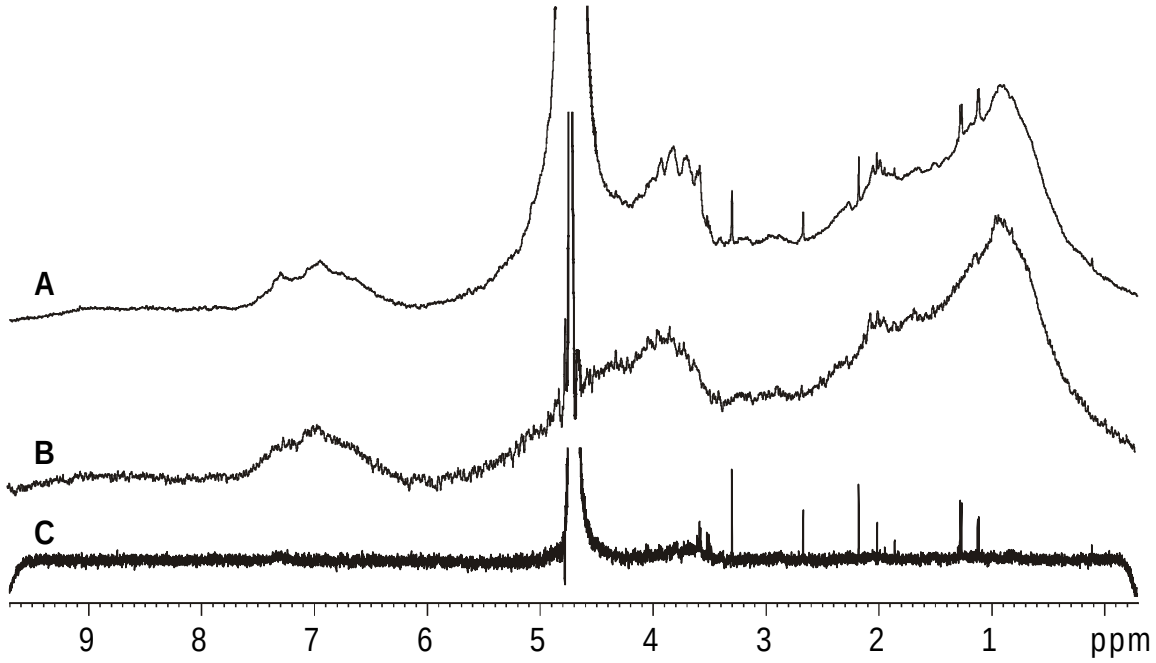

Abbildung 25. A) Referenz NMR-Spektrum einer RCA_{120} Probe (50 µM). B) STD-NMR-Experiment mit On-Resonance Einstrahlung bei –2 ppm, das die Effizienz der Spin-Diffusion verdeutlicht – Spektren A) und B) sind fast identisch. C) Referenzexperiment mit einem $T_{1\rho}$-Filter, der selektiv Proteinresonanzen unterdrückt.

In diesem Beispiel wurde eine Frequenz von -2 ppm gewählt und die Ergebnisse zeigen, dass das Referenzspektrum (A) und das STD-NMR-Spektrum (B) über den gesamten Frequenzbereich so gut wie identisch sind – die gleichmässige Verteilung der Magnetisierung über das Protein ist somit sichergestellt. Ausserdem sind im STD-NMR-Spektrum (B) keine Signale der niedermolekularen Verunreinigungen mehr erkennbar, da sie über die Differenzbildung vollständig abgezogen wurden. Nicht-Binder liefern folglich keine Signale im STD-NMR-

Spektrum. Spektrum (C) zeigt ein normales NMR-Spektrum, dass mit einem $T_{1\rho}$-Filter aufgenommen wurde, der aus einem 30 ms Spin-Lock-Puls besteht. In diesem Spektrum sind keine Proteinresonanzen beobachtbar, da sie während des 30 ms Spin-Lock-Pulses relaxiert sind – und somit keine sichtbaren Signale mehr liefern. Dadurch lässt sich das Protein-Hintergrundsignal effektiv beseitigen. Einzig die Signale der niedermolekularen Substanzen bleiben erhalten, da sie im Vergleich zum RCA_{120} lange $T_{1\rho}$-Zeiten besitzen. Alle nun folgenden 1D STD-NMR-Spektren wurden mit diesem Relaxationsfilter aufgenommen, da er die Analyse der Spektren deutlich vereinfacht und zudem eine problemlose Integration der Ligandensignale erlaubt.

4.4.2 Methyl-α-D-galactosid

Bestimmung des Bindungsepitops

Die Dissoziationskonstante von α-GalOMe gegenüber RCA_{120} beträgt laut Literaturdaten aus kalorimetrischen Titrationsstudien 8×10^{-4} M (*111*). Es handelt sich demnach um einen Liganden mit geringer Affinität, der sich in schnellem Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand befindet. Aus dem ^{1}H-Referenzspektrum (A) in Abbildung 26 geht hervor, dass bei einem Überschuss von 200:1 gegenüber dem Rezeptor keine Linienverbreiterungen oder -verschiebungen zu beobachten sind. Erste Hinweise auf Bindungsaktivität direkt aus dem normalen NMR-Spektrum sind folglich nicht vorhanden. Das STD-NMR-Spektrum mit der Pulssequenz *stdslsp* (B) hingegen weist eindeutig Signale des α-GalOMe Monosaccharids auf. Dieses STD-NMR-Spektrum wurde innerhalb von ca. 20 Minuten mit 256 Scans aufgenommen und beweist, dass das Molekül an den Rezeptor bindet. Im STD-NMR-Spektrum lässt sich zudem schon optisch eine Intensitätsverminderung der *O*-Methylgruppe und des anomeren αH1-Protons gegenüber dem Referenzspektrum (A) erkennen.

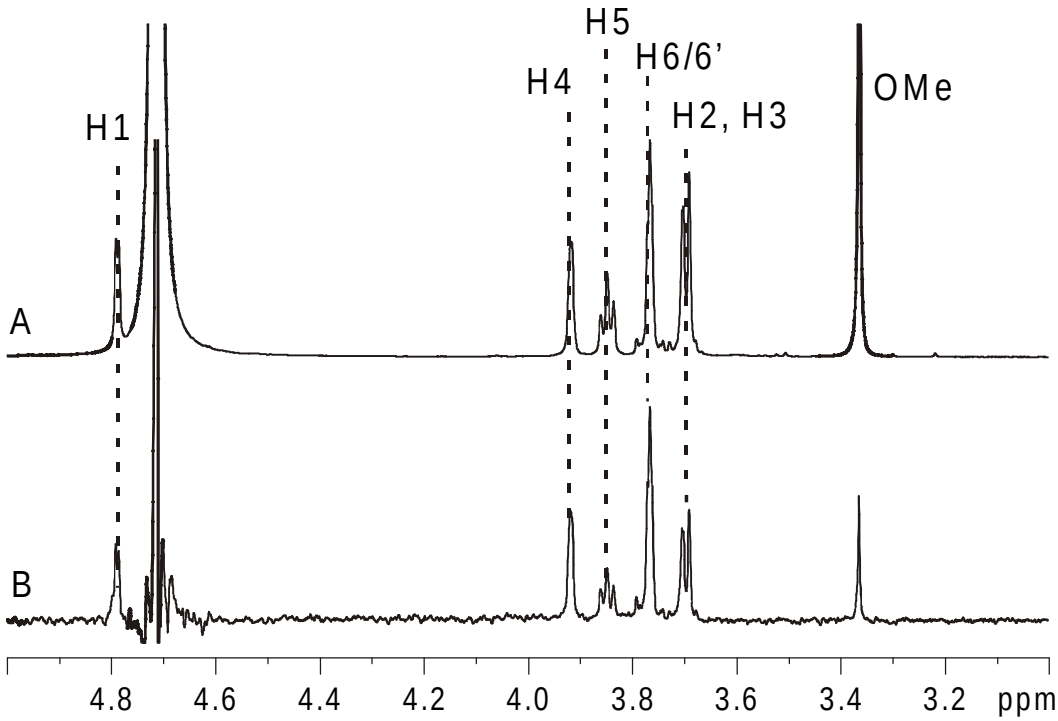

Abbildung 26. A) Referenz-NMR-Spektrum und B) STD-NMR-Spektrum von 4 mM α-GalOMe in Gegenwart von 20 µM RCA_{120}. Die Sättigungszeit wurde auf 2 s eingestellt.

Zur genaueren Bestimmung des bindenden Epitops, d.h. derjenigen Protonen, die am dichtesten zur Proteinoberfläche lokalisiert sind, werden die Signalintensitäten der einzelnen dispergierten Signale des STD-NMR-Spektrums mit denen des Referenzspektrums verglichen. Um die Unterschiede zu verdeutlichen, wurde das intensivste STD-Signal, in diesem Fall wurde das H4-Proton, auf 100% kalibriert. Alle weiteren Signalintensitäten wurden zu diesen Signalen referenziert. In Abbildung 27 sind die unterschiedlichen Sättigungsgrade bei einer Sättigungszeit von 2 Sekunden zusammengefasst. Die H2-, H3- und H4-Protonen wurden zu gleichen Anteilen gesättigt, während die beiden H6-Protonen und das H5-Proton leicht auf 75% bzw. 85% abfallen. Die geringste Sättigung erhalten die Methyl-Protonen mit lediglich etwa einem fünftel des Wertes. Auch das anomere H1-Proton fällt mit einer Intensität von nur 45% deutlich gegenüber den Referenzsignalen ab. Diese Daten geben also eine Auskunft über diejenigen Bereiche des Liganden ab, welche den grössten Kontakt zum Protein aufweisen. In diesem Fall lässt sich die Bindungsspezifität von RCA_{120} schnell und eindeutig dem nicht-reduzierenden Ende des Zuckers zuweisen. Die *O*-Methylgruppe ragt höchstwahrscheinlich aus der Bindungstasche, ohne einen unmittelbaren Kontakt zu Proteinprotonen zu besitzen.

Die erhaltenen Daten weisen eine sehr gute Übereinstimmung mit Bindungsstudien anderer Gruppen auf, die die Wasserstoffbrücken Donor- und Akzeptor-Qualitäten der einzelnen Hydroxylgruppen einer Reihe von chemisch modifizierten β-Galactose-Derivaten untersucht haben (*112-114).* Bhattacharyya und Brewer konnten für die zeigen, dass die C2-Hydroxylgruppe sowohl als Donor, wie auch als Akzeptor dient. Weiter agieren die C3- und C4-Hydroxylgruppen ausschliesslich als Wasserstoffbrücken-Donoren, da die entsprechenden Deoxyfluoro-Derivate keine Inhibition im Hemagglutinations-Assay zeigten. Für die C6-Hydroxylgruppen konnten sie keinen Beitrag zur Bindungswechselwirkung finden. Weitere Studien fanden ähnliche Werte für Galactose-haltige Disaccharide (*115, 116).* Den C3- sowie C4-Hydroxylgruppen wurde, wie auch bei der vorherigen Untersuchung, eine zentrale Bedeutung für die Bindungsaktivität zugeordnet. Im Gegensatz zu den Studien von Bhattacharyya *et al.* wurde der C2-Hydroxylgruppe nur ein geringer Einfluss, der C6-Hydroxylgruppe jedoch ein grosser Einfluss auf die Affinität zugesprochen. Bei der C2- und der C6-Hydroxylgruppe wurden sowohl Donor- als auch Akzeptor-Eigenschaften gefunden (*116).* Die Literaturdaten weisen folglich die Spezifität von RCA_{120} eindeutig dem nicht-reduzierenden Rest der Galactose zu. Mit den STD-NMR-Experimenten konnten die Informationen über die Bedeutung der einzelnen Ligandengruppen für die Bindung in ungleich kürzerer Zeit, und mit geringem Aufwand gewonnen werden.

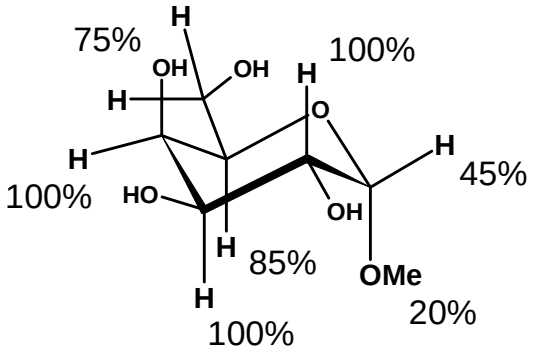

Abbildung 27. Relative Signalintensitäten von α-GalOMe bestimmt aus dem STD-NMR-Spektrum B) in Abbildung 26. Die grössten Signale – hier die Signale der H2-, H3- und H4-Protonen – bekamen den Wert 100% zugeteilt. Alle anderen Signalintensitäten wurden zu diesen Signalen referenziert.

STD-Titrationsexperimente

Um die einzelnen Titrationen der verschiedenen Saccharide miteinander vergleichen zu können, wurde auch hier der STD-Amplifikations-Faktor verwendet (Definition siehe Seite 39). In diesem Fall wurde bis zu einer Konzentration von 2 mM titriert. Dem so erhaltenen Titrationsplot in Abbildung 28 lässt sich entnehmen, dass der STD-Amplifikations-Faktor mit zunehmender Konzentration einem Maximalwert von ca. 10 entgegenstrebt und eine Sättigungskurve erhalten wird.

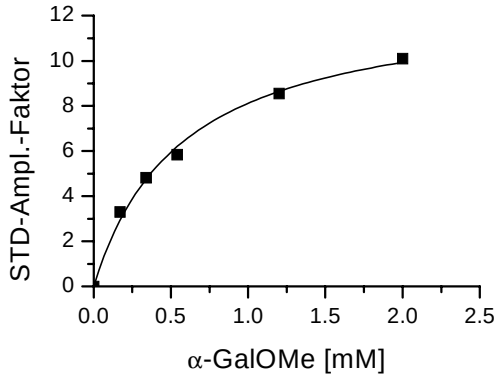

Abbildung 28. Titrationsplot des STD-Amplifikations-Faktors des H4-Signals gegen die α-GalOMe Konzentration. Bei hohen Konzentrationen nähern sich die STD-Amplifikations-Faktoren einem Maximum - das hier über 10 liegt. Die RCA_{120} Konzentration lag bei 20 μM.

Aus der Titrationskurve geht hervor, dass selbst bei hohen Konzentrationen von 2 mM der maximale STD-Amplifikations-Faktor noch nicht erreicht ist. Dies ist ein Merkmal für den schnellen chemischen Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand bei α-GalOMe. Es herrschen folglich hohe Wechselzahlen, die es ermöglichen hohe Überschüsse an Liganden zu sättigen. Ein weiteres deutliches Anzeichen für den schnellen Austausch ist der hier maximal erreichte STD-Amplifikations-Faktor von ca. 10.

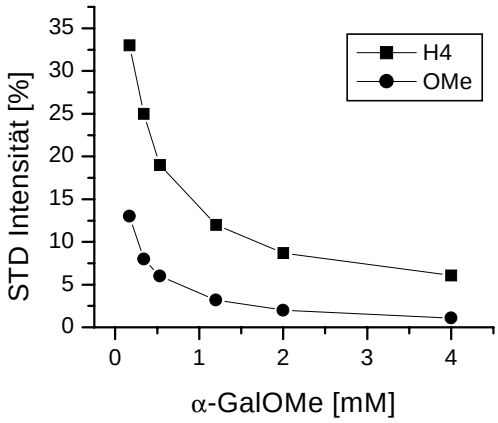

Abbildung 29. Das Diagramm gibt die relative STD-Intensität in [%], gegenüber der α-GalOMe Konzentration an. Die durch Kreise dargestellten Datenpunkte sind die Protonen der *O*-Methylgruppe, während die Quadrate dem H4-Proton entsprechen. Die RCA_{120}-Konzentration beträgt 20 μM Bindungsstellen. Bei niedrigen Konzentrationen sind die STD-Effekte gross, da der Ligand mehrmals in die Bindungstasche gelangen kann. Bei hohen Konzentrationen verringert sich auch der prozentuale STD-Effekt, da sich die Sättigung auf eine grössere Anzahl an Liganden verteilt.

Abbildung 29 beschreibt den Verlauf der relativen STD-Intensität des H4-Protons (Quadrate) und der *O*-Methylgruppe (Kreise) bei der Titration. Kleine Ligandenkonzentrationen haben einen hohen prozentualen Anteil an Sättigung zur Folge. Bei einer Konzentration von 0.2 mM, was einem 10-fachen Überschuss entspricht, werden fast 35% der H4-Signale und ca. 13% der Methylgruppen-Signale gesättigt. Nur wenige Ligandenmoleküle müssen gelabelt werden und daher ist der Prozentsatz relativ gesehen sehr hoch.

Anhand eines Gedankenexperiments lässt sich dies erklären. Ein ungesättigter Ligand wird beim ersten Kontakt mit dem Rezeptor zu beispielsweise 30% gesättigt. Er verlässt die Bindungstasche und verliert Sättigung über die T_1-Relaxation des Liganden im freien Zustand. Zu dem Zeitpunkt in dem sich ein erneuter Kontakt zum Rezeptor einstellt, hat sich die Sättigung auf z.B. 25% reduziert. Da sich die Sättigung exponentiell aufbaut, erhält dieser schon vorgesättigte Ligand nicht weitere 30% Sättigung, wie bei dem ersten Kontakt, sondern einen geringeren Prozentsatz von beispielsweise 20%. Bei einem dritten Kontakt würde sich der Sättigungswert nochmals weiter verringern, es ist daher günstiger die Sättigung auf

viele Liganden zu verteilen. Je weiter die Konzentration an Liganden erhöht wird, um so geringer wird im Mittel der prozentuale Anteil an Sättigung. Der Sättigungsgrad der H4-Resonanz liegt bei einer 4 mM Konzentration nur noch bei ca. 7%, während die *O*-Methylgruppe einen Wert von etwa 1.3% erreicht. Bei höheren Überschüssen werden somit mehr Liganden gelabelt – der Sättigungsgrad pro Molekül hingegen nimmt ab, da nur eine begrenzte Menge an Magnetisierung übertragen werden kann. Multipliziert man die relativen STD-Sättigungsgrade mit den korrespondierenden Ligandenüberschüssen, so kann wiederum die STD-Titrationskurve, wie sie in Abbildung 28 dargestellt ist, erhalten werden.

4.4.3 Methyl-β-D-galactosid

Bestimmung des Bindungsepitops

1D-STD-NMR-Spektren: β-GalOMe besitzt eine um ca. Faktor drei höhere Affinität (2.3×10^{-4} M) gegenüber RCA_{120} als α-GalOMe. Die Spezifität des RCA_{120} Rezeptors für das nicht-reduzierende Ende der Galactose-haltigen Saccharide bedeutet also nicht, dass die anomere Konfiguration keinen Einfluss hat. Abbildung 30 (A) zeigt das ^{1}H-NMR Referenzexperiment einer Mischung des RCA_{120}-Rezeptors und β-GalOMe. Das entsprechende STD-NMR-Experiment bei einer Sättigungszeit von 2 s ist in Abbildung 30 (B) wiedergegeben. Wie auch bei der vorherigen Mischung ist keine Linienverbreiterung zu erkennen. Aus dem rein optischen Vergleich der beiden Spektren lässt sich bestimmen, dass erneut die Signale der *O*-Methylgruppe und des H1-Protons geringere Intensitäten besitzen.

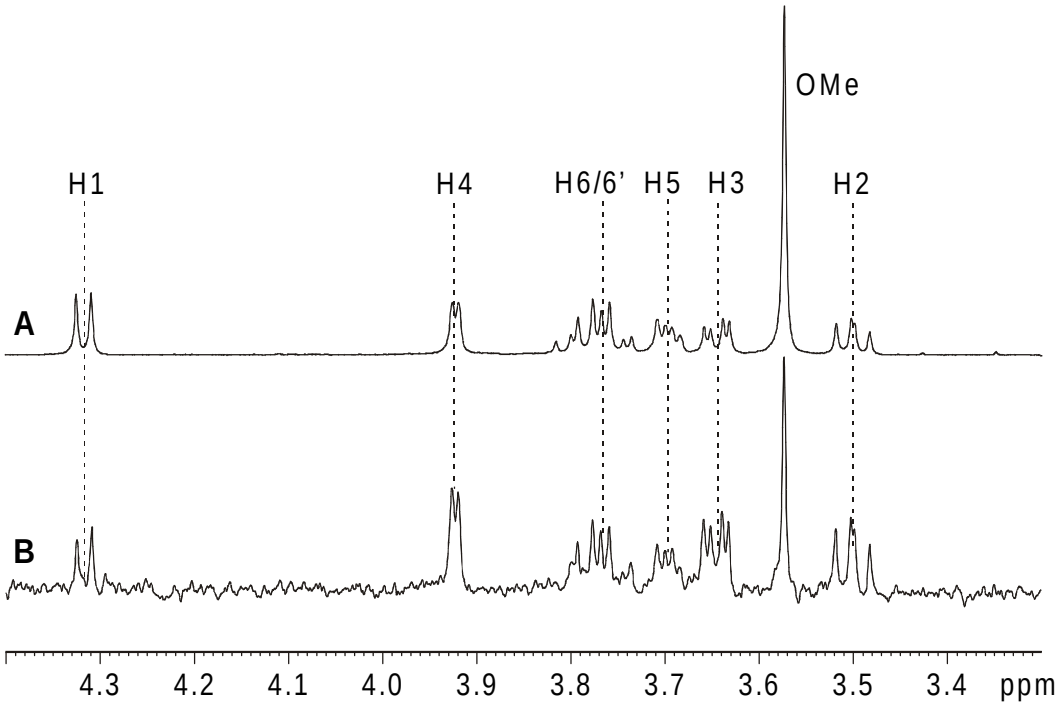

Abbildung 30. A) WATERGATE Referenzspektrum und B) WATERGATE STD-NMR-Spektrum von *β*-GalOMe, bei einem Überschuss an Ligand von 100:1 gegenüber dem Protein (20 μM).

Die genauere Analyse des Bindungsepitops erfolgte über die Auswertung der Integrale im ^{1}H-NMR Referenz- und STD-NMR-Spektrum. Das intensivste Signal im STD-NMR-Spektrum, hier das H3-Proton, wurde auf 100% normiert und alle anderen Signale zu diesem referenziert. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Intensitäten haben bis auf den Bereich des anomeren-Protons und der *O*-Methylgruppe sehr ähnliche Werte. Die drei Protonen H2, H3 und H4 haben bei einer Sättigungszeit von 2 Sekunden alle einen Wert zwischen 87% und 100%. Das H5-Proton und die beiden H6-Protonen fallen, wie auch schon bei *α*-GalOMe, ein wenig ab und erlangen Werte um die 65%. Deutliche Unterschiede zum *α*-GalOMe sind folglich nur für die Intensitäten der Protonen am reduzierenden Ende zu erkennen. Die *O*-Methylgruppe in der *β*-Konfiguration hat einen Wert von 32% im Gegensatz zu den 20% in der *α*-Konfiguration, d. h. sie wird stärker gesättigt und liegt daher näher am Protein. Diese günstigere Anordnung der Methylgruppe ist ein möglicher Grund für die höhere Affinität von RCA_{120} gegenüber *β*-GalOMe. Andererseits hat die Konfiguration der *O*-Methylgruppe hat kaum Einfluss auf die STD-Intensitäten der Ringprotonen – und somit auf die Stärke der Wechselwirkung dieses Bereichs mit der Proteinoberfläche. Dieser Vergleich zeigt eine weitere

Einsatzmöglichkeit des STD-NMR-Experiments auf. Eine Untersuchung von leicht modifizierten Liganden und der anschliessende Vergleich ihrer STD-Amplifikations-Faktoren kann unter Umständen zur Charakterisierung der Rezeptor-Bindungstasche verwendet werden. Fakt ist, dass die Spezifität von RCA_{120} wieder eindeutig dem nicht-reduzierenden Ende zugeordnet werden kann.

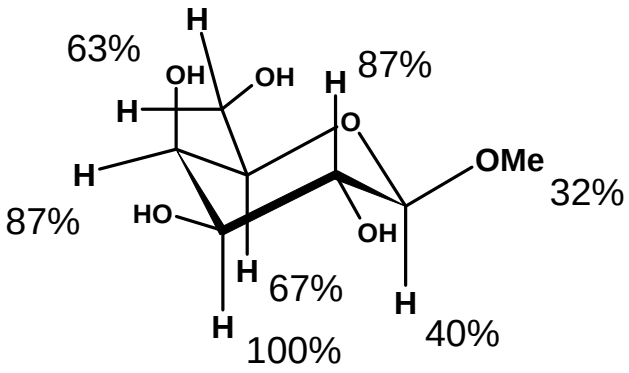

Abbildung 31. Relative Signalintensitäten von β-GalOMe bestimmt aus dem STD-NMR-Spektrum B) in Abbildung 30. Das grösste Signal – hier das Signal des H3-Protons – wurde auf 100% normiert. Alle anderen Signalintensitäten wurden zu diesem Signal referenziert.

2D-STD-TOCSY-Spektren: Wegen der guten Dispersion der Protonensignale von β-GalOMe, ist dieses Monosaccharid ein guter Ligand für weitere Experimente.

Für die NMR-Probe wurde eine Mischung aus 20 nmol RCA_{120} (Bindungsstellen) und ein 100-facher Überschuss an β-GalOMe (2 µmol) eingesetzt. Wegen der zu hohen Konzentration an H_2O in der Probe, wurde hier mit der WATERGATE H_2O-Unterdrückung gearbeitet. Dies hat eine verminderte Intensität von Signalen zu Folge, die in etwa 0.4 ppm Umgebung zur der HDO-Resonanz liegen. In Abbildung 32 (A) ist das normale oder Off-Resonance TOCSY dargestellt, in (B) das entsprechende STD-TOCSY. Bei einer Akquisitionszeit von 7 h und einer Sättigungsdauer von 1.5 Sekunden, hat das STD-TOCSY-Spektrum ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis und sämtliche Kreuzsignale lassen sich getrennt voneinander integrieren. Zur Kontrolle, ob unterschiedlich lange Relaxationsdelays d1 Einfluss auf die Intensitätenverteilung haben, wurden zwei Spektren mit d1-Delays von 100 ms und 1 s aufgenommen.

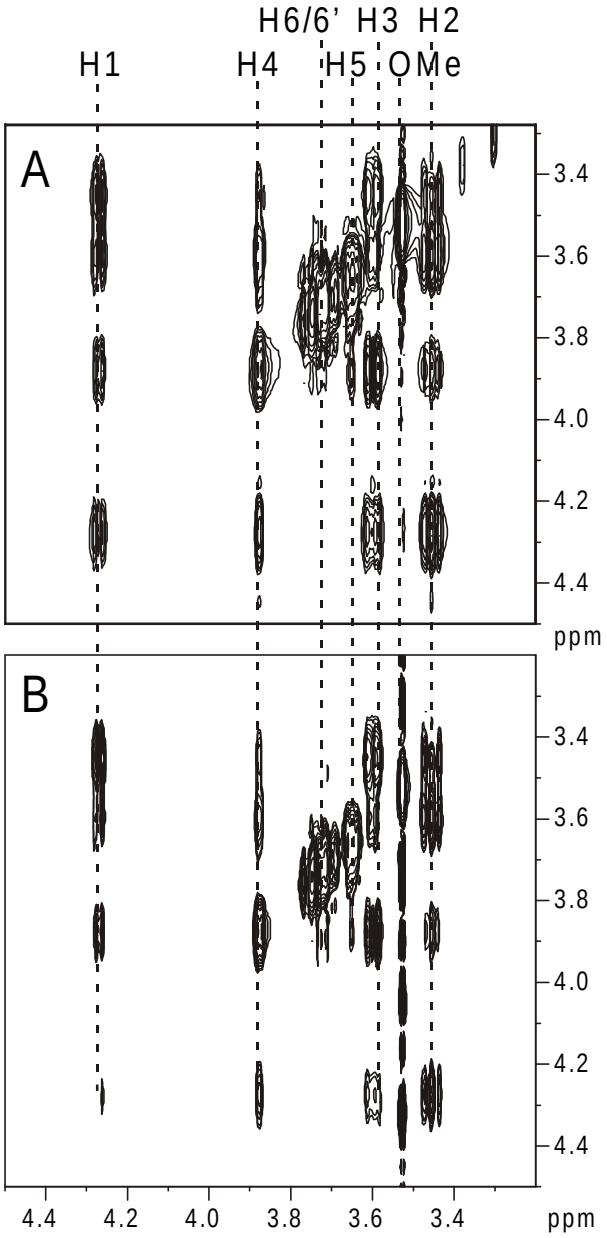

Abbildung 32. A) Referenz-TOCSY-Spektrum und B) STD-TOCSY-Spektrum. On und Off-Resonance Spektren wurden mit je 24 Scans pro Inkrement, bei 200 t1 Inkrementen, aufgenommen.

Das Ergebnis der Integration ist in Diagramm 1 zusammengefasst, die weissen Balken entsprechen den STD-Intensitäten der Kreuz- und Diagonalsignale bei einem 100 ms Relaxationsdelay und die dunklen Balken dem 1 s Delay. Im Diagramm steht an erster Stelle immer das Proton, in dem der Kreuzpeak seinen Ursprung hat. Zum Beispiel steht H3-H4 für den Kreuzpeak der in H3 seinen Ursprung hat und in der F1-Spur mit H4 koppelt. Sind keine Kopplungspartner der Protonen angegeben, so handelt es sich um das Diagonalsignal. H5 und H6 wurden nicht voneinander getrennt integriert, es handelt sich daher um gemittelte Werte. Der Vergleich der

beiden STD-TOCSY-Spektren zeigt, dass die Unterschiede sehr gering sind und der längere Relaxationsdelay bei den meisten Signalen lediglich zu einer etwas höheren Signalintensität führt. Die höhere Signalintensität bei längerem Delay wird durch die um 1/3 verlängerten Akquisitionszeiten nicht kompensiert. Es ist daher vorzuziehen, die Messzeit in mehr Scans zu investieren.

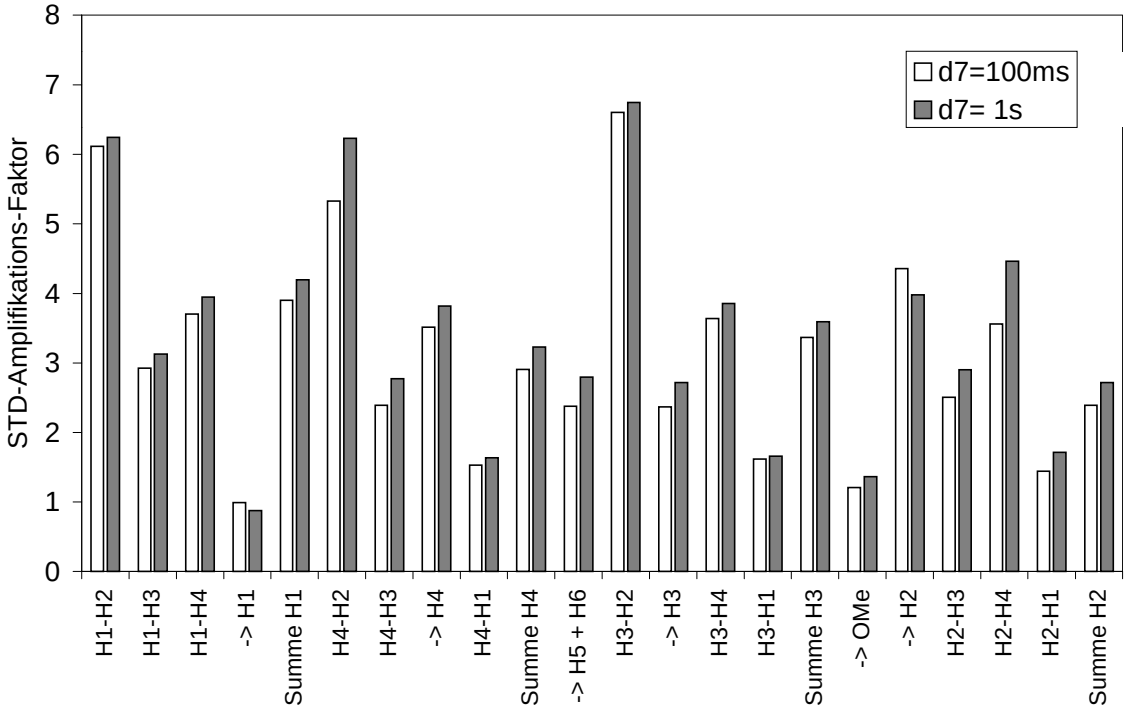

Diagramm 1. Die weissen Balken entsprechen der STD Kreuzsignalintensität bzw. STD-Diagonalsignalintensität (jeweils mit Pfeil markiert) bei einem Relaxationsdelay von 100ms, während die grauen Balken die Intensitäten bei einem Relaxationsdelay von 1 s darstellen. Die Signale sind entsprechend ihrer chemischen Verschiebung sortiert (vergleiche Abbildung 30).

Auffällig ist hier auch, dass die Intensitäten oberhalb der Diagonalen, bis auf im Fall des H4-H3 Kreuzpeaks meistens eine grössere Intensität haben, als die entsprechenden Kreuzpeaks unterhalb der Diagonalen – und zwar unabhängig von der Länge des Relaxationsdelays.

Die Bestimmung des Bindungsepitops von β-GalOMe aus den STD-TOCSY-Spektren erweist sich in diesem Fall als schwierig, da bei keinem Proton ein eindeutiger Abfall der Intensität beobachtbar ist. Dies wird besonders deutlich, wenn die Summe der F1-Spuren betrachtet werden. Hier hat, in Summe, sogar das H1-Proton den grössten STD-Amplifikations-Faktor, was nicht in Einklang zu den 1D-STD-NMR-Spektren steht. Die Signale der H2-, H3- und H4-Protonen erreichen auch

im 1D STD-NMR-Spektrum sehr ähnliche Sättigungswerte, zwischen diesen Protonen war daher kein grosser Unterschied zu erwarten. Zudem reicht das im TOCSY beobachtbare Spinsystem von β-GalOMe nur vom H1 bis zum H4 Proton. Daher lassen sich nur wenige Informationen über die isolierten Kreuzpeaks der H5-Protonen und der beiden H6-Protonen gewinnen. Die STD-Diagonalsignal-intensitäten zeigen ein anderes Bild. Hier ist eine gute Übereinstimmung der Daten aus den 1D STD-NMR-Spektren und den STD-TOCSY-Daten gegeben. Die Diagonalsignale des H1-Protons und der *O*-Methylgruppe haben, wie im 1D STD-NMR-Spektrum, die deutlich geringste Intensität, während diejenigen der H2-, H3- und H4-Protonen erneut die höchsten STD-Amplifikations-Faktoren besitzen. Es ist hier im wesentlichen eine Übereinstimmung mit den 1D STD-NMR-Spektren erkennbar. Die auftretenden Unterschiede der STD-Amplifikations-Faktoren innerhalb eines Spinsystems sind hauptsächlich durch die TOCSY-Transfer-Effizienz sowie der Länge des Mischzeit bestimmt. Sie zeigen nicht die nötige Differenzierung, um eine detaillierte Bestimmung des Bindungsepitops zu erreichen. Bei diesen einfachen und kleinen Molekülen, ist die Aufnahme von 1D STD-NMR-Spektren aber schon vollkommen ausreichend.

STD-Titrationsexperimente

RCA_{120} wurde – wie schon bei der vorherigen Titration – vorgelegt und β-GalOMe aus einer konzentrierten Lösung zugegeben. In Abbildung 33 sind die STD-Amplifikations-Faktoren des H4 Signals bis zu einer 2 mM Ligandkonzentration aufgetragen. Auch in diesem Fall ist bei der 2 mM Konzentration das Maximum noch nicht erreicht und die STD-Amplifikations-Faktoren würden sich bei weiterer Ligandenzugabe noch erhöhen. Es handelt sich somit, wie schon bei α-GalOMe um ein System, das sich im schnellen chemischen Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand befindet.

Es lassen sich jedoch auch Unterschiede beobachten. So erreicht das H4-Proton bei einer Konzentration von 2 mM bei β-GalOMe nur einen STD-Amplifikations-Faktor von 8, im Gegensatz zu α-GalOMe, das bei dieser Konzentration einen Faktor von 10 erreichte. Diese leichte Erniedrigung des STD-Amplifikations-Faktors bei gleicher Konzentration kann dadurch erklärt werden, dass β-GalOMe stärker an RCA_{120} bindet und somit die Wechselzahlen abnehmen. Es werden folglich insgesamt

weniger Moleküle gesättigt und der STD-Amplifikations-Faktor nimmt ab. Dadurch flacht die Sättigungskurve bei stärker bindenden Liganden schon bei niedrigeren Konzentrationen ab. Ein weiterer Grund für das frühere Abflachen ist, dass bei starken Bindern niedrige Konzentrationen ausreichen, damit sämtliche Bindungsplätze belegt sind. Eine Erhöhung des STD-Amplifikations-Faktors aufgrund der höheren Konzentration an Protein-Ligand-Komplex ist bei solchen Liganden nicht gegeben.

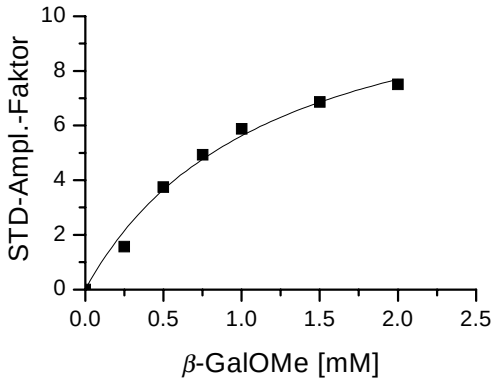

Abbildung 33. Titrationsplot des STD-Amplifikations-Faktors des H4-Signals gegen die *β*-GalOMe Konzentration. Die Konzentration an RCA_{120} lag bei 20 μM (Bindungsplätze).

Man sollte in diesem Zusammenhang nicht vergessen, dass auch eine schwächere Bindung, also eine Erhöhung der Wechselzahl zu einer Reduktion des STD-Amplifikations-Faktors führen kann. Wenn die Aufenthaltsdauer am Protein zu kurz wird, kann der Ligand nicht mehr effektiv gesättigt werden – als Folge nimmt der STD-Amplifikations-Faktor auch in diesem Fall ab. Der STD-Amplifikations-Faktor hat demnach – einen konstanten k_{on}-Wert angenommen – bei einem bestimmten k_{off}-Wert ein Maximum. Bei welcher Dissoziationsrate dieses Maximum erreicht wird, hängt unter anderem von der Grösse des Proteins sowie der Spektrometerfrequenz ab, da diese Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Sättigungseffizienz haben. Besteht dennoch die Möglichkeit, direkt aus den STD-Amplifikations-Faktoren zu ermitteln, ob einer der Liganden stärker bindet, ohne auf Kompetitionsexperimente zurückzugreifen?

Im Normalfall ja, denn zusätzlich zu der Information, die einem aus der Grösse des STD-Amplifikations-Faktors zugänglich ist, lässt sich auch der Verlauf

der Titrationskurve analysieren. Stark bindende Moleküle besitzen wegen des geringeren Durchsatzes nicht nur kleinere STD-Amplifikations-Faktoren, sondern das Maximum wird schon bei niedrigen Konzentrationen erreicht. Bei sehr schwach bindenden Molekülen ist der STD-Amplifikations-Faktor ebenfalls klein, jedoch werden hohe Konzentrationen benötigt, um den Rezeptor mit Liganden zu sättigen. Daher würde in diesem Fall das Maximum der STD-Signale erst bei hohen Ligandenkonzentrationen erreicht werden.

Wo genau das Maximum des STD-Amplifikations-Faktors bei RCA_{120} und einer Spektrometerfrequenz von 500 MHz liegt, ist nicht bestimmbar, da selbst der sehr schwache Inhibitor α-GalOMe höhere STD-Amplifikations-Faktoren erreicht als β-GalOMe. Man kann also folgern, dass das Maximum bei noch grösseren k_{off}-Werten zu finden sein wird – und somit bei Dissoziationskonstanten im hohen millimolaren Bereich liegt.

STD-Sättigungszeitexperimente

Die Sättigungszeitexperimente veranschaulichen den Verlauf der STD-Amplifikations-Faktoren einzelner Resonanzen mit der Einstrahldauer bzw. der Anzahl der Sättigungspulse. Wie dieser Verlauf sich gestaltet, hängt unter anderem von der Konzentration bzw. des Überschusses an Liganden ab.

Abbildung 34 (A) verdeutlicht, dass bei niedrigen Ligandenkonzentrationen (hier 0.5 mM) schon eine Sättigungszeit von 3 Sekunden ausreicht, um den maximalen STD-Amplifikations-Faktor des H3-Protons von ca. 5 zu erreichen. Die STD-Integrale des H3-Protons sind mit Quadraten dargestellt, die der *O*-Methylgruppe mit Kreisen. Die flacher verlaufende Kurve der *O*-Methylgruppe ist wiederum ein Anzeichen für einen grösseren Abstand zur Rezeptor-Bindungsstelle. Es bleibt anzumerken, dass sich die T_1-Relaxationszeiten des H3-Protons mit 1.6 s und der *O*-Methylgruppe mit 1.53 s kaum unterscheiden. Die Unterschiede in den STD-Amplifikations-Faktoren sind demnach nicht die Folge der schnelleren Relaxation einer der beiden Gruppen. Eine deutlich schnellere T_1-Relaxationszeit hätte zur Folge, dass sich auch das Gleichgewicht schneller einstellt, und somit kleinere STD-Effekte erreicht werden.

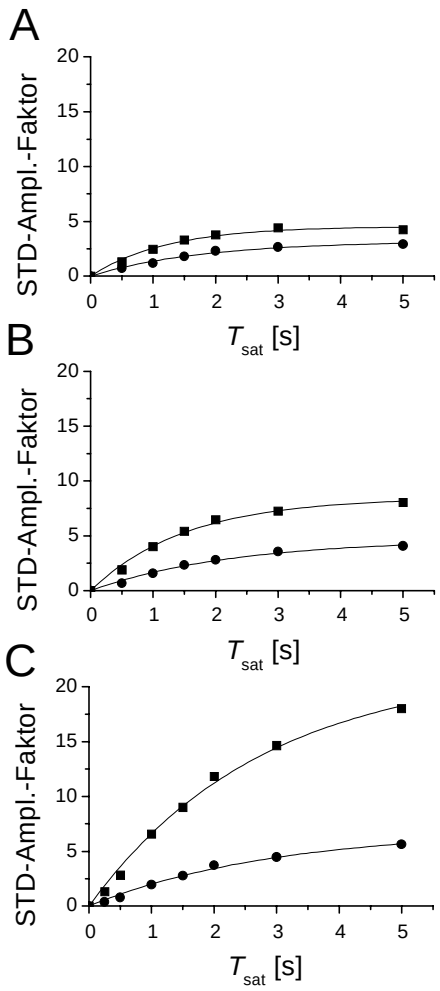

Abbildung 34. Sättigungstransfer-Aufbaukurven: Die Sättigungszeit T_{sat} wird gegen den STD-Amplifikations-Faktor aufgetragen. Quadrate repräsentieren die Intensitäten des H3-Protons, Kreise, die der *O*-Methylgruppe. A) β-GalOMe Konzentration von 0.5 mM (12.5-facher Überschuss). B) β-GalOMe Konzentration von 1 mM (25-facher Überschuss). C) β-GalOMe Konzentration von 4 mM (100-facher Überschuss). Die STD-Amplifikations-Faktoren erreichen bei hohen Konzentrationen nicht nur höhere Werte, sondern diese steigen auch bei langen Sättigungszeiten noch deutlich an.

Das zweite Diagramm (B) entspricht dem STD-Intensitätsverlauf bei einem höheren Überschuss von 1 mM (25-facher Überschuss). Erkennbar ist, dass bei diesem Überschuss die Sättigungszeit verlängert werden muss, um den maximalen STD-Amplifikations-Faktor zu erreichen. Zudem liegen die Werte der maximalen STD-Amplifikations-Faktoren höher, als bei der niedrigeren Konzentration. Das

dritte Diagramm (C) wurde bei einer 4 mM Ligandenkonzentration aufgenommen (100-facher Überschuss) und verdeutlicht diesen Trend weiter. Das maximale STD-Integral ist selbst bei Sättigungszeiten von 5 Sekunden noch nicht erreicht. Desweiteren liegt der STD-Amplifikations-Faktor des H3-Protons nun bei ca. 18, während er bei der niedrigsten Konzentration lediglich einen Wert von 5 erreichte.

Die aus der Sättigungszeit-Messung erhaltenen Daten lassen sich gut an eine exponentielle Funktion erster Ordnung anpassen. Die Sättigung strebt dabei mit der beobachtbaren Sättigungsrate k_{sat}, einem maximalen Sättigungsgrad STD_{max} zu. Für lange Sättigungszeiten wird dann der maximale STD-Amplifikations-Faktor erreicht.

$$STD - Amplifikations - Faktor = STD_{max} \cdot (1 - e^{-k_{sat} \cdot t}) \cdot \frac{[L]}{[EL]}$$

STD_{max} steht für den maximal erreichbaren STD-Sättigungsgrad bei einem entsprechenden Quotienten von freiem zu gebundenem Liganden. k_{sat} steht für die Sättigungsrate und ist eine virtuelle Grösse, t für die Sättigungsdauer.

Exemplarisch wurde der STD-Intensitätsverlauf der Resonanzen des H3-Protons und der Protonen der *O*-Methylgruppe bei drei verschiedenen Konzentrationen analysiert. Die mit diesem Fit bestimmte beobachtbare Sättigungsrate beschreibt die Geschwindigkeit mit der sich, bei einem entsprechendem Überschuss an freiem Liganden, das Gleichgewicht einstellt. Bei einem 12.5-fachen Überschuss – entsprechend der 0.5 mM β-GalOMe Konzentration – lag k_{sat} für das H3-Signal bei 0.82. Dieser Wert sinkt bei einer Erhöhung der Ligandenkonzentration auf 1 mM bzw. 4 mM auf k_{sat}-Werte von 0.65 respektive 0.36. Folglich verlangsamt sich die Einstellung des Sättigungs-Gleichgewichts bei einer Erhöhung der Ligandenkonzentration.

Auch die beobachtbare Sättigungsrate der *O*-Methylgruppe wird mit zunehmender Konzentration geringer, sie sinkt von 0.55 bei einem 12.5-fachen Überschuss über 0.44 bei einem 25-fachen Ligandenüberschuss auf 0.34 bei einem 100-fachen Ligandenüberschuss. Je niedriger k_{sat} ist, desto länger muss die Sättigungsperiode sein, um den maximalen STD-Amplifikations-Faktor zu erreichen.

Welche Parameter ausser der Konzentration des Liganden beeinflussen die Einstellung des Gleichgewichts noch? Hier sind vor allen Dingen drei Konstanten entscheidend, die R_{1f}-Relaxationsrate des Liganden im freien Zustand, die Sättigungstransferrate R_{sat}, mit der die Sättigung vom Protein auf den Liganden übertragen wird, der Assoziationsrate k_{on} und der Dissoziationsrate k_{off}.

- Die Spin-Gitter-Relaxationsrate R_{1f} wirkt der Sättigung entgegen, d.h. je grösser diese Rate ist, desto schneller wird das Gleichgewicht erreicht – aber desto kleiner wird auch STD_{max} sein.
- Die Sättigungstransferrate R_{sat} ist entscheidend für den Aufbau der Sättigung am Liganden. Sie kann hier nur über die gemittelte Kreuzrelaxationsrate des Protein-Ligand-Komplexes σ_b approximiert werden (74). Je grösser das Protein, desto grösser ist auch R_{sat} bzw. σ_b. R_{sat} ist zudem abstandsabhängig und daher müsste die genaue Entfernung der einzelnen Ligandenprotonen von Proteinprotonen bekannt sein, um diesen Wert exakt bestimmen zu können. Diese Abstandsabhängigkeit der Sättigungstransferrate wird bei der Bestimmung des Bindungsepitops ausgenutzt, da hauptsächlich dadurch die Grösse der STD-Signale innerhalb eines Liganden determiniert wird.
- Die Dissoziationsrate ist entscheidend dafür, wie hoch der Durchsatz an Liganden während der Sättigungsphase ist. Die Dissoziationsrate ist $k_{off} = 1 / \tau_b$ und entspricht dem Kehrwert der Aufenthaltsdauer des Liganden im gebundenen Zustand.

Das STD-NMR-Experiment ist damit zum einen abhängig von der Grösse der Sättigungstransferrate R_{sat} vom Protein auf den Liganden, zum anderen von der Assoziationsrate, der Austauschgeschwindigkeit zwischen dem freien und gebundenen Zustand und letztlich auch von der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes.

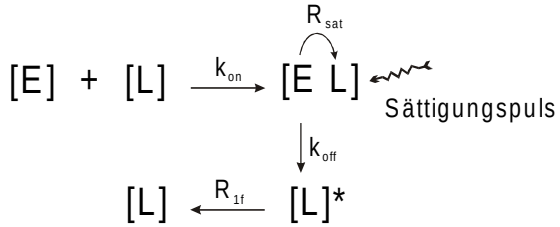

Abbildung 35. Schema der Prozesse, welche die Grösse der STD-Effekte beeinflussen. Liganden werden im gebundenen Zustand mit R_{sat} gesättigt und gelangen mit der Dissoziationskonstante k_{off} in den freien Zustand [L]*, wo sie mit R_{1f} zu ungesättigten Liganden [L] relaxieren. Eine Gleichgewichtssättigung tritt dann ein, wenn die Bildung der gesättigten Liganden [L]* und deren Relaxation zu ungesättigten Liganden gleich gross sind.

Abbildung 35 zeigt schematisch die konkurrierenden Prozesse auf, welche einen Einfluss auf die Grösse des STD-Signals haben. Der Aufbau der

Magnetisierung am Liganden – also die tatsächliche STD-Sättigungsrate – ist proportional zu der Sättigungstransferrate des Proteins R_{sat}.

Der Abfall der Magnetisierung am Liganden – also die T_{1f}-Relaxationszeit des Liganden im freien Zustand – ist nur proportional zu der Konzentration an gesättigten Liganden [L]*. Dieser Anteil nimmt mit zunehmender Konzentration immer weiter ab, wodurch auch die STD-Relaxationsrate geringer wird und somit das Gleichgewicht später erreicht wird. Die einzige der drei Konstanten, die verlässlich bestimmbar ist, ist R_{1f}. Weder die Sättigungskonstante R_{sat}, noch die Aufenthaltsdauer des Liganden im gebundenem Zustand τ_b konnten hier NMR-spektroskopisch bestimmt werden, daher lässt sich die diesen Abhängigkeiten zu Grunde liegende Differentialgleichung nicht eindeutig lösen. Bei langsamen Dissoziationsraten, die nicht schneller als 1 Hz sind, lässt sich die τ_b mit dem SPR-Verfahren bestimmen. Wie jedoch später gezeigt wird, lagen die Wechselzahlen aller hier analysierter Saccharide in einem Bereich mit einem $k_{off} > 1$ s und waren somit nicht bestimmbar.

STD_{max} – der maximal erreichbare Sättigungsgrad – nimmt mit zunehmender Konzentration ab, da der Anteil an Liganden im gebundenem Zustand [EL]/[L] sinkt. Bei diesem System nimmt STD_{max} des H3-Signals von β-GalOMe von 0.36 bei 0.5 mM auf 0.22 bei 4 mM ab (nicht gezeigt). Bei einer 0.5 mM Konzentration werden also maximal 36%, bei der 4 mM Konzentration entsprechend nur 22% der H3-Signalintensität gesättigt. Diese Werte ergeben multipliziert mit der Liganden-konzentration dann eine gesättigte oder aktive Ligandenkonzentration von 0.18 bzw. 0.88 mM.

Einfluss des Ligandenüberschusses auf die Bestimmung der Bindungsepitope

Wie aus dem Vergleich der drei Diagramme zu ersehen ist, steigen auch die Unterschiede zwischen den STD-Amplifikations-Faktoren der einzelnen Protonen mit der Ligandkonzentration. Ein hoher Überschuss an Liganden ist eindeutig von Vorteil bei der Bestimmung von Bindungsepitopen. Die flachere Kurve der *O*-Methylgruppe zeigt besonders bei hohen Ligandenkonzentrationen zudem einen leicht sigmoiden Verlauf. Dies ist dadurch zu erklären, dass die entsprechenden Protonen keinen sehr engen Kontakt zur Proteinoberfläche haben, sondern ihre

Sättigung eventuell über Dritte vermittelt bekommen. Ein weiterer Vorteil bei hohen Ligandenüberschüssen ist, dass die Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments steigt, da über den schnellen Austausch schwach bindender Moleküle das Proteinsignal amplifiziert werden kann. Demnach ist eine effektive Bestimmung des Bindungsepitops auch kleinerer Liganden möglich, wenn sie sich im schnellen chemischen Austausch befinden und hohe Konzentrationen verwendet werden.

STD-Kompetitionsexperimente

Kompetitionsexperimente geben Auskunft darüber, ob zwei – oder mehrere – Liganden um die gleichen Bindungsstelle konkurrieren. Zusätzlich können aus Kompetitionsexperimenten mit wenig Aufwand IC_{50}-Werte bestimmt werden. Dieser Wert gibt an wie hoch die Konzentration des kompetitiven Inhibitors sein muss, um die Hälfte des vorgelegten Liganden aus der Bindungstasche zu verdrängen (*5*). Ist die Dissoziationskonstante eines der beiden Partner bekannt, so kann aus dem IC_{50}-Wert auch der K_D-Wert des anderen ermittelt werden.

Kompetition zwischen den Liganden macht sich durch eine Erniedrigung der STD-Signalintensität der vorgelegten Substanz bei Zugabe eines zweiten Inhibitors bemerkbar. Hier wurde α-GalOMe in einer 4 mM Konzentration vorgelegt und β-GalOMe zutitriert. Abbildung 36 zeigt den Verlauf der STD-Signalintensitäten der H4-Resonanzen beider Saccharide. Die Signalintensität von α-GalOMe (Quadrate) nimmt bei zunehmender β-GalOMe Konzentration rasch ab, während die Signalintensität von β-GalOMe (Kreise) zunimmt. Die beiden Substanzen interagieren folglich mit der gleichen Bindungsstelle. Dem Verlauf beider Kurven kann entnommen werden, dass bei gleichen Konzentrationen der beiden Liganden (4 mM) die Signalintensität von β-GalOMe etwas grösser, als die von α-GalOMe ist. Dies ist kein Hinweis für die höhere Affinität von β-GalOMe. Wie in Abschnitt 4.4.5 auf Seite 98 bei einem weiteren Kompetitionsexperiment demonstriert wird, ist es jedoch kein eindeutiger Beweis. Selbst wenn der eine Ligand einen grösseren Anteil der Bindungsplätze belegt, bedeutet dies nicht, dass er auch automatisch einen höheren STD-Amplifikations-Faktor besitzt, da die Sättigungseffizienz für Moleküle mit höheren Wechselzahlen grösser ist. Auch hier wissen wir aus den STD-Titrations-experimenten, dass β-GalOMe weniger effizient gesättigt wird als α-GalOMe.

Trotzdem erreicht es bei gleicher Konzentration höhere STD-Intensitäten und belegt demnach mehr Bindungsstellen als α-GalOMe.

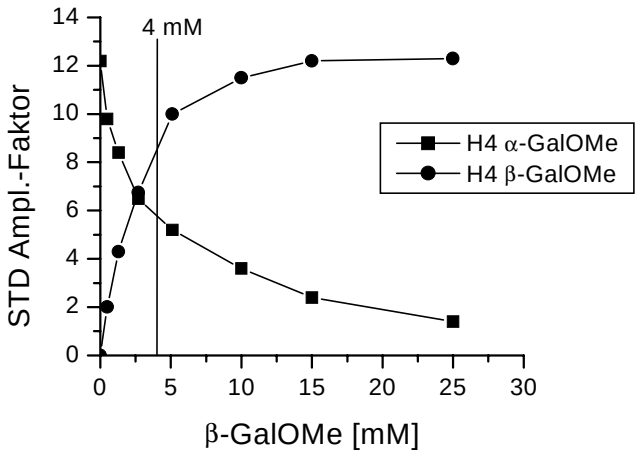

Abbildung 36. Das Diagramm zeigt die STD-Amplifikations-Faktoren (Quadrate, H4-α-GalOMe; Kreise, H4-β-GalOMe) ermittelt aus den STD-NMR-Spektren bei Titration von β-GalOMe zu einer Probe von RCA_{120} (20 µM) und α-GalOMe (4 mM). Die Signalintensität des H4-Protons von α-GalOMe nimmt mit zunehmender Konzentration von β-GalOMe von 12 auf 3 ab. Gleichzeitig nehmen die STD-Amplifikations-Faktor des H4-Protons von β-GalOMe kontinuierlich mit zunehmender Titration zu. Dieser Plot beweist die Kompetition der beiden Liganden um die selbe Bindungsstelle.

Ein weiterer Beweis für die Kompetition ist der Verlauf der STD-Amplifikationskurve von β-GalOMe. In Anwesenheit von α-GalOMe steigt sie deutlich langsamer an als ohne. Beispielsweise erreicht die H4-Resonanz von β-GalOMe ohne Konkurrenten bei 2 mM einen Wert von 8 (siehe Abbildung 33). In Anwesenheit von α-GalOMe, hat sie erst einen Wert von 5 erreicht. Es wird eine höhere Konzentration an Ligand benötigt, um die Bindungsstelle vollständig zu besetzen. Dennoch wird bei höheren Konzentrationen der gleiche maximale STD-Amplifikations-Faktor erreicht, was eindeutig auf kompetitive Hemmung hinweist.

Zusätzlich boten sich diese Experimente an, um zu testen, in wie weit sich auch die Dissoziationskonstanten über kompetitive STD-Titrationskurven bestimmen lassen. Hierzu wurde die oben abgebildete Kompetitionskurve nun mit einer logarithmischen Auftragung der Konzentration gegen den STD-

Amplifikations-Faktor von α-GalOMe dargestellt und an eine Kompetitionsfunktion für eine Bindungsstelle angepasst (*117*).

$$STD\ Faktor = STD - AF_{\min} + \frac{(STD - AF_{\max} - STD - AF_{\min})}{1 + 10^{LogX - LogIC50}}$$

STD Faktor = STD Intensität des vorgelegten Liganden bei gegebener Inhibitorkonzentration
$STD\text{-}AF_{min}$ = STD-Amplifikations-Faktor bei hoher Inhibitorkonzentration
$STD\text{-}AF_{max}$ = STD-Amplifikations-Faktor in Abwesenheit von Inhibitor
LogX = Konzentration des Inhibitors
Log IC_{50} = Inhibitorkonzentration, die zu einer um 50% verminderten Aktivität führt

Die Anpassung erfolgte mit dem Programm Origin 6.0 von Microcal. Bei der Anpassung der Daten wurde angenommen, dass für sehr hohe Konzentrationen an β-GalOMe der STD-Amplifikations-Faktor von α-GalOMe ($STD\text{-}AF_{min}$) auf den Wert 0 abfällt – der Ligand also keine unspezifischen Bindungen eingeht und vollständig verdrängt wird. Die hier höchste eingesetzte Konzentration von 25 mM β-GalOMe bewirkte noch keine vollständige Verdrängung von α-GalOMe aus der Bindungstasche. Auch $STD\text{-}AF_{max}$ wurde für sehr geringe Konzentrationen an β-GalOMe festgesetzt. Hier wurde der STD-Amplifikations-Faktor von 12.3 festgelegt, der in Abwesenheit von Inhibitor erreicht wurde.

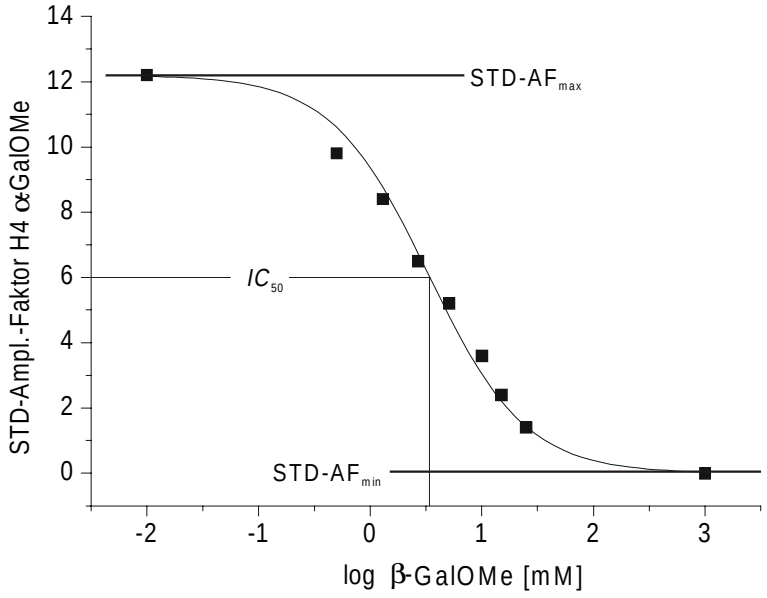

Abbildung 37. Logarithmische Auftragung der β-GalOMe Konzentration gegen den STD-Amplifikations-Faktor des H4 Signals der vorgelegten α-GalOMe. Die Quadrate zeigen die experimentellen Daten und die durchgezogene Linie die Anpassung an die Gleichung für die Kompetition um eine Bindungsstelle.

Die aus den STD-Titrationsexperimenten erhaltenen Werte lassen sich gut an die Gleichung anpassen (Abbildung 37). Aus der Analyse geht hervor, dass bei log 0.52, also einer ca. 3.3 mM Konzentration von β-GalOMe die Hälfte an α-GalOMe aus der Bindungstasche verdrängt wurde. Der so ermittelte IC_{50}-Wert ist massgeblich von drei Faktoren abhängig.

- der Affinität des Rezeptors für den Inhibitor, eine hohe Affinität spiegelt sich in einem niedrigen IC_{50} wieder.
- der Konzentration des vorgelegten Liganden, also desjenigen der verdrängt wird. Je höher diese gewählt wird, desto höher wird auch die Konzentration an Inhibitor sein, die nötig ist, um die Hälfte des vorgelegten Liganden zu verdrängen.
- der Affinität des vorgelegten Liganden, je höher diese ist, desto höher muss auch die Konzentration des Inhibitors gewählt werden.

Über die unten dargestellte sogenannte Cheng-Prusoff-Gleichung lässt sich nun aus dem IC_{50} der K_I-Wert des Inhibitors bestimmen, wenn der K_D-Wert des vorgelegten Liganden bekannt ist (*5*).

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Ligand]}{K_D}}$$

Durch eine Umformung lässt sich bei bekanntem K_I-Wert des Inhibitors, der K_D-Wert der vorgelegten Substanz bestimmen:

$$K_D = \frac{[Ligand] \cdot K_I}{IC_{50} - K_I}$$

Mit Hife der zweiten Gleichung kann nun der K_D-Wert der vorgelegten Substanz ermittelt werden. Die Konzentration des vorgelegten Liganden α-GalOMe lag in diesem Experiment bei 4 mM, ihr K_D-Wert soll bestimmt werden. Bei einem IC_{50} von 3.3 mM und dem bekannten K_I-Wert von 2.6×10^{-4} M für β-GalOMe folgt für α-GalOMe ein K_D-Wert von 3.4×10^{-4} M. Diese Daten sagen aus, dass RCA_{120} eine nur geringfügig höhere Affinität gegenüber β-GalOMe besitzt, als zu α-GalOMe. Der K_D-Wert von α-GalOMe wurde von Sharma *et al.* mittels einer mikrokalorimetrischen Titration bestimmt und lag bei ca. 8×10^{-4} M *(111)*. Das STD-Kompetitionsexperiment weist somit eine gute Übereinstimmung auf. Es ist sicher nicht zu erwarten, dass die verschiedenen Experimente zur Bestimmung der Dissoziationskonstante identische

Werte liefern würden. Daher ist die Bestimmung des K_D-Wertes über diese STD-Titrationsexperimente mit einer befriedigenden Genauigkeit möglich.

SPR-Analyse

Um die erhaltenen Daten der NMR-Untersuchungen und der Literaturdaten aus der Mikrokaloriemetrie zu bestätigen, wurden SPR-Untersuchungen durchgeführt. Wie schon durch die NMR-Daten belegt, handelt es sich bei β-GalOMe und RCA_{120} um ein System, das sich im schnellen chemischen Austausch befindet. Daher konnten die Dissoziationskonstanten nur aus *steady-state* Titrationsmessungen bestimmt werden. Will man die Dissoziationskonstanten aus den Assoziations- und Dissoziationsraten bestimmen, dürfen die k_{on}- und k_{off}-Werte nicht zu gross sein. Da dies jedoch hier der Fall war, wurden 8 Konzentrationen vorgelegt und nacheinander über den mit 2 ng immobilisierten RCA_{120} belegten Dextran-Chip gegeben. Bei einem Fluss von 40 µL/min betrug die Assoziationsphase 75 s und die Dissoziationsphase 60 s. Aus den für die jeweiligen Konzentrationen erhaltenen RU-Antworten wurde über ein Langmuir-Bindungsmodell der K_D-Wert bestimmt.

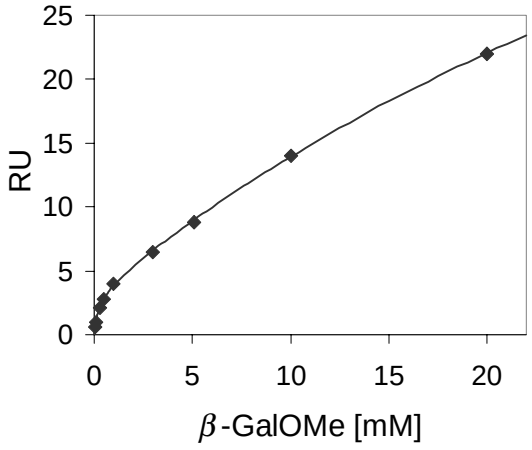

Abbildung 38. Gemessene RU Antwort gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Messwerte sind durch die Rauten dargestellt, die durchgezogene Linie entspricht einem Langmuir-Fit mit zwei unabhängigen Bindungsstellen.

Wie aus Abbildung 38 deutlich wird, steigt die RU-Antwort bis zu einer Konzentration von etwa 3 mM stark an. Jedoch ist eine weitere Steigung im Bereich hoher Konzentrationen zu beobachten und selbst bei einer Saccharidkonzentration von 20 mM ist der *steady-state* Sättigungsbereich nicht erreicht. Mit einer Funktion, die nur eine Bindungsstelle beinhaltet, lassen sich diese experimentellen Daten nicht

beschreiben. Deshalb wurden die Daten mit einem erweiterten Bindungsmodell bearbeitet. Bei diesem Modell wurde eine zweite, unabhängige Bindungstasche mit niedriger Affinität postuliert. Die Anpassung ist in Abbildung 38 als durchgezogene Linie dargestellt und zeigt eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Werten. Die erhaltenen K_D-Werte betrugen 2.6×10^{-4} M für die Hochaffinitäts-Bindungsstelle und 6.2×10^{-2} M für die sekundäre Bindungsstelle. Der Wert für die primäre Bindungsstelle stimmt sehr gut mit den Literaturwerten der kalorimetrischen Untersuchung überein (2.6×10^{-4} M bei 292.7 K) (*111*). Ob bei einem K_D-Wert von 62 mM der sekundären Bindungsstelle noch von einer spezifischen Bindung ausgegangen werden kann, ist unklar, da Sättigung nicht erreicht wurde. Zudem wurden die weiter ansteigenden RU-Werte erst bei sehr hohen Konzentrationen erhalten. Es ist daher unsicher, ob das SPR-System bei einer Konzentration von 20 mM und mehr noch verlässliche Daten liefern kann. Auch in den folgenden SPR-Untersuchungen sind die hier gemachten Beobachtungen aufgetreten. SPR-Untersuchungen, die von J. Wülfken durchgeführt wurden zeigten, dass auch Peptide, die auf ihre Interaktion mit einem immobilisiertem CD4-Rezeptor getestet wurden, bei hohen Konzentrationen ähnliche Kurvenverläufe hatten (*118*). Es handelt sich somit nicht um eine Beobachtung, die nur bei diesem Lektin auftrat.

4.4.4 *N*-Acetyl-D-lactosamin

Bestimmung des Bindungsepitops

Die kalorimetrischen Studien von Sharma *et al.* belegten, dass eine zweite Monosaccharid-Bindungsstelle benachbart zur Galactose vorhanden ist. Allerdings hat diese sekundäre Bindungsstelle einen geringeren Beitrag zur Affinität, als die primäre Bindungsdomäne. Von den durch Sharma *et al.* untersuchten Disacchariden hatte LacNAc die höchste Affinität gegenüber RCA_{120} und es wurde daher für die STD-NMR-Untersuchungen eingesetzt.

In Abbildung 39 sind das ^{1}H-NMR-Referenzspektrum (A) und das entsprechende STD-NMR-Spektrum (B) von LacNAc in Gegenwart von RCA_{120} dargestellt. Es mussten hier WATERGATE NMR-Spektren aufgenommen werden, da der Anteil an H_2O in der Probe zu hoch war. Aus diesem Grund ist der Bereich um die Wasserresonanz deutlich in seiner Intensität vermindert, was besonders die

Region der anomeren Protonen betrifft. Das Verhältnis α- zu β-Anomer lag hier bei etwa 1:1. Die STD-Intensitäten der einzelnen Signale des Galactose- und des GlcNAc-Restes sind deutlich verschieden. Signale, die zu dem Galactose-Rest gehören, haben die grössere Intensität im STD-NMR-Spektrum (B). Die STD-Signale der H3´- und H4´-Protonen der Galactose sind am stärksten gesättigt und haben somit den grössten Kontakt zur Proteinoberfläche. Sie wurden auf 100% normiert. Das STD-Signal des H2´-Protons zeichnen sich ebenfalls deutlich im STD-NMR-Spektrum ab und besitzt STD-Integrale im Bereich von etwa 70%.

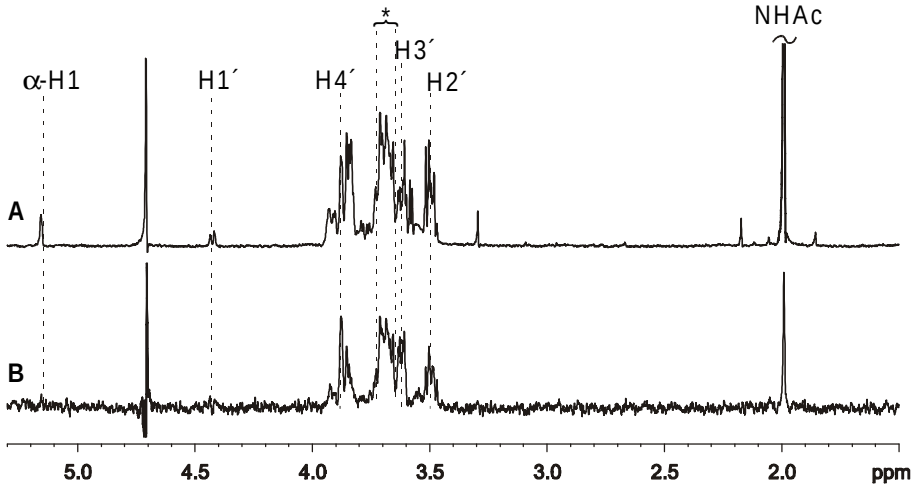

Abbildung 39. A) WATERGATE ^{1}H-NMR Referenzspektrum, B) WATERGATE STD-NMR-Spektrum von 2 mM LacNAc in Gegenwart von 40 µM RCA_{120}. Gekennzeichnet sind die H1´- bis H4´-Protonen der Galactose sowie die Signale des α-H1-Protons und der *N*-Acetylgruppe. Die mit dem Stern gekennzeichneten STD-Signale der Region von 3.65 – 3.75 ppm stammen hauptsächlich von den H5´-, H6a/b´- und den H2-, H3- und H4- Protonen des β-anomeren LacNAc (siehe auch Abbildung 40).

Wie man dem Referenz-TOCSY-Spektrum in Abbildung 40 entnehmen kann, stammen die Beiträge der Protonen im Bereich von 3.65 ppm bis 3.75 ppm hauptsächlich von den H5´-, H6a´- und H6b´-, sowie den H2-, H3- und H4-Protonen der β-anomeren Verbindung. Im TOCSY-Spektrum läßt sich deutlich das Spinsystem der Galactose vom H1´-bis H4´-Proton ausmachen. Die H5´- sowie die beiden H6a/b´-Protonen sind wegen der zu kleinen $^3J_{H4,H5}$-Kopplungskonstante von dem Rest des Spinsystems isoliert und weisen daher keine Kreuzpeaks auf. Die Spinsysteme der α- bzw. β-GlcNAc-Einheiten reichen zwar im TOCSY vom H1- bis zu den entsprechenden H6-Protonen, dennoch sind auch hier noch deutliche Überlappungen der Resonanzen zu beobachten. Gut erkennbar aus dem in der F2-

Projektion abgebildeten 1D STD-NMR-Spektrum der Abbildung 40 wird, dass der Beitrag zur STD-Intensität der α-anomeren Verbindung nur klein ist.

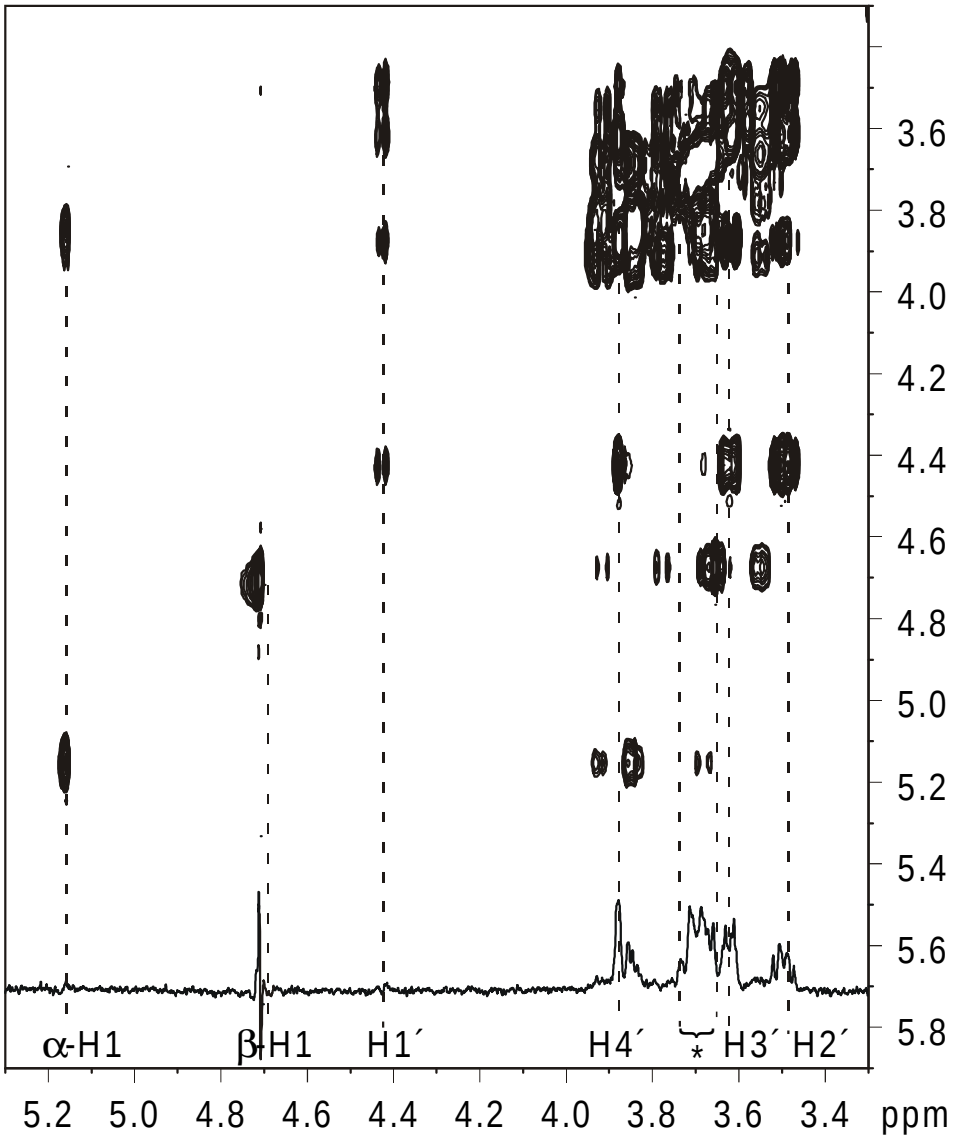

Abbildung 40. Referenz TOCSY Spektrum mit dem 1D STD-NMR-Spektrum in der F2-Projektion. STD-Signale aus der mit dem Stern gekennzeichnete Region von 3.65 – 3.75 ppm stammen hauptsächlich von den H5´-, H6a/b´- und den H2-, H3- und H4- Protonen des β-anomeren LacNAc.

Die Beiträge der einzelnen Protonen zum STD-NMR-Spektrum können abgeschätzt werden. Dazu wird davon ausgegangen, dass die H5´-, H6a´- und H6b´-Protonen ähnliche Werte erlangen, wie die zuvor untersuchten α-GalOMe bzw. β-GalOMe Monosaccharide – also je nach Konzentration zwischen 70% und 80% je Proton. Das Restintegral der mit dem Stern gekennzeichneten Region des STD-NMR-Spektrums wird nach Subtraktion dieses approximierten Wertes den entsprechenden

H2-, H3- und H4-Protonen von β-LacNAc zugewiesen. Der so errechnete Wert beläuft sich auf ca. 60 - 70% je Proton. Die Signale des GlcNAc-Restes erreichen demzufolge auch sehr deutliche Unterschiede in ihrer STD-Intensität und den H2-, H3- und H4-Protonen der GlcNAc-Einheit kann ein grösserer Sättigungswert zugeschrieben werden, als den anderen Protonen des GlcNAc-Restes. Beispielsweise erreichten die STD-Integrale der H6a/b oder der *N*-Acetylgruppe des GlcNAc-Restes einen Wert von nur ca. 25%. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Region von C2 bis C4 des GlcNAc-Restes eine grosse Nähe zur Proteinoberfläche aufweist.

Da aus den Untersuchungen von Sharma *et al.* hervorgegangen ist, dass LacNAc eine höhere Affinität gegenüber RCA_{120} besitzt als Lactose, wurde der *N*-Acetylgruppe eine zentrale Bedeutung zugeschrieben. Er postulierte, dass die Acetamidogruppe eine hydrophobe Wechselwirkung zum Lektin eingeht. Im STD-NMR-Spektrum erreichte diese Gruppe – im Vergleich zu den anderen Signalen des GlcNAc-Restes – keine nennenswerte Sättigungssteigerung, sie fällt gegenüber der C2 – C4-Region sogar deutlich ab. Somit lässt sich aus den STD-NMR-Spektren dieser Gruppe kein grosser Beitrag zur Bindung zuweisen. Die anomeren Protonen können leider wegen der Intensitätsmodulation durch die HDO-Unterdrückung mit WATERGATE nicht analysiert werden.

Bhattacharyya *et al.* fanden bei seiner Studie mit Lactose-Derivaten heraus, dass zwar die Glucose-Einheit zur Bindungsaffinität beiträgt, ihr Beitrag zur Bindungsenergie jedoch auf ca. 20% beschränkt ist (*119*). Auch diese Werte stimmen gut mit den hier erhaltenen Daten überein, die ebenfalls dem GlcNAc-Rest eine geringere Wechselwirkung mit der Bindungsdomäne bescheinigen. Eindeutig dagegen ist die starke Wechselwirkung des Galactose-Restes mit der Bindungstasche – in guter Übereinstimmung mit den STD-NMR-Spektren der Monosaccharide.

STD-Titrationsexperiment

LacNAc hat einen K_D-Wert von ca. 3×10^{-5} M (*111*) und hat somit eine etwa 8 mal höhere Affinität als das Monosaccharid β-GalOMe. Dem Titrationsexperiment in Abbildung 41 kann entnommen werden, dass die Kurve des H4-Protons der Galactose im Vergleich zu der vorhergegangenen Titration (siehe Abbildung 33) schon bei niedrigeren Konzentrationen abflacht. Zudem erreichen die STD-Amplifikations-Faktoren geringere Werte von nur etwa 5 bei einer 2 mM

Konzentration, was ein Hinweis auf einen Liganden mit höherer Affinität ist. Die Erhöhung der Affinität geht hier, wie schon bei *β*-GalOMe, mit einer Erniedrigung der Austauschgeschwindigkeit einher – es werden also weniger Liganden während der definierten Einstrahldauer von 2 s gesättigt. Die experimentellen Daten stimmen folglich sehr gut mit der Theorie überein.

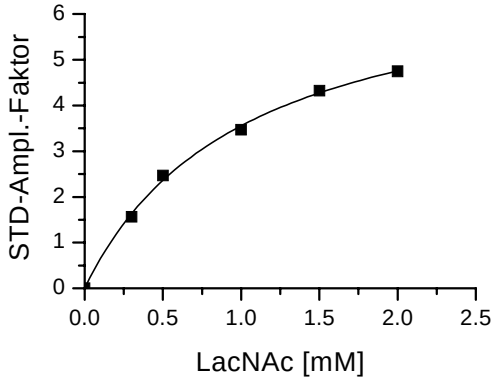

Abbildung 41. Titration von LacNAc zu einer Probe von RCA_{120} (20 µM).

SPR-Analyse

Es wurden die gleichen Parameter wie bei der SPR-Untersuchung von *β*-GalOMe eingehalten. Aus den erhaltenen *steady-state* RU-Antworten bei 9 verschiedenen Konzentrationen ist erkennbar, dass die Daten auch hier mit der um eine sekundäre Bindungsstelle erweiterten Funktion bearbeitet werden müssen.

Der Verlauf der RU-Kurve zeigt in diesem Fall die beiden unterschiedlichen und überlagerten Affinitäten besonders deutlich. Ein sehr steiler Anstieg bei niedrigen Konzentrationen – charakteristisch für die Hochaffinitäts-Bindungsstelle – und der kontinuierliche, aber langsame Anstieg bei hohen Konzentrationen, der die sekundäre Bindungsstelle beschreibt. Die so erhaltenen K_D-Werte für die Hochaffinitäts-Bindungsdomäne von 2.89×10^{-5} M bei einer Raumtemperatur von ca. 25°C zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zu den Literaturwerten von Sharma *et al.* (3.03×10^{-5} M bei 292.6 K). Die sekundäre Bindungsstelle erlangte einen Wert von ca. 20 mM, also um einen Faktor drei kleiner als bei *β*-GalOMe. Die hier durchgeführten SPR-Untersuchungen stimmen ausgezeichnet mit den von Sharma *et al.* in Lösung vorgenommenen kalorimetrischen Bindungsstudien überein.

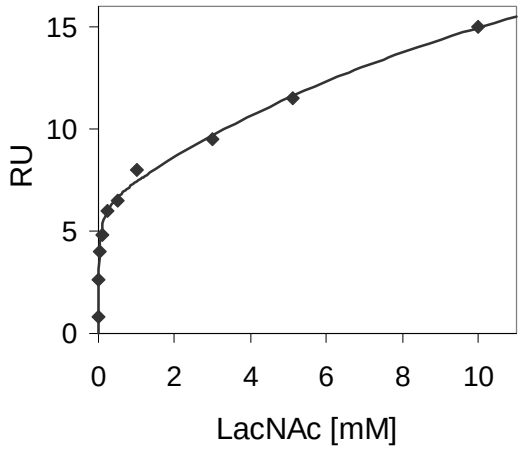

Abbildung 42. Die gemessene RU-Antwort wurde gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Messwerte sind durch die Rauten dargestellt, die durchgezogene Linie entspricht einem Langmuir-Fit mit zwei unabhängigen Bindungsstellen.

4.4.5 Asialo-Komplex-Typ Biantennäres Decasaccharid NA_2

Bestimmung des Bindungsepitops

Das Asialo-Komplex-Typ biantennäre Decasaccharid NA_2 (Abbildung 43) wurde aus dem *N*-Typ-Glycoprotein Fibrinogen isoliert und wurde freundlicherweise von Dr. S. Meyer und Frau A. Kahrs zu Verfügung gestellt (*120*, *121*). Eine von Shinohara durchgeführte SPR-Studie mit NA_2 und RCA_{120} zeigte, dass es sich um einen im Nanomolaren Bereich bindenden Liganden handelt (*122*). Postuliert wurde dabei, dass die Bindungstasche von RCA_{120} bis zu drei terminale Galactose-Reste erkennen kann. Die starke Erhöhung der Affinität ist dann über die Avidität zu erklären – die Affinitäten der jeweiligen Mono- bzw. Disaccharidfragmente würden sich dann im günstigsten Fall multiplizieren. Aus anderen SPR-Studien, mit Poly-*N*-Acetyl-lactosamin enthaltenden Glycopeptiden, wurden K_D-Werte zwischen 1.2×10^{-7} M und 2.4×10^{-8} M für die Interaktion mit RCA_{120} bestimmt (*123*). Daher bestand ein Interesse daran diesen – von den vier untersuchten Sacchariden – grössten (MW = 1836 Da) und am stärksten bindenden Liganden zu untersuchen.

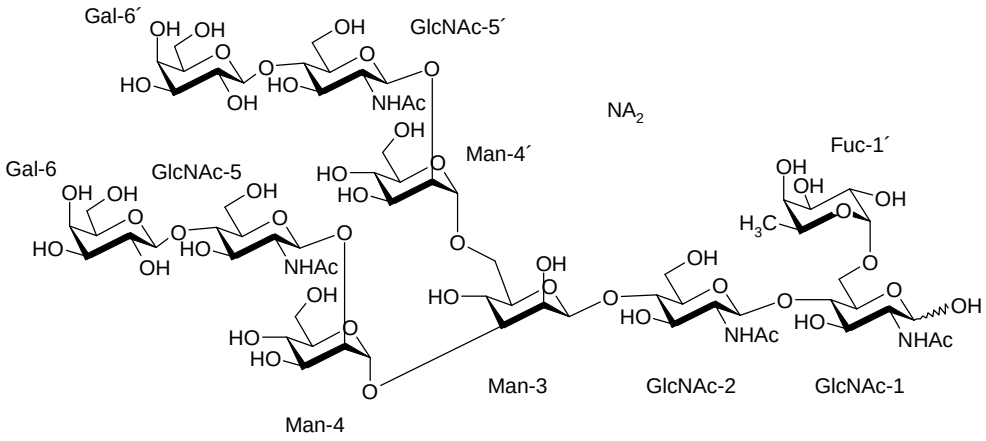

Abbildung 43. Struktur des Asialo-Komplex-Typ biantennären Decasaccharids NA_2.

1D STD-NMR-Spektrum: Abbildung 44 zeigt einen Ausschnitt des Referenzspektrums (A) und STD-NMR-Spektrums (B) von NA_2. Die Region der Ringprotonen ist stark überlagert und ist daher nicht für eine detaillierte und exakte Analyse geeignet. Bemerkenswert ist, dass die STD-Signale unter den gegebenen Messbedingungen überhaupt gute Ergebnisse liefern. Da – wie schon oben erwähnt – die absolute Signalintensität mit Abnahme der Austauschgeschwindigkeit sinkt, liefert ein sehr starker Inhibitor nur sehr schwache STD-Signale. Die Grösse der beobachteten Effekte weist jedoch darauf hin, dass es sich nicht um einen im Nanomolaren Bereich bindenden Inhibitor handeln kann.

Die Bestimmung des Bindungsepitops erfolgte auch hier aus den 1D-STD-NMR-Spektren, wobei erneut die Intensität der – in diesem Fall zwei – H4-Protonen auf 100% kalibriert wurde. In Tabelle 1 sind die relativen STD-Intensitäten der einzelnen relevanten Bereiche aufgelistet. Die anomeren Protonen der terminalen Galactosen und der beiden GlcNAc-5/5´-Reste waren nicht einzeln nach ihrem Verknüpfungsmuster (1-3 oder 1-6) integrierbar. Daher handelt es sich bei diesen Protonen um Mittelwerte. Aus der leicht unterschiedlichen chemischen Verschiebung der anomeren Protonensignale der beiden terminalen Galactosen konnte man jedoch erkennen, dass die STD-Intensitäten in den beiden Antennen nahezu identisch waren.

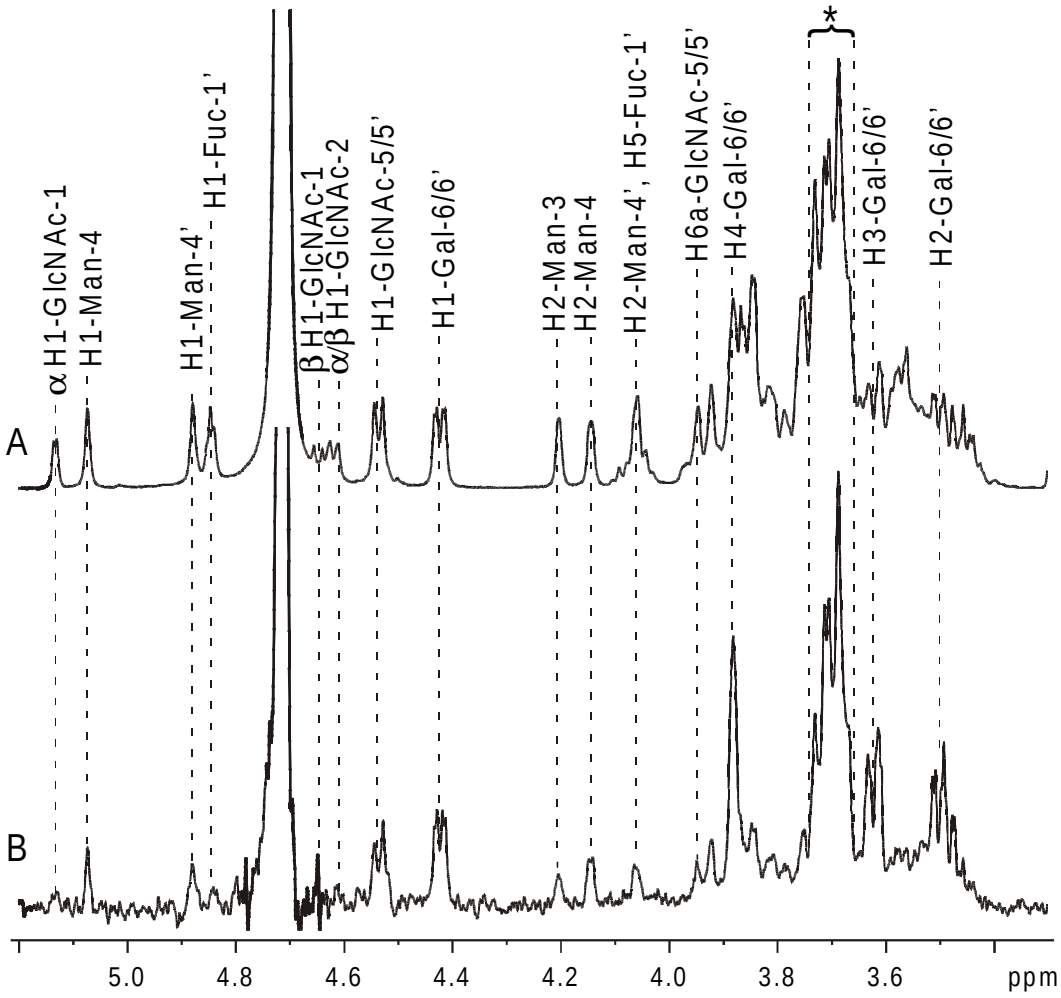

Abbildung 44. A) ^{1}H-NMR-Referenzspektrum B) STD-NMR-Spektrum von NA_2 und RCA_{120} in einem 11-fachen Überschuss. Die Konzentration an Protein betrug 50 µM bezogen auf die Anzahl an Bindungsplätze. Die mit dem Stern gekennzeichneten Resonanzen entsprechen einer Region, die im STD-NMR-Spektrum fast ausschliesslich von den H5, H6a/6b Signalen des Gal-6/6´-Restes und den H2, H3 und H4 Resonanzen des GlcNAc-5/5´-Restes stammen.

Demzufolge bevorzugt RCA_{120} keine der terminalen Galactosen aufgrund ihres Verknüpfungsmusters und das Bindungsepitop reicht somit maximal bis zu den Mannose-Resten. Obwohl die Ringprotonen der Galactose in der sogenannten *hump*-Region zwischen 3.3 und 4 ppm liegen, lassen sich die Resonanzen der H2-, H3- und H4-Protonen eindeutig im STD-NMR-Spektrum identifizieren, da sie eine deutlich erhöhte STD-Signalintensität aufweisen. Die Signale des H5-Protons sowie der beiden H6-Protonen der terminalen Galactose liegen im Frequenzbereich, der durch einen Stern gekennzeichnet ist. In diesem befinden sich auch die Signale der H2, H3 und H4-Protonen der beiden GlcNAc-5/5´-Reste (*124*, *125*). Wie dieser Bereich

behandelt wurde, wird später erläutert. Der Sättigungsgrad nimmt – wie auch schon bei den vorher untersuchten Liganden α/β-GalOMe und LacNAc – von den drei Ringprotonen H2, H3 und H4 zum H1-Proton innerhalb des Galactose-Restes ab. Diese Abnahme der STD-Intensität von den H4-Protonen auf die H1-Protonen ist bei NA_2 nur gering. Auch die STD-Intensität der H1-GlcNAc-5/5´-Protonen erreicht noch sehr hohe Sättigungswerte von ca. 60%. Im Gegensatz hierzu wurde beispielsweise das anomere Proton des GlcNAc-Restes von LacNAc nur zu ca. 20% gesättigt. Dies hängt sowohl mit der niedrigen Konzentration, als auch mit der stärkeren Bindung des NA_2 zusammen.

NA_2 (β-GalOMe) Resonanz		STD-Signal [%] 11-facher Überschuss NA_2	STD-Signal [%] 12.5-facher Überschuss β-GalOMe	STD-Signal [%] 100-facher Überschuss β-GalOMe
H4-Gal-6/6´*	(H4-β-GalOMe)	~100%	90%	87%
H3-Gal-6/6´*	(H3-β-GalOMe)	~100%	100%	100%
H2-Gal-6/6´*	(H2-β-GalOMe)	~100%	95%	87%
H1-Gal-6/6´	(H1-β-GalOMe)	70%	61%	40%
H5-Gal-6/6´*	(H5-β-GalOMe)	~80%	74%	67%
H6a/6b-Gal-6/6´*	(H6a/6b-β-GalOMe)	~80%	72%	63%
H2, H3, H4-GlcNAc-5/5´*		~70%	-	-
H1-GlcNAc-5/5´		52%	-	-
H2-Man-4		44%	-	-
H2-Man-4´		42%	-	-
H1-Man-4		40%	-	-
H1-Man-4´		33%	-	-
H2-Man-3		28%	-	-
NHAc-5/5´		37%	-	-
NHAc-2		17%	-	-
H6-Fuc-1´		2%	-	-

*) Werte mit einem Fehler von ~ 10% wegen Signalüberlappung.

Tabelle 2. Verteilung der STD-Intensitäten von NA_2 und β-GalOMe normiert auf jeweils die intensivsten STD-Signale – hier die H3 Signale der Galactose.

Die H1/H2-Protonen der beiden 1-3 bzw. 1-6 verknüpften Mannosen erhalten Sättigungswerte zwischen 37% und 51%, fallen also gegenüber dem GlcNAc-Rest ab. Hier sind die jeweiligen Protonen der 1-3 und 1-6 verknüpften Mannose getrennt voneinander integrierbar, zeigen jedoch kleine Unterschiede von 48% gegenüber 51% für die H2- respektive 37% zu 46% für die H1-Protonen. Dies ist in Einklang mit den Daten von Bhattacharyya, der ebenfalls keinen Einfluss des Verknüpfungsmusters auf die Affinität der Oligosaccharide beobachten konnte. Desweiteren belegten andere Studien, dass ein weiterer GlcNAc-Rest und der verbrückenden Mannose

keinerlei Einfluss auf die Affinität hatte. Lediglich die Anzahl der Galactosen am nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids waren von Bedeutung (*126*). Die einzige dispergierte Resonanz der verbrückenden Mannose ist das H2-Proton, mit einem Wert von 32%. Von der Fucose und dem GlcNAc-Rest am reduzierenden Ende des Oligosaccharids sind nur sehr kleine Intensitäten von 2% und 17% beobachtbar. Diese Reste besitzen keinen direkten Kontakt zum Protein und erhalten ihre Sättigung durch Spin-Diffusion im gebundenem Zustand.

Die niedrige Konzentration an NA_2 ist zwar für die Bestimmung des Bindungsepitops nicht vorteilhaft, dennoch können wichtige Aussagen zum Bindungsmodus gemacht werden. Wie schon für β-GalOMe gezeigt wurde, steigt der Unterschied der STD-Amplifikations-Faktoren mit zunehmender Konzentration des Liganden. Zum Vergleich wurden in Tabelle 1 die relativen STD-Effekte von β-GalOMe bei einem 12.5-fachen und einem 100-fachen Überschuss neben die STD-Effekte von NA_2 bei einem 11-fachen Überschuss gestellt. Im Gegensatz zum hohen Überschuss von 100:1, bei dem das Bindungsepitop von β-GalOMe bestimmt wurde, gleichen sich bei dem kleineren Überschuss die STD-Effekte an. Beispielsweise erhöht sich der STD-Effekt des H1-Protons von 40% (12.5-facher Überschuss) auf 60% (100-facher Überschuss) relativ zum H3-Proton. Da sich die Unterschiede beim stärker bindenden NA_2 ebenfalls angleichen, lassen sich die jeweiligen STD-Effekte des Gal-6/6´-Restes berechnen.

Ein weiterer interessanter Bereich des Liganden ist die C2 bis C4 Region der benachbarten GlcNAc-5/5´-Reste. Diese zeigte schon bei der Analyse von LacNAc einen erhöhten STD-Effekt. Die Signale von Protonen dieser Region liegen zwischen 3.65 und 3.75 ppm. Zusätzlich liegen in dieser Region auch Signale der folgenden Protonen: H5, H6a und H6b von Gal-6/6´; die H2, H3 und H4 von GlcNAc-2 und 1; H3 und H6a von Man-3; H5 von Man-4 und zwei Ringprotonen Signale von Fuc-1´. Insgesamt liegen Signale von 23 Protonen in dieser Region, jedoch haben nur 12 von ihnen einen signifikanten Beitrag zum Integral im STD-Spektrum. Fuc-1´ und GlcNAc-1 tragen nicht zum STD-Spektrum bei, da sie am weitesten von der Bindungsregion entfernt liegen. Die Beiträge der Signale der H2, H3 und H4 Protonen von GlcNAc-2 zum STD-Signal ist klein und wurde auf ca. 20% abgeschätzt – bestimmt aus dem STD-Integral des dispergierten H1-Protons. Die Beiträge des STD-Signales der H3 und der H6a Protonen von Man-3 liegen bei 30% und der des

H5 Protons von Man-4 bei ca. 40%. All diese Protonen tragen nur wenig zum Gesamtintegral der spektralen Region von 3.65 – 3.75 ppm. Das Gros des STD-Integralwertes verteilt sich auf die 6 Signale der H5, H6a und H6b Protonen von Gal-6/6´ sowie den 6 Signalen der H2, H3 und H4 Protonen von GlcNAc-5/5´. Subtrahiert man die Integralwerte des Gal-6/6´-Restes, die, wie oben beschrieben, bei ca. 80% lagen, so bleibt für die Signale der 6 GlcNAc-5/5´ Protonen ein durchschnittlicher STD-Integralwert von ca. 70%. Die Region von H2 – H4 des GlcNAc-5/5´-Restes hat folglich einen grossen Kontakt mit dem Rezeptor, was in Einklang mit den STD-Daten von LacNAc steht. Dagegen ist die Wechselwirkung des H6a Protons (bei 3.946 ppm) von GlcNAc-5/5´mit dem Protein klein. Es erreicht STD-Effekte von nur ca. 20%. Der Ringsauerstoff sowie die C6-Position von GlcNAc-5/5´ ragen von der Rezeptoroberfläche weg und tragen somit nicht zur Bindung bei. Diese Daten zeigen, dass zusätzlich zu der starken Wechselwirkung der terminalen Galactose auch der benachbarte GlcNAc-Rest in einer *side-on* Konformation mit dem Lektin interagiert.

Die Bestimmung der von dem Rezeptor erkannten Gruppen ist somit problemlos möglich. Bei einer höheren Konzentration an NA_2 wären die Unterschiede zwar deutlicher ausgeprägt gewesen, der Vergleich beim β-GalOMe zeigt jedoch, dass der Einfluss des Überschusses gering ist. Den beiden terminalen Galactosen konnte der höchste Sättigungsgrad zugewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch die Region von H2 bis H4 des benachbarten GlcNAc-Restes einen grossen Beitrag zu Affinität hat. Das STD-NMR-Spektrum zeigt eindeutig, dass die Fucose-1´ und das GlcNAc-1 keinen Kontakt zum Protein haben – ihre STD-Signale sind von vernachlässigbar geringer Intensität. Die Man-4/4´-Reste haben nur einen sehr geringe Kontakte zum Protein, oder sie erhalten ihre Sättigung über die gebundenen Reste der benachbarten Monosaccharideinheiten.

Wieso kommt es überhaupt zu einer Verteilung der Magnetisierung auf Teile des Liganden die keinen direkten Kontakt zum Protein haben? Ein möglicher Grund für die Verteilung der STD-Intensität über weite Bereiche des Oligosaccharids ist, dass es unspezifischen Kontakt nicht-bindender Gruppen mit der Proteinoberfläche gibt – sowie die spezifische Interaktion mit der Galactose zustande gekommen ist. Die nicht direkt gebundenen Reste des Oligosaccharids könnten somit einen Teil der Zeit Kontakt zur Proteinoberfläche haben, jedoch ohne spezifisch erkannt zu werden.

Eine alternative Erklärung ist, dass die Zeit im gebundenen Zustand ausreicht, um Magnetisierung innerhalb des gebundenen Liganden zu verschieben. Über die stark gebundenen Galactose- und GlcNAc-Reste wird dann die Sättigung über die glycosidische Bindung hinweg auf die anderen Reste geschoben. Obwohl die einzelnen glycosidischen Bindungen teilweise starr sind, kann die Glycanstruktur, z. B. bei Glycoproteinen eine gewisse Flexibilität aufweisen (*127*).

2D STD-TOCSY-Spektren: Um die Analyse zu vereinfachen wurde bei dem hier untersuchten Decasaccharid auch ein STD-TOCSY aufgenommen. Abbildung 45 zeigt das Referenzspektrum in (A) sowie das 2D STD-TOCSY-Spektrum in (B). Auch hier lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Spektren erkennen. Einige Kreuzsignale, wie die der Fucose-1´ oder der Man-3 fehlen vollständig, während die Gal-6/6´-Spuren sowie die GlcNAc-5/5´-Spuren deutlich zu erkennen sind. Die Spuren von Man-4 und Man-4´ sind identifizierbar, besitzen aber eine deutlich reduzierte Intensität gegenüber der intensivsten Gal-6/6´-Spur. Das STD-TOCSY-Spektrum wurde über Nacht aufgenommen und hat ein sehr gutes Signal-zu-Rauschen-Vehältnis. Kürzere Akquisitionszeiten wären aber auch hier ohne Probleme möglich.

Einige repräsentative Kreuz- und Diagonalsignale des STD-TOCSY-Spektrums sind in Abbildung 46 wiedergegeben. Die STD-Amplifikations-Faktoren variieren, wie schon beim STD-TOCSY-Spektrum von β-GalOMe, innerhalb der F1-Spuren der verschiedenen Monosaccharid-Reste. Es lässt sich ein Abfall der STD-Signalintensität von den Gal-6/6´-Protonen zu den GlcNAc-5/5´-Protonen und den Man-4/4´-Protonen ausmachen. Nicht gezeigt sind hier die extrem schwachen STD-Intensitäten der Kreuzsignale der GlcNAc-2- bzw. Man-3-Reste. Vollständig vernachlässigbar waren die Kreuzsignale der Fucose und des GlcNAc-1.

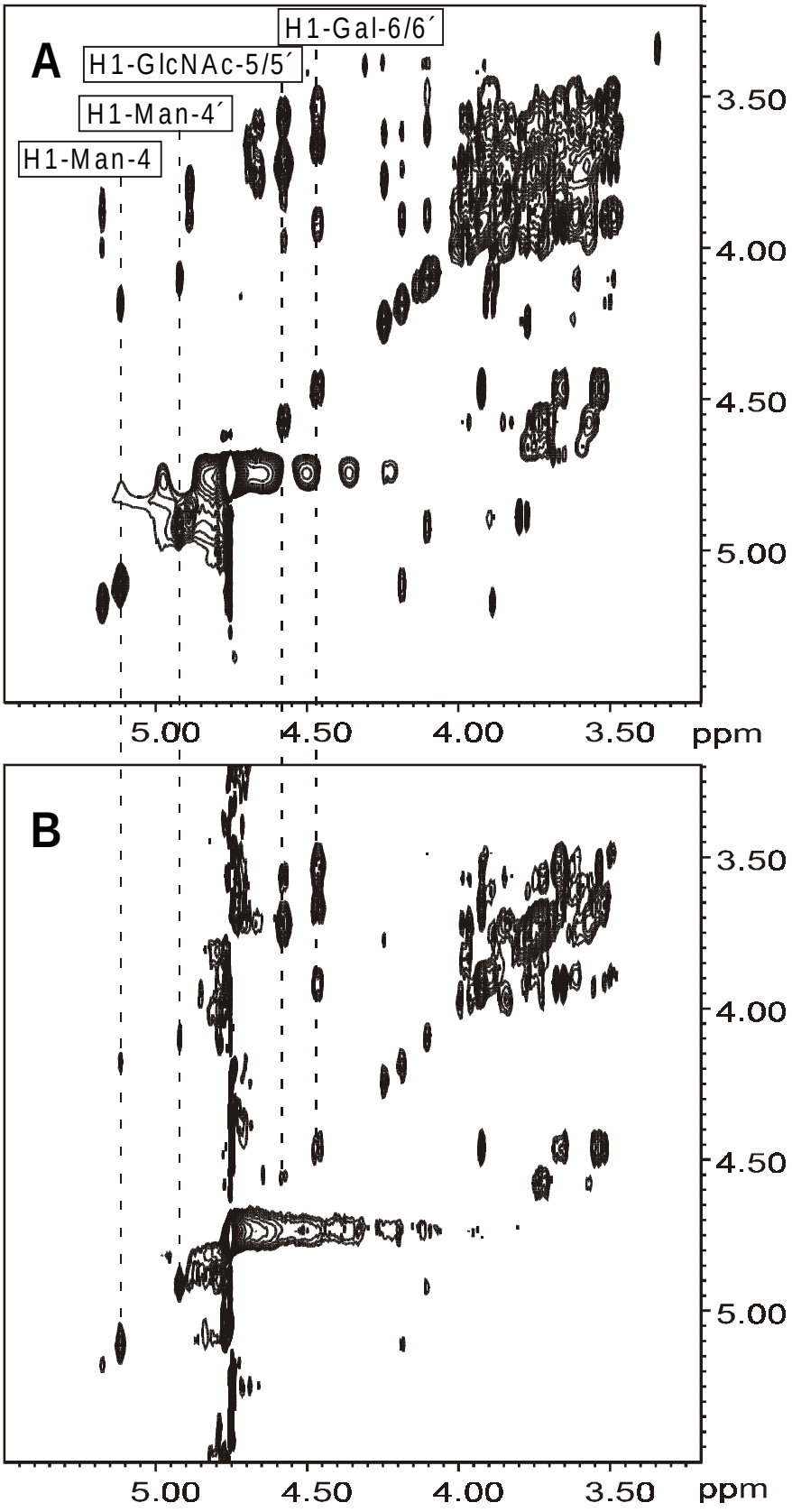

Abbildung 45. A) Referenz-TOCSY-Spektrum, B) STD-TOCSY-Spektrum von 1.2 mM NA_2 in Gegenwart von 10 µM RCA_{120}.

Eine Bestimmung des Bindungsepitops ist folglich auch hier problemlos möglich. Ein deutlicher Vorteil des STD-TOCSY-Spektrums gegenüber dem 1D STD-NMR-Spektrum ist die vereinfachte Identifizierung der bindenden Komponente. Beispielsweise lassen sich aus der chemischen Verschiebung der dispergierten anomeren Protonen und der anschliessenden Identifizierung des Spinsystems schnell die Saccharid-Reste bestimmen, die am meisten zur Affinität beitragen.

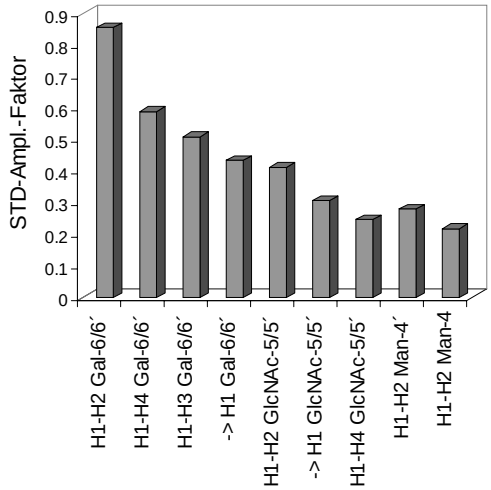

Abbildung 46. STD-Amplifikations-Faktoren aus dem STD-TOCSY-Spektrum in Abbildung 45 B) bestimmt. Auch hier kann deutlich der Intensitätsabfall von den stark bindenden Galactose-6/6'-Resten auf die benachbarten GlcNAc- und Mannose-Reste beobachtet werden. Die mit dem Pfeil markierten Signale entsprechen Diagonalpeaks.

STD-Titrationsexperimente

Das Titrationsexperiment erfolgte durch Zugabe einer konzentrierten NA_2-Lösung zu einer Probe von RCA_{120}. Abbildung 47 zeigt den Anstieg des STD-Amplifikations-Faktors der H4-Gal-6/6´-Protonen bei Erhöhung der NA_2-Konzentration. Die Titration erfolgte nur bis zu einer Konzentration von 1.2 mM, da sich schon bei dieser Konzentration der STD-Amplifikations-Faktor nur noch sehr wenig erhöhte. Dies ist erneut ein Beleg für die verminderte Austausch-geschwindigkeit stark bindender Moleküle. Ein weiterer Hinweis sind die deutlich geringeren maximalen STD-Amplifikations-Faktoren. Die H4-Gal-6/6´-Protonen bei NA_2 erreichen nur einen Wert von etwa 3, während das entsprechende H4-Proton von α-GalOMe bei gleicher Konzentration von 1.2 mM einen Wert von über 8 aufweist.

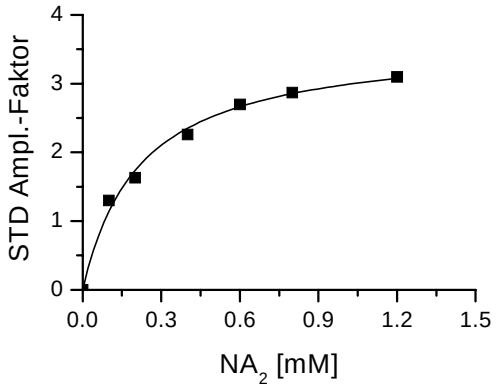

Abbildung 47. Titration von NA_2 zu einer Probe von RCA_{120} (20 µM Bindungsstellen).

STD-Kompetitionsexperimente

1D STD-NMR-Spektren: Ein Kompetitionsexperiment soll darüber Aufschluss geben, wie die Titration eines schwachen Inhibitors gegenüber eines vorgelegten starken Liganden verläuft. Die Titration von β-GalOMe gegen NA_2 (Abbildung 48) zeigt, dass aufgrund der Zugabe von β-GalOMe die STD-Intensität von NA_2 zwar abnimmt, jedoch nicht in dem Maße, wie für α-GalOMe beobachtet (siehe Seite 88). Auf der anderen Seite steigt der STD-Amplifikations-Faktor der Resonanz des H1-Protons von β-GalOMe stärker an als die Intensität des Signals des H1-Protons von NA_2 abnimmt. Das heisst, obwohl das Decasaccharid eine höhere Affinität hat, besitzt es im Kompetitionsexperiment schon bei niedrigen β-GalOMe Konzentrationen die kleineren STD-Amplifikations-Faktoren. Der Grund für den schnellen Anstieg der STD-Intensität von β-GalOMe ist seine um den Faktor drei höhere Sättigungseffizienz gegenüber NA_2. Mit anderen Worten bedeutet ein hoher STD-Amplifikations-Faktor bei Substanzmischungen nicht automatisch, dass die Substanz mit dem grossen STD-Signal auch der bessere Binder ist. Diese Unterscheidung gilt nur innerhalb eines Liganden. Hier entspricht das grössere STD-Signal wirklich derjenigen Region, die den grössten Kontakt zur Proteinoberfläche besitzt.

Durch die beobachtbare Verdrängung eindeutig bewiesen ist hingegen, dass beide Substanzen mit der gleichen Bindungsstelle interagieren. Zudem ist der Verlauf der STD-Amplifikations-Kurve von β-GalOMe in Anwesenheit von NA_2

wieder deutlich langsamer, auch ein Merkmal für Kompetition (vergleiche mit Seite 88).

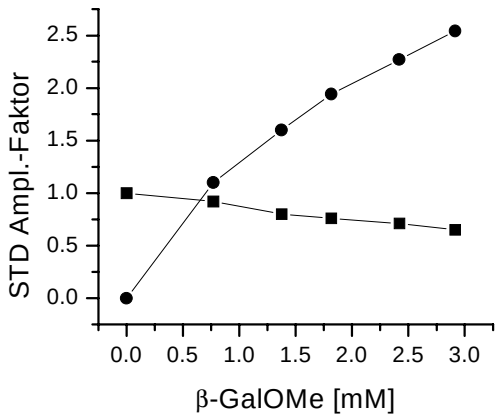

Abbildung 48. Das Diagramm zeigt die STD-Amplifikations-Faktoren (Quadrate, H1-Gal-6/6´; Kreise, H1-β-GalOMe) ermittelt aus den STD-NMR-Spektren bei Titration von β-GalOMe zu einer Probe von RCA_{120} (20 μM) und NA_2 (0.55 mM). Die Signalintensität des H1-Protons von NA_2 nimmt mit zunehmender Konzentration von β-GalOMe von 1 auf 0.66 ab, während der STD-Amplifikations-Faktor des H1-Protons von β-GalOMe kontinuierlich zunehmen. Dieser Plot beweist die Kompetition der beiden Liganden um die selbe Bindungsstelle.

Analog zu dem Kompetitionsexperiment zwischen den Liganden mit niedriger Affinität (siehe Abschitt 4.4.3), wurden auch in diesem Fall die erhaltenen Daten an die Kompetitions-Funktion um eine Bindungsstelle angepasst. Die vorgelegte Konzentration an NA_2 lag bei diesem Experiment bei 0.55 mM. In Abbildung 49 ist der Kurvenverlauf wiedergegeben. In diesem Fall waren nicht genügend Datenpunkte bei hohen Konzentrationen an β-GalOMe vorhanden, daher wurde nur eine maximale Reduzierung des STD-Amplifikations-Faktors des H4 Signals von NA_2 um 36% erreicht. Dennoch konnte bei Festsetzung der $STD\text{-}AF_{max}$ und $STD\text{-}AF_{min}$ – also der Anfangs- und Endpunkte der Titration ein χ^2 von 0.998 erlangt werden. Der so ermittelte K_D-Wert von NA_2 liegt bei 2.6×10^{-5} M. Auch die Kompetitionsexperimente weisen somit darauf hin, dass es sich bei NA_2 nicht um einen nanomolaren Binder handelt. Diese Daten sprechen auch gegen das Vorhandensein von mehreren Monosaccharid Bindungsstellen innerhalb einer Bindungstasche. Die Verbesserung der Affinität von NA_2 gegenüber LacNAc ist am

ehesten mit einer Erhöhung der Bindungs-Wahrscheinlichkeit zu erklären. Sobald eine der beiden Antennen von der Bindungsstelle abdissoziiert ist, kann die zweite Galactose auf der anderen Antenne erneut eine Bindung eingehen.

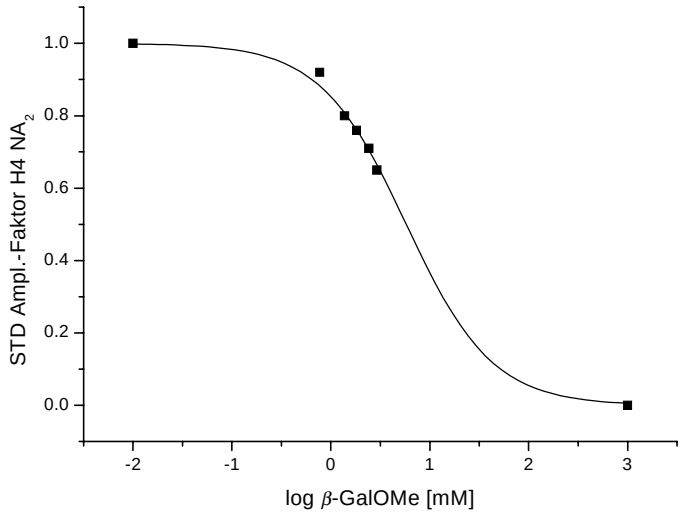

Abbildung 49. Logarithmische Auftragung der β-GalOMe Konzentration gegen den STD-Amplifikations-Faktor des H4 Signals des Gal-6/6´-Restes von NA_2. Die Quadrate zeigen die experimentellen Daten und die durchgezogene Linie die Anpassung an die Gleichung für die Kompetition um eine Bindungsstelle. Der so ermittelte K_D-Wert von NA_2 liegt bei 2.6×10^{-5} M.

2D STD-TOCSY-Spektren: Bei zwei der Titrationspunkte des 1D STD-NMR-Experiments wurden auch STD-TOCSY-Spektren aufgenommen. Es handelt sich somit um die selbe Probe, die auch für die 1D Titrationsstudien eingesetzt wurde. Anhand der Integration der 2D-STD TOCSY Spektren soll gezeigt werden, dass schon einige wenige Kreuzpeaks für die Titrations- oder Kompetitionsexperimente ausreichend sind. Aus Gründen der Zeitersparnis wurden insgesamt nur drei STD-TOCSY-Spektren aufgenommen. Die ersten Datenpunkte wurden aus dem in Abbildung 45 dargestellten STD-TOCSY-Spektrum erhalten, in dem nur NA_2 in Gegenwart von RCA_{120} aufgenommen wurden. Die weiteren zwei STD-TOCSY-Spektren entsprechen dem ersten und letzten Titrationspunkt der 1D Untersuchung, also Konzentrationen von 0.8 und 3 mM β-GalOMe.

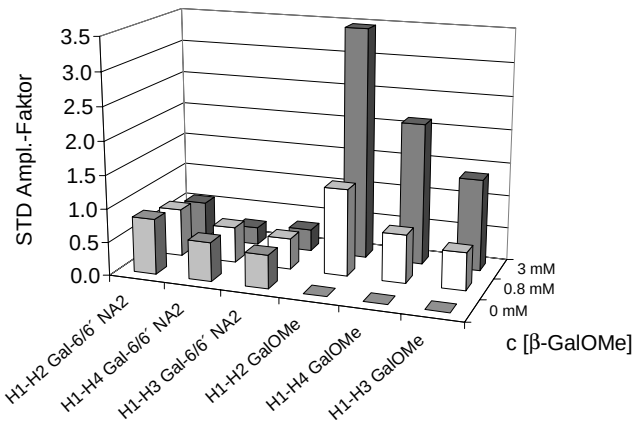

Abbildung 50. Diagramm der STD-Amplifikations-Faktoren, die aus den drei STD-TOCSY-Experimenten erhalten wurden. Gezeigt wird der Intensitätsverlauf von jeweils drei Kreuzpeaks des Decasaccharids und der β-GalOMe bei der Zugabe von β-GalOMe zur NMR-Probe. Wie schon beim 1D STD-NMR-Experiment verkleinern sich die Intensitäten von NA_2, während diejenigen von β-GalOMe deutlich ansteigen.

Die Werte aus den 1D STD- und STD-TOCSY-Experimenten stimmen sehr gut überein. Die STD-Amplifikations-Faktoren aller drei hier exemplarisch gezeigten Kreuzpeaks der terminalen Galactose von NA_2 nehmen um Werte zwischen 30% und 50% ab. Dagegen nehmen die STD-Intensitäten des zugegebenen Monosaccharids wiederum stärker zu, als die Werte von NA_2 abfallen. Die STD-Amplifikations-Faktoren von β-GalOMe verdoppeln sich bei Erhöhung der Konzentration von 0.8 mM auf 3 mM, was ebenfalls im Einklang mit den 1D-Experimenten steht. Es ist folglich möglich, selbst aus einzelnen Kreuzpeaks von 2D STD-NMR-Spektren die nötigen Daten für Kompetitionsexperimente zu bekommen – was besonders bei komplexen Mischungen mit vielen überlagerten Signalen von Vorteil ist.

SPR-Analyse

Die SPR-Analyse des Decasaccharids erfolgte mit den gleichen Einstellungen, die auch bei den anderen SPR-Studien verwendet wurden. Laut Literaturangaben von Shinohara *et al.*, der ebenfalls mittels SPR Dissoziationskonstanten bestimmte, handelt es sich bei NA_2 um ein sehr fest bindendes Molekül mit einer Dissoziationskonstante von 8.4 nM (*122*). In Gegensatz zu der hier verwendeten Immobilisierung des Proteins auf dem Dextran-Chip, immobilisierte er das Oligosaccharid – das Lektin wurde in Lösung vorgelegt. Die RU-Antwort hängt nicht

nur von der Menge an gebundenem Liganden ab, sondern auch von der Masse des Liganden. Da die Masse des Proteins etwa um den Faktor 100 grösser ist, gibt diese Form der Immobilisierung einen Intensitätsgewinn.

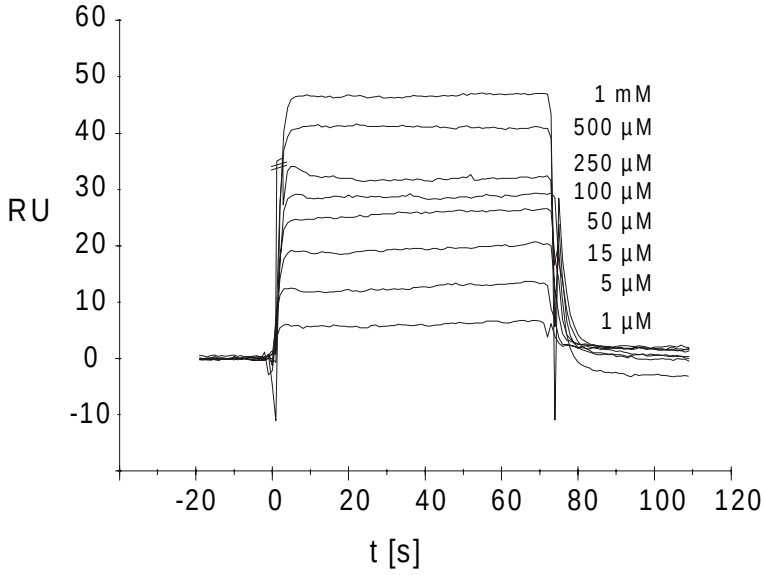

Abbildung 51. SPR-Sensorgramme von NA_2 bei 8 verschiedenen Konzentrationen. Die schnelle Kinetik, sowohl in der Assoziationsphase als auch in der Dissoziationsphase, wird deutlich.

Bei der Interpretation von Daten aus Oligosaccharid-Immobilisierten-Experimenten müssen sogenannte Massentransport-Effekte berücksichtigt werden. Diese rühren unter anderem daher, dass während der Assoziationsphase eine ungenügende Menge an Ligand aus der Diffusionsschicht nachgeliefert wird. Die tatsächlichen Werte können so verfälscht werden. Ebenso muss bei der Dissoziationsphase mit Rückbindungseffekten, besonders bei grossen und somit trägen Molekülen gerechnet werden. Ein weiterer Aspekt ist die Belegungsdichte der Oligosaccharide auf dem Chip, da auch diese hat einen Einfluss auf die gemessenen Werte hat. Bei dem Experiment von Shinohara *et al.*, der die oben genannten Effekte nicht bei der Berechnung seiner K_D-Werte berücksichtigte, kann es also zu Abweichungen gegenüber unseren Daten kommen (*6, 128).*

Die SPR-Sensorgramme bei acht verschiedenen Konzentrationen des NA_2 sind in Abbildung 51 wiedergegeben. Deutlich sichtbar sind der extrem schnelle Anstieg in der Assoziationsphase, wenn von Pufferlösung auf Ligandlösung gewechselt wird. Das anschliessend erreichte Plateau entspricht der Phase, in der kontinuierlich eine gleichbleibende Konzentration an Ligand über den Chip fliesst. Diese Phase war hier 75 s lang. Unmittelbar nach Umschalten von Ligandlösung auf Puffer beginnt

die Dissoziationsphase - eindeutig am starken Abfall der RU-Werte innerhalb weniger Sekunden zurück auf die Basislinie zu erkennen. Aufgrund der sehr schnellen Kinetik konnten weder aus der Assoziations-, noch der Dissoziationsphase die entsprechenden k_{on}- bzw. k_{off}-Werte bestimmt werden.

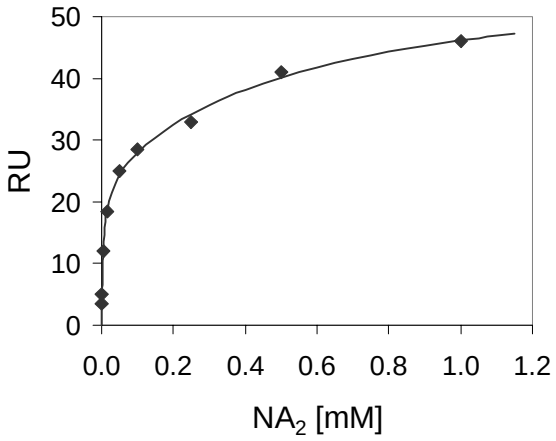

Abbildung 52. Die experimentell bestimmten RU-Werte aus den SPR-Diagrammen bei neun verschiedenen Konzentrationen wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Messwerte sind durch die Rauten dargestellt, die durchgezogene Linie entspricht einem Langmuir-Fit mit zwei unabhängigen Bindungsstellen.

Die Dissoziationskonstante musste daher auch hier aus den *steady-state* Messungen der RU-Antwort bestimmt werden obwohl es der Ligand mit der höchsten Affinität und daher langsamsten Kinetik ist. Es wurde wie bei den anderen Sacchariden ein Fit verwendet, der eine primäre und eine sekundäre Bindungsstelle hat. Die Dissoziationskonstante der Hochaffinitäts-Bindungsstelle liegt bei K_D = 4.84×10^{-6} M und ist somit etwa um den Faktor 500 geringer, als der von Shinohara *et al.* bestimmte Wert. Für die sekundäre Bindungsstelle wurde hier ein Wert von 2.8×10^{-4} M gefunden. Der Wert der mittels SPR bestimmten Hochaffinitäts-Bindungsstelle ist somit etwa um einen Faktor 5 kleiner als der mit STD-Kompetitionsexperimenten bestimmte K_D-Wert von 2.6×10^{-5} M.

KD-Wert [M]	*Methode*
2.60×10^{-5}	STD-NMR-Kompetitionsexperimente
4.84×10^{-6}	SPR-Analyse (RCA_{120} immobilisiert)
8.40×10^{-9}	SPR-Analyse (NA_2 immobilisiert) (*122*)

Tabelle 3. Mit verschiedenen Methoden bestimmte Dissoziationskonstanten des RCA_{120}-NA_2-Komplexes.

Die starke Abweichung unserer Daten zu denen von Shinohara *et al.* sind hauptsächlich durch die unterschiedlichen Immoblisierungs-Verfahren zu erklären. Es sind in den letzten Jahren etliche Publikationen erschienen, die sich diesem Thema angenommen haben (*6, 128*). Die meisten Autoren gehen davon aus, dass eine Immobilisierung des Makromoleküls eher den in einer Lösung vorliegenden Bedingungen entspricht. Unsere mittels NMR-Spektroskopie gewonnenen Daten, die von Sharma *et al.* aus kalorimetrischen Experimenten ermittelten Werte und die hier gezeigten SPR-Studien zeigen eine gute Übereinstimmung. Eine Immobilisierung des Proteins bei SPR-Analysen scheint also den in der NMR-Probe vorliegenden Bedingungen besser zu entsprechen.

4.4.6 Diskussion der STD-NMR Ergebnisse der vier Saccharide

Die STD-NMR-Methode liefert bei allen vier untersuchten Galactose-haltigen Sacchariden in Gegenwart des Lektins RCA_{120} sehr gute Ergebnisse. Die aus den STD-NMR-Spektren erhaltenen Informationen stehen im Einklang mit den bisher publizierten Daten und sind auch in sich überzeugend. Bei allen Sacchariden konnte eine Bestimmung des Bindungsepitops durchgeführt werden. In allen Fällen wurde das nicht-reduzierende Ende der terminalen Galactose als das determinierende Epitop identifiziert. Bei LacNAc und dem Decasaccharid NA_2 wurden zusätzlich zu den starken STD-Signalen der Galactose, höhere Sättigungswerte für die H2-, H3- und H4-Protonen der benachbarten GlcNAc-Einheit gefunden. Diese STD-Intensitäten lagen weitaus höher, als diejenigen anderer Protonen innerhalb des GlcNAc-Restes. Auch die Grösse der STD-Intensitäten, bezogen auf das am stärksten gesättigte Proton H3 der Galactose von etwa 70% sprechen dafür, dass die C2- bis C4-Region des GlcNAc-Restes vom Lektin erkannt wird. Dennoch liegt auch bei diesen Sacchariden der Hauptbeitrag zur Bindungsenergie bei den Galactose-Resten. Weiter zeigen unsere Daten, dass NA_2 unter den NMR-Messbedingungen kein nanomolarer Inhibitor ist. Hierfür sprechen zum einen die STD-Titrations-experimente, die relativ grosse STD-Amplifikations-Faktoren ergaben und zum anderen die Kompetitionsexperimente mit dem schwachen Inhibitor β-GalOMe, die einen K_D-Wert von 2.6×10^{-5} M.

Die Frage, unter welchen Umständen das Bindungsepitop eines Moleküls zweifelsfrei bestimmt werden kann, muss differenziert behandelt werden. Es gibt bei

stark gebundenen, kleinen Substanzen Einschränkungen. Beispielsweise muss ein kleines Molekül, wie ein Monosaccharid, sich in schnellem chemischen Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand befinden. Der intramolekulare Sättigungstransfer verteilt ansonsten die Magnetisierung sehr schnell auf alle Protonen gleichmässig – eine Diskriminierung ist dann nicht mehr möglich.

Bei einem Protein der Grösse von RCA_{120} kann von einer gemittelten Kreuzrelaxationsrate σ_b innerhalb des Makromoleküls von ca. $100 - 500\ s^{-1}$ ausgegangen werden (*74*). Um eine effektive Unterscheidung in bindende und nicht-bindende Gruppen zu ermöglichen, sollte der chemische Austausch folglich innerhalb dieses Bereichs liegen. Wenn diese Einschränkung nicht eingehalten wird, ist eine Bestimmung des Bindungsepitops kleiner Moleküle nicht mehr ohne weiteres möglich. Desweiteren sollte der Überschuss an Ligand möglichst hoch gewählt werden. Wie man der Abbildung 28 auf Seite 74 entnehmen kann, nimmt der Unterschied der STD-Amplifikations-Faktoren mit steigender Konzentration zu. Bei hohen Überschüssen ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein vollständig ungesättigter Ligand in die Bindungstasche gelangt grösser. Somit ist auch die Wahrscheinlichkeit höher, dass Liganden nur einmal in die Bindungstasche gelangen und die Magnetisierung nur auf diejenigen Gruppen transferiert wird, die der Proteinoberfläche am nächsten liegen. Bei grösseren Liganden wie dem Decasaccharid, bei denen nur ein kleiner Teil bindet, steht ein grosser Bereich des Liganden in keinem Kontakt zum Protein. Der Sättigungstransfer findet dann, je nach Entfernung von dem bindenden Epitop, nur langsam oder gar nicht statt.

Die STD-Titrationsexperimente bestätigten, dass es möglich ist, einen grossen Überschuss an Liganden zu sättigen, wenn diese hohe Wechselzahlen besitzen. Die Einführung des STD-Amplifikations-Faktors erlaubt es die Titrationen der vier Saccharide auch bei verschiedenen Proteinkonzentrationen zu vergleichen. Über den Verlauf der STD-Amplifikations-Faktoren können den Liganden dann auch relative Bindungsstärken zugewiesen werden. Schwache Inhibitoren haben grosse STD-Effekte, die jedoch erst bei hohen Ligandenkonzentrationen auftreten. Starke Inhibitoren hingegen haben nur kleine STD-Effekte und selbst hohe Überschüsse bringen wegen der reduzierten Austauschkinetik keine Verbesserung der STD-Signalintensität.

Die Kompetitionsexperimente wurden je einmal mit zwei in etwa gleich schwachen Inhibitoren (α-GalOMe und β-GalOMe) und einmal mit zwei

unterschiedlich starken Liganden (β-GalOMe und NA_2) durchgeführt. Bei der ersten Titration sank erwartungsgemäss die STD-Intensität von α-GalOMe etwa genauso stark wie die Intensität von β-GalOMe zunahm. Aus dem so erhaltenen IC_{50}-Wert wurde der K_D-Wert ermittelt, der in guter Übereinstimmung zu den Literaturwerten stand. Dies ist immer dann möglich, wenn der K_D-Wert einer der beiden Inhibitoren bekannt ist. Zusätzlich zu dem Beweis, dass Kompetition um die gleiche Bindungsdomäne besteht, können aus diesen Experimenten also auch K_D-Werte bestimmt werden. Das zweite Experiment verdeutlichte ebenfalls Kompetition, jedoch war die Abnahme der STD-Intensität hier viel geringer, als die Zunahme der β-GalOMe-Signale. Dies ist über die unterschiedliche Effizienz der Sättigung zu erklären. β-GalOMe erreicht deutlich höhere STD-Amplifikations-Faktoren und der direkte Vergleich der Intensitäten aus einem Spektrum sagt somit nichts über die Affinitäten der Substanzen aus. Auch hier konnte über den IC_{50} der K_D-Wert bestimmt werden. Dieser zeigte mit 2.6×10^{-5} M eine akzeptable Übereinstimmung zu dem Wert, der über SPR-Messungen für die Hochaffinitäts-Bindungsstelle ermittelt wurde (4.84×10^{-6} M).

Die Sättigungszeitexperimente zeigten bei schwachen Inhibitoren abhängig von der Konzentration des Liganden grosse Differenzen der STD-Intensität. So waren die Differenzen in den STD-Signalen bei kleinen Konzentrationen deutlich weniger ausgeprägt als bei hohen Konzentrationen. Um das Bindungsepitop besser bestimmen zu können ist es also vorteilhaft, mit grossen Überschüssen zu arbeiten. Diese Experimente zeigten auch, dass bei hohen Überschüssen die Sättigungszeit verlängert werden muss, wenn man den maximalen STD-Sättigungsgrad erreichen will.

4.5 STD-NMR im Vergleich zu anderen NMR-Bindungsstudien

Die hier beschriebenen Versuche legen die Vielseitigkeit der mittels STD-NMR-Spektroskopie erhaltbaren Daten dar. Anhand der gut untersuchten Lektin-Saccharid Modellsysteme gelang es, die Vorteile und Nachteile der STD-NMR-Spektren aufzuzeigen.

Ein entscheidender Vorteil ist, dass die Methode auch mit nicht isotopenmarkierten Molekülen sehr gut funktioniert. Eine Isotopenmarkierung von Ligand oder Rezeptor entfällt somit, wodurch beispielsweise die Analyse von

Naturextrakten ermöglicht wird. Die Verwendung der STD-NMR-Spektren zum Screening ist von besonderem Interesse, da es sich um 1D Experimente handelt, die weniger Akquisitions- und Interpretationszeit benötigen, als etwa die bei SAR by NMR benötigten 2D HSQC-Spektren. Ein Nachteil von STD-NMR-Spektren gegenüber SAR by NMR hingegen ist, dass keine Möglichkeit besteht, Informationen über die Bindungstasche des Liganden zu erhalten.

Weiterhin haben STD-NMR-Spektren ein hohes Potential zur Automation. Sobald die geeignete On-Resonance Frequenz sowie die für das analysierte System optimalen Liganden- und Proteinkonzentrationen bestimmt sind, können diese Werte in der Automation übernommen werden. So liessen sich mittels eines Pipettierroboters mehrere hundert Substanzen täglich auf ihre Bindungsaffinität untersuchen. Der erprobte Bereich der Dissoziationskonstanten, in dem die STD-NMR-Methode sehr gute Ergebnisse liefert, liegt zwischen 10^{-7} und 10^{-3} M. Diese Methode hat für die frühen Screening-Phasen, in denen eher schwache Inhibitoren vermutet werden, somit die idealen Voraussetzungen. Liganden mit höherer Affinität – einhergehend mit niedrigen Dissoziationsraten – liefern kleinere STD-NMR-Signale und sind daher schwerer zu entdecken. Im ungünstigsten Fall könnten sie sogar übersehen werden. Andererseits werden über das Differenzverfahren auch sehr kleine Effekte sichtbar gemacht, was den Einsatz über einen grossen Affinitätsbereich begünstigt. Prinzipiell ist es daher auch möglich, hochaffine Liganden zu identifizieren, wenn die nötige Proteinmenge aufgebracht werden kann und relativ lange Akquisitionszeiten in Kauf genommen werden.

Die gute Empfindlichkeit der Methode – auch bei geringen Mengen an Protein – ermöglicht die Untersuchung von schwer isolierbaren oder exprimierbaren Proteinen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass schon 1 nmol (2 μM bei 500 μL) eines Proteins ausreichend ist, um innerhalb von etwa einer Stunde gute STD-NMR-Spektren aufzunehmen. Laut Daten von L. Mueller hat STD-NMR einen Empfindlichkeitsvorteil von Faktor vier im Vergleich zu der ebenfalls zum Screening eingesetzten reversed NOE-*pumping* Methode (*129*). Bei kleinen, hoch hydratisierten Proteinen oder DNA-Fragmenten, soll das WATERlogsy-Experiment einen Empfindlichkeitsvorteil gegenüber STD-NMR-Spektren haben. Das WATERlogsy-Experiment leidet aber daran, dass besonders bei überlappenden Signalen von bindenden und nicht-bindenden Molekülen, es zu einer Auslöschung kommen kann und zudem, wie bei Transfer-NOE-Untersuchungen, ein bestimmter Liganden-

überschuss eingehalten werden muss. Zum Screening von grösseren Mischungen mit unbekannten Ligandenkonzentrationen sind diese Verfahren daher kaum geeignet. Dagegen konnte hier gezeigt werden, dass mit STD-NMR-Spektren problemlos Mischungen mit mehr als 15 Komponenten untersucht werden können. In einer anderen Arbeit aus diesem Arbeitskreis konnte O. Schuster aus einer Mischung von ca. 200 Substanzen zwei Verbindungen mit hoher Affinität gegenüber E-Selektin identifizieren *(92)*.

Ein anderer gelungener Ansatz der STD-Screening-Methode wurde von Vogtherr und Peters vorgestellt. Sie verwendeten sowohl 1D STD-NMR-Spektren als auch 2D STD-TOCSY- und STD-HMQC-Spektren, um aus einer Mischung von 20 nach dem Zufallsprinzip mit ^{13}C-markierten Methyliodid methylierten Monosacchariden, diejenigen mit der höchsten Bindungsaffinität zu identifizieren *(*130*)*. Die Besonderheit hierbei war, dass sich die Substanzen nicht in ihrer Molmasse und nur wenig in ihren physikochemischen Eigenschaften unterschieden – eine Trennung des Gemisches wäre daher äusserst aufwendig gewesen.

Da die Einhaltung eines definierten Ligandenüberschusses nicht nötig ist, können auch Substanzmischungen mit unbekanntem Mischungsverhältnissen untersucht werden. Limitiert ist die STD-NMR-Methode prinzipiell folglich nur durch die Genauigkeit der Differenzbildung. Mit den heute üblichen Geräten liegt diese in einem Bereich von unter 0.1% – dies ist ausreichend, um auch sehr kleine STD-Effekte sichtbar zu machen.

Eine Erweiterung der STD-NMR-Methode in Richtung 2D Spektren, wie die hier gezeigten STD-TOCSY und STD-HSQC Spektren, ist dann interessant, wenn komplexe Liganden bzw. Mischungen vorliegen. So lassen sich anhand der Spinsysteme, die über die TOCSY-Spektren zugänglich sind, viele Substanzen direkt aus der Mischung aufklären. Über die STD-HSQC-Spektren besteht sogar die Möglichkeit, auch die auf der Protonenskala überlagerten Signale über ihre ^{13}C-chemischen Verschiebungen zu identifizieren.

4.6 Folgen für die Entwicklung neuer Inhibitoren

STD-NMR-Spektren liefern einen wertvollen Beitrag zur Entdeckung und Optimierung neuer, biologisch aktiver Substanzen. Einer der entscheidenden Vorteile dieser Methode ist, dass zusätzlich zur Information über Bindungsaktivität die Möglichkeit besteht, Daten über die bindenden Epitope des Liganden zu

gewinnen. Dies hat besonders für eine Optimierung eines Hits weitreichende Konsequenzen. Zum einen können gezielt solche Bereiche des Liganden modifiziert oder entfernt werden, die nur wenig oder keinen Beitrag zur Affinität liefern. Hier bietet sich auch eine Kombination mit der zuvor beschriebenen SAR by NMR Methode an. Die Verknüpfung zweier Liganden wäre dann gezielt über solche Gruppen möglich, die für die Bindung zum Rezeptor unwichtig sind. Eine negative Beeinflussung der Bindungsaffinität des verknüpften Liganden aufgrund der Störung der optimalen Bindungsgeometrie kann so vermieden werden. Auch eine Kombination mit den Informationen, die aus den Transfer-NOE-Experimenten erhalten werden kann, ist interessant. So liesse sich nicht nur die bioaktive Konformation des Liganden bestimmen, sondern auch seine Positionierung relativ zum Rezeptor.

Weiter können die Ergebnisse aus der Bestimmung des Bindungsepitops dazu dienen, in die Bereiche, die nicht eminent an der Bindung beteiligt sind, Gruppen einzuführen, die zwar keinen Kontakt zum Protein besitzen, über die jedoch die Bioverfügbarkeit auf einen Rezeptor abgestimmt werden kann. Dies wiederum kann einen entscheidenden Beitrag zur Reduzierung von Nebenwirkungen leisten. Auf der anderen Seite werden mir minimalen Aufwand diejenigen Positionen bestimmt werden, die einen hohen Beitrag zur Affinität liefern und daher beibehalten werden sollten. Die STD-NMR-Spektroskopie ist daher eine ausgezeichnete Methode für die gezielte Entwicklung von Substanzen mit einer hohen Bindungsaffinität zur Bindungstasche und den richtigen pharmakokinetischen Eigenschaften.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine neue und leistungsfähige Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen mit NMR-Spektroskopie entwickelt.

Die Differenz zwischen einem normalen NMR-Spektrum und einem Spektrum, das mit einer selektiven Sättigung des Rezeptors aufgenommen wurde, liefert ein Sättigungstransfer-Differenz (STD)-NMR-Spektrum. Diese 1D oder 2D STD-NMR-Spektren enthalten nur NMR-Signale von Molekülen, die während der Sättigungsdauer Kontakt zum Rezeptor hatten. Somit sind diese Spektren sehr gut zur Aufklärung von Bindungsprozessen geeignet. Alle Signale nicht-bindender Moleküle werden über die Differenzbildung ausgelöscht, daher können selbst aus Substanzmischungen eindeutig diejenigen Moleküle identifiziert werden, die an den Rezeptor binden.

Zunächst wurden 1D und 2D STD-NMR-Experimente zum Screening eingesetzt. Die erhaltenen Spektren lieferten den Nachweis, dass in einer Mischung aus dem Lektin *Wheat germ* Agglutinin (WGA) und sieben Sacchariden einzig das in der Probe enthaltene *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) ein Ligand für den Rezeptor ist. Selbst in den Bereichen, die im normalen NMR-Spektrum der Mischung überlagert waren, lassen sich im STD-NMR-Spektrum nur die Ligandensignale beobachten. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber den üblichen Screening-Verfahren, die keinerlei Möglichkeit zur direkten Identifizierung von Substanzen aus Mischungen haben. Die Erweiterung dieser Methode auf 2D Experimente wurde anhand eines 2D STD-TOCSY-Spektrums demonstriert. Auch in dem 2D Spektrum wurden nur Signale des bindenden Saccharids *N*-Acetyl-D-glucosamin beobachtet. Diese 2D STD-NMR-Experimente führen bei komplexen Mischungen bzw. Liganden zu einer deutlichen Vereinfachung der Auswertung.

Bei der Untersuchung einer weiteren Mischung aus 16 Sacchariden in Gegenwart des Lektins *Aleuria aurantia* Agglutinin, lieferte auch hier ausschliesslich die bindende Komponente Methyl-α-L-fucosid STD-Signale. Mit dieser Probe wurde zusätzlich zu dem 2D STD-TOCSY-Experiment ein 2D STD-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Erweiterung der Methode auf heteronukleare NMR-Experimente ermöglicht die Identifizierung von Substanzen, die auf der Protonenskala stark überlagert sind. Anhand von drei in der ^{1}H-Dimension überlagerten Signalen der

Fucose wurde demonstriert, dass die Signale über ihre ^{13}C-chemischen Verschiebungen in der zweiten Dimension eindeutig identifiziert werden konnten.

Weiter wurde gezeigt, dass gegenüber den üblichen NMR-Screening-Methoden die benötigte Proteinmenge deutlich reduziert werden kann. 1 nmol (18 μg) des Lektins WGA reichten aus, um innerhalb von einer Stunde auf einem 500 MHz NMR-Spektrometer ein STD-NMR-Spektrum des bindenden Liganden *N*-Acetyl-D-glucosamin aufzunehmen. Durch den Einsatz der neuen Cryo-Probenköpfe oder der sogenannten Nano-Probenköpfe wird die benötigte Menge an Rezeptor und Ligand weiter um mindestens eine Potenz reduzierbar sein.

Die maximale Bibliotheksgrösse, die über die STD-NMR-Spektren analysiert werden kann, hängt hauptsächlich von der Anzahl und der Konzentration der in der Mischung enthaltenen bindungsaktiven Substanzen ab. Der Bereich an Dissoziationskonstanten, der mit STD-NMR-Spektren effizient untersuchbar ist, liegt mindestens zwischen 10^{-3} und 10^{-7} M. Dieses Verfahren ist daher besonders in den frühen Screening Phasen einzusetzen. Auch lagen die in dieser Arbeit analysierten Liganden, mit einem Molekulargewicht zwischen 200 – 1800 Da, exakt in dem Bereich, der für potentielle Wirkstoffe anvisiert wird.

Vier Galactose-haltige Saccharide wurden in Gegenwart des Lektins *Ricinus communis* Agglutinin (RCA_{120}) untersucht. Im STD-NMR-Spektrum haben Ligandensignale von Protonen, die nahe an der Oberfläche des Rezeptors liegen, verglichen mit Protonen, die weiter entfernt sind, eine höhere Intensität. Die STD-NMR-Spektren zeigten, dass die Spezifität von RCA_{120} eindeutig dem nicht-reduzierenden Ende der Monosaccharide Methyl-α-D-galactosid (α-GalOMe) und Methyl-β-D-galactosid (β-GalOMe) gilt. Die H2-, H3- und H4-Protonen wurden am stärksten gesättigt während die STD-Signale des anomeren Protons und der *O*-Methylgruppe nur kleine STD-Signale erreichten. Somit ist es möglich, selbst innerhalb eines kleinen Liganden diejenigen Regionen zu bestimmen, die massgeblich an der Bindung zum Rezeptor beteiligt sind. Die anderen beiden untersuchten Saccharide, *N*-Acetyl-lactosamin (LacNAc) und das biantennäre Komplex-Typ-Decasaccharid (NA_2), haben eine höhere Affinität zu RCA_{120} als die beiden Monosaccharide. Auch hier wurden die terminalen Galactosen am stärksten gesättigt. Weiter wurde gezeigt, dass die Protonen H2, H3 und H4 des benachbarten GlcNAc-Restes STD-Signale von ca. 60 - 70% relativ zu den STD-Signalen des am stärksten gesättigten H3-Protons der

Galactose aufwiesen. Diese Region von LacNAc und NA_2 hat somit direkten Kontakt zum Lektin.

Eine Klassifizierung der Liganden gemäss ihrer Affinität ist mittels STD-NMR-Titrationsexperimenten gut durchführbar. Die Grösse und der Verlauf der STD-Titrationskurve zeigte eine sehr gute qualitative Übereinstimmung mit den ebenfalls an diesen Sacchariden durchgeführten *surface plasmon resonance* (SPR)-Untersuchungen. Sowohl SPR- als auch STD-NMR-Analysen zeigten, dass die Affinität des Lektins RCA_{120} gegenüber den Liganden in der Reihe α-GalOMe < β-GalOMe < LacNAc < NA_2 steigt. Schwach bindende Liganden erreichten dabei aufgrund ihrer höheren Austauschkinetik – und somit besseren Sättigungseffizienz – grosse absolute STD-Signale. Die verminderte Austauschkinetik bei starken Bindern hingegen bewirkt, dass die STD-Signale kleiner sind, wodurch auch die Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments sinkt. Weiter wurde gezeigt, dass ein hoher Überschuss an Ligand die Analyse der STD-NMR-Spektren erleichtert, da die Unterschiede zwischen den stark und schwach bindenden Regionen mit der Erhöhung des Überschusses zunehmen. Da bei hohen Überschüssen die absoluten STD-Signale grösser werden, ist auch aus diesem Grund ein hoher Ligandenüberschuss vorteilhaft.

Über STD-NMR-Kompetitionsexperimente konnte bewiesen werden, dass die Bindung des Lektins an Galactose-haltige Saccharide spezifisch ist, da sie sich gegenseitig aus der Bindungstasche verdrängten. Bei bekanntem K_D-Wert eines der beiden Binder, lässt sich aus den Kompetitionsexperimenten der K_I-Wert des anderen bestimmen. Abweichend zu Literaturwerten, zeigten die aus den STD-NMR-Experimenten erhaltenen Daten, dass NA_2 in Lösung kein im Nanomolaren Bereich bindender Ligand ist, sondern einen K_D-Wert von 2.6×10^{-5} M hat, was in Einklang zu den SPR-Daten steht.

STD-NMR-Spektren bieten somit auch in der Optimierungsphase der Leitstruktur ein effizientes Hilfsmittel. Mit ihnen lässt sich, wie von mir anhand der RCA_{120}-Saccharid-Komplexe gezeigt, schnell und auf atomarer Ebene das Bindungsepitop von Liganden bestimmen. Ferner können mit Titrations- und Kompetitionsexperimenten die Affinität und Spezifität der Liganden charakterisiert werden. Diese Informationen sind für eine gerichtete Optimierung von Leitstrukturen von grosser Bedeutung.

6 Summary

A new and efficient method for identification and characterization of ligand-receptor-interactions by NMR-spectroscopy was developed in this work.

The difference of a normal NMR spectrum and a NMR spectrum which was recorded with selective saturation of the receptor, yields a saturation transfer difference (STD) NMR spectrum. These 1D and 2D STD NMR experiments contain only NMR signals of molecules which had contact to the receptor during the saturation period. Therefore these spectra are particularly suited to detect binding processes. All signals of non-binding molecules are subtracted in the difference NMR spectra. This allows for an unambiguous identification of molecules binding to the receptor even from compound mixtures.

1D and 2D STD NMR spectra were used for screening of substance libraries. The obtained STD NMR spectra proved, that of the seven saccharides contained in the sample, only *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) binds to the lectin *wheat germ* agglutinin. Even in the regions of the normal 1D NMR spectra which are convoluted, the STD NMR spectra showed exclusively signals of the binding molecule. This is a clear advantage in comparison to the normally used screening methods, which have no means to directly identify the binding compound from a library. The extension of this method to 2D NMR spectra was demonstrated by the acquisition of a 2D STD TOCSY spectrum. This 2D STD NMR spectrum also contained only resonances originating from the binding saccharide *N*-acetylglucosamine. This additional option of acquiring 2D STD NM R spectra is especially useful for analyzing complex mixtures or ligands.

The analysis of another mixture of 16 saccharides in presence of the lectin *Aleuria aurantia* agglutinin revealed, that also in this case only the binding component of the mixture methyl-α-L-fucoside yields STD signals. With this sample, in addition to the 2D STD TOCSY spectrum, we also recorded a 2D STD HSQC spectrum. The application of this method to heteronuclear NMR experiments enables the identification of substances which have overlapping signals in the ^{1}H-dimension. As an example, three protons of the fucose which could not be unambiguously identified in the homonuclear STD spectra, were analyzed by their ^{13}C chemical shifts in the second dimension.

I could further show that compared to other NMR-based screening techniques the amount of receptor needed can be considerably reduced. Only 1 nmol (18 µg) of the lectin WGA were sufficient to record a 1D STD NMR spectrum of the binding ligand *N*-acetylglucosamine within 1 hour on a 500 MHz NMR spectrometer. The implementation of the new cryo-probeheads or the so called nano-probeheads will lead to a further reduction of the amount of receptor and ligand needed by an additional order of magnitude.

The size of the compound library which can be analyzed by STD NMR spectra, is primarily dependent on the number of binding ligands and their concentration in the NMR sample. The range of dissociation constants which can be efficiently studied by STD NMR spectra is at least between 10^{-3} and 10^{-7} M. This method can therefore be effectively applied to the early screening phases, where low affinity ligands are frequent. Also, the molecular weights of the ligands studied in this work range from 200 – 1800 Da. This is exactly the regime which is sought after in potential lead substances and drug candidates.

Four galactose containing saccharides were studied in presence of the lectin *Ricinus communis* agglutinin (RCA_{120}). In STD NMR spectra the ligand resonances of protons which are in close contact to the receptor have a higher STD signal intensity compared to the STD signals of protons which are at a larger distance. The STD NMR spectra showed, that the specificity of RCA_{120} is directed towards the non-reducing end of the monosaccharides methyl-α-D-galactoside (α-GalOMe) and methyl-β-D-galactoside (β-GalOMe). The NMR signals of the H2, H3 and H4 protons were saturated to the highest degree in the STD NMR spectra, whereas those of the anomeric proton and the *O*-methyl group had the smallest STD signals. Therefore it is possible to determine the regions which are crucial for the binding interactions even within a small ligand. The other two studied ligands, *N*-acetyllactosamine (LacNAc) and the biantennary complex-type decasaccharide (NA_2), have a higher affinity towards RCA_{120} than the two monosaccharides. As with the monosaccharides, the studies showed, that the signals corresponding to the terminal galactoses are saturated to the highest degree. In addition, the H2, H3 and H4 protons of the adjacent GlcNAc residue had STD intensities of ca. 60 – 70% of the value reached by the H3 proton of the galactose – the proton with the highest degree of saturation. Therefore this region of LacNac and NA_2 also has direct contact to the lectin.

STD NMR titration experiments allowed a ranking of the ligands according to their binding affinity. The size and progression of the STD titration curves showed a very good qualitative agreement to the surface plasmon resonance (SPR) experiments which were also conducted with these saccharides. Both, the SPR, and the STD NMR experiments revealed that the affinity of the lectin RCA_{120} increases in the following order: α-GalOMe < β-GalOMe < LacNAc < NA_2. Weakly binding ligands reach higher absolute STD signal intensities due to their higher turnover number, which results in a better saturation efficiency. The reduced exchange kinetics of the higher affinity ligands yields smaller STD signals which also decreases the sensitivity of the STD NMR experiment. It was also shown, that a high ligand excess results in more pronounced differences in the STD intensities of strongly and weakly interacting regions of the ligand, leading to an easier interpretation of these spectra. Since the absolute STD signal intensity also increases with the ligand excess, these conditions are of advantage for recording STD NMR spectra.

By conducting STD NMR competition experiments I could prove that binding of the galactose-containing saccharides to RCA_{120} is specific, since they displace one another from the binding site. If the K_D value of one of the ligands is known, the K_I value of the other ligand can be determined from the competition experiments. Diverging from the literature data, the STD NMR experiments showed, that NA_2 is not a ligand with nanomolar affinity in solution, but rather has a K_D value of 2.6×10^{-5} M, which is in agreement to the SPR data.

Therefore STD NMR spectra provide a valuable tool in the optimization phase of a potential lead structure. The binding epitope of a ligand can be determined at an atom level, as was shown for the RCA_{120}-saccharide-complex. Moreover, the use of STD NMR titration and competition experiments yields the affinity and specificity of the ligand. This information is very important for a directed optimization of lead structures.

7 Experimenteller Teil

7.1 Vorbereitung der Proteinproben

Die Lektine *Ricinus communis* Agglutinin (RCA_{120}), *Aleuria aurantia* Agglutinin (AAA) und Weizenkeim Agglutinin (*Wheat germ* Agglutinin, WGA) wurden von der Firma Vector Laboratories bezogen. RCA_{120} wurde in gelöstem Zustand geliefert (Konzentration: 10 mg / mL), während die anderen beiden Lektine in fester Form geliefert wurden.

RCA_{120} hat eine Molmasse von 120 kDa und besteht aus vier Untereinheiten. Es ist ein As-sB Heterodimer. Es wurde mit einer Bindungsstelle je Monomer gerechnet, obwohl die SPR-Untersuchungen Hinweise auf eine weitere niedrigaffine Bindungsstelle lieferten. Da jedoch unklar war, ob es sich um eine spezifische Bindungsstelle handelt, wurde nur mit der hochaffinen Bindungsstelle gerechnet Die Umpufferung in einen D_2O-Phosphatpuffer wurde über eine Centricon Ultrafiltrations-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa durchgeführt. Ein Teil der gelieferten Lösung wurde abgenommen (0.5 - 1 mL) und zwischen 3 und 5 mal gegen den D_2O-Phosphatpuffer ausgetauscht. Zentrifugation erfolgte bei 4°C bis 8°C und 5000 g in einer Heraeus-Kühlzentrifuge, die mit einem Starrwinkel-Einsatz ausgestattet war.

AAA wurde ohne weiteres Lyophilisieren in D_2O-Probenpuffer aufgenommen und vermessen. Für die Konzentrationsberechnungen wurde eine Molmasse von 36 kDa pro Monomer für das dimere Lektin angenommen. Es wurde mit einer Bindungsstelle pro Monomer gerechnet. Es gibt jedoch abweichende Angaben über die Anzahl der Bindungsstellen sowie dem Molekulargewicht des dimeren Lektins (*131*).

WGA wurde wie auch das AAA direkt im NMR-D_2O-Probenpuffer aufgenommen und direkt vermessen. Für die Konzentrationsberechnungen wurde eine Molmasse von 18 kDa pro Monomer für das dimere Lektin angenommen. Es wurde mit einer Bindungsstelle pro Monomer gerechnet. Es gibt auch hier über die Anzahl der Bindungsstellen pro Monomer abweichende Literaturangaben – sie reichen von zwei bis vier Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten (*59*).

7.2 NMR-Experimente

Alle NMR-Experimente wurden an einem DRX 500 Spektrometer der Firma Bruker am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Der Magnet hat eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla und eine Larmor-Frequenz für Protonen von 499.87 MHz und 125.77 MHz für ^{13}C-Kerne.

Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet. Die Spektren wurden bei Temperaturen zwischen 280K und 300K aufgenommen. 2D-Experimente wurden in F_1-Richtung phasensensitiv durch TPPI (*time proportional phase increment*) aufgenommen.

Die Messungen erfolgten in einem D_2O-Phosphatpuffer (99.9 %) pH 7 (nicht korrigiert). D_2O wurde von der Firma Deutero GmbH bezogen. Die Phosphatkonzentration lag bei 10 mM, die NaCl-Konzentration bei 20 mM und der Natrium-Azidanteil bei 0.04%. Die Saccharide α-GalOMe, β-GalOMe und LacNAc wurden von der Firma Sigma bezogen. Das Decasaccharid NA_2 wurde von Frau A. Kahrs und Dr. S. Meyer zu Verfügung gestellt – siehe auch Abschnitt 4.4.5. Die 2´-α-L-Fucosyl-D-lactose und das Lewis^b-Hexasaccharid wurden von der Firma Calbiochem erworben.

Die Unterdrückung des Restwassersignals erfolgte entweder in Form einer Vorsättigung des HDO-Resonanz-Signals mit einem schwachen RF-Puls während des Relaxationsdelays oder mittels WATERGATE-Spektren. Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kalibrierung der Spektren, inklusive der Integration der 2D-STD-TOCSY-Experimente, erfolgte mit der Software XWINNMR (Ver.: 2.5) und Aurelia (Ver.: 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (O2, Octane).

7.3 1D ^{1}H-NMR- und ^{1}H-STD-NMR-Experimente

1D ^{1}H-NMR-Spektren und ^{1}H-STD-NMR-Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 10-16 ppm aufgenommen. Die 1D-NMR-Spektren wurden mit 32 k Datenpunkten aufgenommen und vor der Fourier-Transformation auf 64 k mit Nullen aufgefüllt. Zur Apodisierung wurde das FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert (Linienverbreiterungsfaktor 0.3 – 3 Hz). Nach der Phasenkorrektur wurden die Protonenspektren einer automatischen Basislinien-Korrektur mit einem

Polynom fünften Grades unterzogen. Die Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde über einen $T_{1\rho}$-Filter bestehend aus einem Spinlock-Puls mit einer Länge zwischen 20 und 70 ms, je nach Grösse des Proteins, bei einer Abschwächung von 15 dB erreicht (*91*).

Bei den STD-NMR-Experimenten handelt es sich um Differenzmessungen und die Phasenzyklen wurden so gewählt, dass bei den 1D NMR-Experimenten die Subtraktion jeweils alternierend nach jedem Scan erfolgte. Dies minimiert Subtraktionsartefakte, die von Temperatur- oder Magnetfeldinhomogenitäten stammen. Die On- und Off-Resonance Frequenz der Vorsättigung wechselt folglich ebenfalls nach jedem Scan.

Alle STD-Experimente von Proben mit einem hohen H_2O-Anteil wurden mit WATERGATE Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Pulsleistung der sechs Pulse aus dem *Pulssandwich* wurde auf die Stärke des TOCSY-Spinlock Pulses eingestellt (12 dB). Der Delay zwischen den Pulsen, der das Anregungsprofil bestimmt, wurde je nach Probe auf Werte zwischen 150 und 250 µs gesetzt. In diesem Fall gilt, je kürzer der Delay, desto grösser der Abstand zur nächsten Nullanregung und folglich breiter ist das Anregungsprofil. Bei kurzen Delays erhält jedoch auch ein grosser Bereich um die Wasserresonanz wenig Anregung. Daher wird ein Kompromiss zwischen Selektivität und Anregungsbreite eingegangen.

Um eine hohe Selektivität der Sättigungspulse zu erreichen, wurde mit Gauss-Pulsen gearbeitet, die bei einer Pulsdauer von 50 ms und einer Abschwächung von 50 dB keine Anregung ausserhalb des gewünschten Bereiches besitzen. Dies wurde durch ein Pulsprogramm getestet, bei dem nach den 40 Gauss-Pulsen mit einem 90°-Puls die Anregungsspezifität bestimmt werden konnte. Da ausserhalb der Pulsmitte keinerlei Artefakte zu beobachten waren, ist bewiesen, dass die Selektivität der Anregungspulse ausreichend war. Bei den STD-NMR-Spektren erfolgte die Einstellung der Vorsättigungsdauer über die Anzahl an Gauss-Pulsen (10, 20, 30, 40, 60, 100 und 140) was bei einer Pulslänge von üblicherweise 50 ms einer Vorsättigungsdauer von 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 und 7 s entspricht. Als Standardeinstellung wurde eine Vorsättigungsdauer von 2 s gewählt. Der Delay zwischen den Pulsen betrug 1 ms und die Pulsstärke der Vorsättigung lag bei $(\gamma/2\pi) \times B_1 = 86.6$ Hz (50 dB). Die Einstrahlposition für die Vorsättigung des Proteins (On-Resonance) wurde je nach Protein bzw. Ligand variiert – typischerweise lag sie im Bereich der

Aromatensignale bei ca. 7 ppm oder im Bereich der Flanken der aliphatischen Signale zwischen +0.5 ppm und -0.5 ppm. Die Off-Resonance Frequenz betrug 15000-20000 Hz (40 ppm).

Um den prozentualen STD-Effekt bzw. den STD-Amplifikations-Faktor zu bestimmen, wurde bei jedem Überschuss ein Referenzexperiment unter identischen Konditionen aufgenommen, d.h. mit der selben Repetitionsdauer und einem Spinlock-Puls gleicher Länge. Die zu vergleichenden NMR-Experimente wurden mit den gleichen Parametereinstellungen prozessiert. Um identische Integrationsgrenzen zu gewährleisten, wurden eine Datei erzeugt, welche die Grenzen enthielt. Bei einigen NMR-Experimenten war eine Integration wegen des zu schlechten Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses nicht möglich. Dann wurden die STD-Intensitäten über den Dual-Display Modus in XWINNMR miteinander verglichen. Beide Arten der Auswertung der STD-Effekte führten zum selben Ergebnis.

7.4 2D STD-NMR-Experimente

7.4.1 STD-TOCSY-Experiment

Beim 2D STD-TOCSY-Experiment wurden die jeweiligen On- und Off-Resonance F1-Inkremente nach jedem F1-Inkrement als On-Resonance und Off-Resonance Spektrum in zwei getrennten Datensätzen gespeichert. Die Standard Bruker Pulsprogramme *mlevtp* für die Variante ohne Wasserunterdrückung sowie *mlev19tp* für die Variante mit Wasserunterdrückung wurden hierfür modifiziert. Die Mischzeit betrug bei allen TOCSY Spektren 100 ms. Es wurden 4k Datenpunkte bei 256 Inkrementen und zwischen 24 und 40 Scans je Inkrement aufgenommen. Die Differenzbildung erfolgte erst nach der Akquisition durch Subtraktion der prozessierten Daten *(92)*. Zu diesem Zweck wurden die beiden Spektren über den *add2d* Befehl im XWINNMR-Programm subtrahiert. Die TOCSY-Spektren wurden in F1- und F2-Dimension typischerweise mit einer um 90° verschobenen Quadrat-Sinusfunktion multipliziert. Integration der Kreuzpeaks erfolgte mit XWINNMR, da hier identische Integrationsgrenzen für das Differenz-Spektrum und das Off-Resonance-Spektrum verwendet werden konnten. Zudem können so auch sehr schwache oder breite Kreuzpeaks noch problemlos integriert werden. Der prozentuale STD-Effekt, bzw. der STD-Amplifikations-Faktor wurde analog zu den 1D STD-NMR-Spektren berechnet.

7.4.2 STD-HSQC-Experiment

Das STD-HSQC-Experiment wurde wie das STD-TOCSY-Experiment so modifiziert, dass die On und Off-Resonance Datensätze in zwei getrennte Verzeichnisse geschrieben wurden. Das Standard Bruker-Pulsprogramm *invietgssi* wurde hierfür modifiziert (109). Die jeweiligen Datensätze wurden mit 4k Datenpunkten bei 160 Inkrementen und 240 Scans je Inkrement aufgenommen. Die Differenzbildung erfolgte auch hier erst nach der Akquisition durch Subtraktion der prozessierten Daten. Aufgrund des schlechten Signal-zu-Rauschen-Verhältnis wurde von einer Integration abgesehen. Die HSQC-Spektren wurden in F1-Dimension mit einer um 90° verschobenen Sinus-Funktion multipliziert und in der F2-Dimension mit einer Gauss-Funktion mit dem Wert 0.01 und einem Linienverbreiterungsfaktor von -3 multipliziert.

7.5 Oberflächen Plasmonen Resonanz

Alle SPR-Experimente wurden mit einem BIAcore 3000-Gerät in der Medizinischen Universität Lübeck durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BIAeval.

Zur Vermessung der drei Saccharide β-GalOMe, LacNAc und NA_2 wurden ca. 2 ng RCA_{120} an einem Dextran-Chip immobilisiert. Zu diesem Zweck wurde der Chip mit 1-Ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid und *N*-Hydroxysuccinimid aktiviert und sukzessive mit einer 25 µM RCA_{120}-Lösung beladen. Die Beladung konnte anhand der Erhöhung der RU-Werte verfolgt werden. Bei einem RU-Wert von etwa 2000 wurde die Beladung beendet. Um die restlichen freien Carboxy-Gruppen zu inaktivieren, wurde eine 1 M Ethanolamin-Lösung über den Chip geleitet.

Da sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsphase bei allen vermessenen Sacchariden sehr schnell war, konnte die Dissoziationskonstante nicht aus den kinetischen Daten ermittelt werden. Der K_D-Wert wurde aus den für die jeweiligen Konzentrationen erhaltenen RU-Antworten über ein Langmuir-Bindungs-modell mit zwei unabhängigen Bindungstaschen bestimmt.

Die für die jeweiligen Konzentrationen erhaltenen RU-Werte wurden mit dem BIAeval Auswertungs-Programm an folgende Gleichung mit zwei unabhängigen Bindungsstellen angepasst:

$$R_{eq} = \frac{K_{A1} C R_1}{1 + K_{A1} C} + \frac{K_{A2} C R_2}{1 + K_{A2} C}$$

$R_1 + R_2 = R_{max}$, entspricht der theoretischen maximalen Bindungskapazität; C steht für die variable Konzentration des Liganden, K_{A1} für die Bindungskonstante der hoch-affinen Bindungsstelle und K_{A2} für die Bindungskonstante der niedrig-affinen Bindungsstelle des Rezeptors. Je nach Ligand wurden die RU-Werte bei 8 oder 9 Konzentrationen für die Anpassung an die obige Gleichung verwendet.

7.6 Sicherheitshinweise

Substanzname	*Gefahren-symbole*	*R-Sätze*	*S-Sätze*
Dinatriumhydrogenphosphat		36 / 37 / 38	26-36
Ethanolamin	Xn	20-36 / 37 / 38	
Natriumazid	T+, N	28-32-50 / 53	28.1-45-60-61
Natriumdihydrogenphosphat		36 / 37 / 38	26-36

7.7 Anhang: Pulsprogramme

Alle hier aufgelisteten Pulsprogramme wurden in Zusammenarbeit mit O. Schuster bearbeitet. Es handelt sich dabei um modifizierte Pulsprogramme der Standard Bruker Pulsprogramm-Bibliothek.

stdsp und stdslsp

Das Pulsprogramm *stdsp* wurde für die Aufnahme von 1D STD-NMR-Spektren mit einem selektiven Sättigungspuls geschrieben. Die Stärke des selektiven Pulses kann über *sp1* eingestellt werden, während die Dauer der Vorsättigung über die Anzahl der selektiven Pulse bestimmt wird – die mittels des Loops *l7* eingestellt werden können. Die Vorsättigung erfolgt über den zweiten Kanal, der daher explizit auf Protonen gestellt werden muss. Hier wurde immer mit einem Sinus-förmigen Puls mit einer Länge von 50 ms gearbeitet – daher entspricht eine Loopzahl von 40 einer Sättigungsdauer von 2 s.

Das Pulsprogramm *stdslsp* entspricht dem *stdsp*-Pulsprogramm, unterdrückt jedoch über einen $T_{1\rho}$-Filter die Proteinresonanzen. Die Länge des Spin-Lock Pulses wurde je nach Grösse des Proteins variiert. Je kleiner das Protein ist, desto länger muss der Spin-Lock-Puls gewählt werden. Die unterstrichenen Zeilen im unten

abgebildeten Bruker-Pulsprogramm müssen für das STD-NMR-Spektrum ohne Spin-Lock-Puls entfernt werden.

```
;stdsp, stdslsp
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list
;spin lock for protein suppression
;define 1H on channel f2 in edasp

#include <Avance.incl>

1 ze
2 20u pl1:f1
  d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times l7
  p1 ph1
  20u pl10:f1
  p10 ph2
  go=2 ph31
  wr #0
exit

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

;*******Power Level**********
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10: f1 channel - power level for spin lock pulse (15 dB)
;sp1 : f2  - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;**********Pulse************
;p1 : f1 channel -  90 degree high power pulse
;p10 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;**********Delays***********
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;
;presaturation = (p11 + d11) * l7   (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and Off-Resonance presaturation
;      O 499.87000 Off-Resonance 1x(15-20000 HZ) On-Resonance 1x(xxx HZ)
;      on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
```

std19sp und std19slsp

Das Pulsprogramm *std19sp* wird bei H_2O-haltigen Proben verwendet. Es ist die WATERGATE-Version des oben abgebildeten *stdsp* Pulsprogramms. Hierzu muss der 90°-Puls bei einer Pulsleistung von ca. 12 dB bestimmt werden. Diese Pulslänge wird dann als p18 definiert. D19, also der Delay zwischen den p18-Hartpulsen, definiert den 3, 9, 19 Pulssandwich, der das Anregungsprofil bestimmt. Der Delay d19 wurde auf Werte zwischen 150 und 250 µs eingestellt, je nachdem

welche Selektivität für die einzelnen Experimente nötig waren. Hier gilt, je kürzer der Puls, desto breiter ist das Anregungsprofil.

Das Pulsprogramm *std19slsp* ist entspricht dem oben beschriebenen Pulsprogramm *std19sp* ausser, dass es einen Spin-Lock Filter zur Unterdrückung von Proteinresonanzen beinhaltet. Die unterstrichenen Zeilen im unten abgebildeten Bruker-Pulsprogramm müssen für das STD-NMR-Spektrum ohne Spin-Lock-Puls entfernt werden.

```
;std10sp, std19slsp
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list
;spin lock for protein suppression
;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters
;define 1H on channel f2 in edasp

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

1 ze
2 20u pl1:f1
  d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times l7
  p1 ph1
  20u pl10:f1
  p10 ph2
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 pl18:f1
  p28*0.231 ph3
  d19*2
  p28*0.692 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p0*0.231 ph4
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  wr #0
exit

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

;*******Power Level**********
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
;pl10 : f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB)
;sp1 : f2  - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;**********Pulse************
;p1 : f1 channel -  90 degree high power pulse
```

```
;p0 : f1 channel -  90 degree pulse at pl18
;                  use for fine adjustment
;p28: f1 channel -  90 degree pulse at pl18
;p10 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;**********Delays***********
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;     d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;     d19 should be around 150-220 usec.
;
;presaturation = (p11 + d11) * l7   (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and Off-Resonance presaturation
;      O 499.87000 Off-Resonance 1x(15-20000 HZ) On-Resonance 1x(xxx HZ)
;      on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
;use gradient ratio    gp1   :   gp2
;                      20       20
```

stdmlev2f

Das Pulsprogramm *stdmlev2f* wurde verwendet, um STD-TOCSY-Spektren aufzunehmen. Es schreibt die Daten für die On-Resonance und Off-Resonance Einstrahlung in zwei getrennte Dateien, somit ist es nicht notwendig ein getrenntes Referenzexperiment aufzunehmen. Der Frequenzwechsel erfolgt jeweils nach einem Inkrement und nicht, wie bei den 1D STD-NMR-Experimenten, nach jedem Puls. Um das entsprechende STD TOCSY Spektrum zu erhalten, werden die Spektren mit identischen Parametern prozessiert und anschliessend die reelen Daten mit dem *add2d*-Befehl voneinander abgezogen.

```
;stdmlev2f
;avance-version
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
;for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;writing two files with dslist, subtracion of processed data only
;presat with shaped pulse defined by frequency list f1
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)


#include <Avance.incl>

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


1 ze
  3u fq1:f2
2 d11
3 d7 pl1:f1
4 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 4 times l7
```

```
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 5 times l1
  (p17 ph26)
  go=2 ph31
  d9 wr #1 if #1 zd fq1:f2
  goto 7
6 d11
7 d7 pl1:f1
8 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 8 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
9 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 9 times l1
  (p17 ph26)
  go=6 ph31
  d9 wr #2 if #2 id0 ip1 zd fq1:f2
  lo to 3 times td1
exit

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

;*******Power Level**********
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 50 -60 dB
;
;**********Pulse*************
;p1 : f1 channel -  90 degree high power pulse
```

```
;p5 : f1 channel -  60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel -  90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p17: f1 channel - trim pulse                    [2.5 msec]
;p11: shaped pulse                               [50  msec]
;
;**********Delays***********
;d0 : incremented delay (2D)                     [3 usec  ]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : delay between on and Off-Resonance switch          [min 30msec]
;d11: delay for disk I/O                         [30 msec ]
;d12: delay for power switching                  [20 usec ]
;d13: short delay                                [3 usec  ]
;d14: delay between presat pulses                [1 msec  ]
;
;L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;l7: loop counter, (d14 + p11) * l7 = presaturation time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI
;
;fq1 : define frequencies for on and Off-Resonance presaturation
;      O 499.87000 On-Resonance (xxxHZ) Off-Resonance (20000HZ)
```

std19mlev2f

Das Pulsprogramm *std19mlev2f* ist die zum Pulsprogramm *stdmlev2f* analoge WATERGATE-Version. Sie wurde verwendet, wenn Proben mit einem hohen Anteil an H_2O vermessen wurden. Es wurden wie beim *stdmlev2f* die Datensätze für die On- und Off-Resonance Spektren in zwei getrennte Dateien geschrieben. Erst nach der Prozessierung wurden die reelen Daten voneinander abgezogen, um das STD-Differenzspektrum zu erhalten.

```
;std19mlev2f
;avance-version
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
;for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;writing two files with dslist, subtracion of processed data only
;presat with shaped pulse defined by frequency list f1
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
;   Series A 102, 241 -245 (1993)

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


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

1 ze
  3u fq1:f2
2 d11
3 d7 pl1:f1
```

```
4 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 4 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 5 times l1
  (p17 ph26)
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 pl18:f1
  p28*0.231 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph5
  d19*2
  p28*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d9 wr #1 if #1 zd fq1:f2
  goto 7
6 d11
7 d7 pl1:f1
8 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 8 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
9 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 9 times l1
```

```
  (p17 ph26)
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 pl18:f1
  p28*0.231 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph5
  d19*2
  p28*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u BLKGRAD
  go=6 ph31
  d9 wr #2 if #2 id0 ip1 zd fq1:f2
  lo to 3 times td1
exit

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

;*******Power Level**********
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;pl18 : f1 channel -  power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 50 -60 dB
;
;**********Pulse*************
;p1 : f1 channel -  90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel -  60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel -  90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse                       [1msec]
;p17: f1 channel - trim pulse                      [2.5 msec]
;p28: f1 channel -  90 degree pulse at pl18
;p11: shaped pulse                                 [50  msec]
;
;**********Delays************
;d0 : incremented delay (2D)                         [3 usec  ]
;d9 : delay for relaxation between frequency switch       [min 30 msec]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O                           [30 msec ]
;d12: delay for power switching                       [20 usec ]
;d13: short delay                                  [3 usec  ]
;d14: delay between presat pulses                     [1 msec  ]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery             [ 200 u  ]
;d19: delay for binomial water suppression
;     d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;l7: loop counter, (d14 + p11) * l7 = presaturation time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI
;fq1 : define frequencies for on and Off-Resonance presaturation
;      O 499.87000 On-Resonance (xxxHZ) Off-Resonance (20000HZ)
;use gradient ratio:    gp 1 : gp 2
;                       20   : 20
```

stdinvietgssi2f

Das Pulsprogramm *stdinvgssi* basiert auf dem Bruker Pulsprogramm *invietgssi* und wurde verwendet, um STD-HSQC-Spektren zu erhalten. Wie bei den Pulsprogramm *stdmlev2f* wurden die Datensätze für die On- und Off-Resonance Spektren in zwei getrennte Dateien geschrieben. Erst nach der Prozessierung wurden die reelen Daten voneinander abgezogen, um so das STD-Differenzspektrum zu erhalten.

```
;invietgssi.os 11/98
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;   using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn.
;   Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114,
;   10663-5 (1992)
;J. Schleucher et al., Angew. Chem. 114(10), 1518 (1993)
;using channel f3 for selective presaturation accessed by f1 list
;use ds list for on and off resonance spectra

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

;;"p2=p1*2"
;;"p4=p3*2"
;;"d0=3u"
;;"d4=1s/(cnst2*4)"
;;"d11=30m"
;;"d13=3u"
"l3=(td1/2)"
"d20=p16+d16+50u+p2+d0*2"
"d21=d13+p16+d16+4u"

1 ze
  d11 pl12:f2
  d11 fq1:f3
2 d11 do:f2
  6m
3 d11
  18m
  3u
4 p11:sp1:f3
  d14
  lo to 4 times l7
5 (p1 ph1)
  d4 pl2:f2
  (p2 ph1) (p4 ph6):f2
  d4
  p28 ph1
  d13
  (p1 ph2) (p3 ph3):f2
  d0
  p2 ph7
  d0
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p4 ph4):f2
  d20
  (p1 ph1) (p3 ph4):f2
  d24
  (p2 ph1) (p4 ph1):f2
  d24
```

```
  (p1 ph2) (p3 ph5):f2
  d4
  (p2 ph1) (p4 ph1):f2
  d4
  (p1 ph1)
  d21
  (p2 ph1)
  d13
  GRADIENT(cnst22)
  d16 pl12:f2
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31 cpd2:f2
  d11 do:f2 wr #1 if #1 zd
  3m ip5
  3m ip5
  lo to 3 times 2
  3u fq1:f3
  goto 7
6 d11 do:f2
  6m
  3u
7 d11
  18m
8 p11:sp1:f3
  d14
  lo to 8 times l7
  (p1 ph1)
  d4 pl2:f2
  (p2 ph1) (p4 ph6):f2
  d4
  p28 ph1
  d13
  (p1 ph2) (p3 ph3):f2
  d0
  p2 ph7
  d0
  50u UNBLKGRAD
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p4 ph4):f2
  d20
  (p1 ph1) (p3 ph4):f2
  d24
  (p2 ph1) (p4 ph1):f2
  d24
  (p1 ph2) (p3 ph5):f2
  d4
  (p2 ph1) (p4 ph1):f2
  d4
  (p1 ph1)
  d21
  (p2 ph1)
  d13
  GRADIENT(cnst22)
  d16 pl12:f2
  4u BLKGRAD
  go=6 ph31 cpd2:f2
  d11 do:f2 wr #2 if #2 zd
  3m ip5
  3m ip5
  3u
  lo to 7 times 2
  d11 id0
  3m ip3
  3m ip3
  3m ip6
  3m ip6
  3m ip31
  3m ip31
  3u fq1:f3
  lo to 4 times l3
exit

ph1=0
```

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

**********Power Level******************
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;pl12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
**********Pulse************************
;p1 : f1 channel -  90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel -  90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
**********Delays************************
;d0 : incremented delay (2D)                 [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O                      [30 msec]
;d13: short delay                            [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: = p16+d16+50u+p2+d0*2
;d21: = d13+p16+d16+4u
;d24: 1/(4J)XH for XH
;     1/(6J)XH for all multiplicities
;L3: loop for phase sensitive 2D using  E/A method : l3 = td1/2
;L7: loop for presaturation period
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16, but 2 * ns * m
;td1: number of experiments
;define ds and f1 lists
;MC2: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;use gradient program (GRDPROG) :              2sineea
;use gradient ratio:       cnst21 : cnst22 : cnst23 : cnst24
;                                          80 :     20 :     80 :    -20   for C-13
;                                          80 :      8 :     80 :     -8   for N-15
```

8 Literatur

1 Hill, D. (1998) Trends in development of high-throughput screening technologies for rapid discovery of novel drugs. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **1**, 92-97.

2 Swali, V.; Langley, G. J.; Bradley, M. (1999) Mass spectrometric analysis in combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 337-341.

3 de Wildt, R. M.; Mundy, C. R.; Gorick, B. D.; Tomlinson, I. M. (2000) Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat. Biotechnol.* **18,** 989-94.

4 Schaertl, S.; Meyer-Almes, F. J.; Lopez-Calle, E.; Siemers, A.; Kramer, J. (2000) A novel and robust homogeneous fluorescence-based assay using nanoparticles for pharmaceutical screening and diagnostics. *J. Biomol. Screen.* **5,** 227-38.

5 Cheng, Y.; Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-108.

6 Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Kaku, H.; Shibuya, N. (1997) Elucidation of the mechanism enhancing the avidity of lectin with oligosaccharides on the solid phase surface. *Glycobiology* **7,** 1201-1208.

7 Cwirla, S. E.; Peters, E. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J. (1990) Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87,** 6378-82.

8 Scott, J. K.; Smith, G. P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249,** 386-90.

9 Tuerk, C.; Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249,** 505-10.

10 Petrakou, E.; Murray, A.; Rosamund, C.; Graves, L.; Price, M. R. (1998) Evaluation of Pepscan analyses for epitope mapping of anti-MUC1 monoclonal antibodies--a comparative study and review of five antibodies. *Anticancer Res.* **18,** 4419-21.

11 Murray, A.; Spencer, D. I.; Missailidis, S.; Denton, G.; Price, M. R. (1998) Design of ligands for the purification of anti-MUC1 antibodies by peptide epitope affinity chromatography. *J. Pept. Res.* **52,** 375-383.

12 Amzel, L. M. (1998) Structure-based drug design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 366-369.

13 Valler, M. J.; Green, D. (2000) Diversity screening versus focussed screening in drug discovery. *Drug Discov. Today* **5**, 286-293.

14 Kubinyi, H. (1998) Combinatorial and computational approaches in structure-based drug design. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **1**, 16-27.

15 Walters, W. P.; Ajay; Murcko, M. A. (1999) Recognizing molecules with drug-like properties. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 384-387.

16 Ajay, A.; Walters, W. P.; Murcko, M. A. (1998) Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules? *J. Med. Chem.* **41**, 3314-3324.

17 Ajay, A.; Murcko, M. A. (1995) Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. *J. Med. Chem.* **38**, 4953-4967.

18 Kubinyi, H. (1999) Chance favors the prepared mind--from serendipity to rational drug design. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **19**, 15-39.

19 Sadowski, J.; Kubinyi, H. (1998) A scoring scheme for discriminating between drugs and nondrugs. *J. Med. Chem.* **41**, 3325-3329.

20 Kuntz, I. D. (1992) Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*, **257**, 1078-1082.

21 Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. (1996) *Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel.* Spektrum Akad. Vlg., Heidelberg.

22 Fejzo, J.; Lepre, C. A.; Peng, J. W.; Bemis, G. W.; Ajay; Murcko, M. A.; Moore, J. M. (1999) The SHAPES strategy: an NMR-based approach for lead generation in drug discovery. *Chem. Biol.* **6**, 755-769.

23 Dotsch, V.; Wagner, G. (1998) New approaches to structure determination by NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 619-623.

24 Siegal, G.; van Duynhoven, J.; Baldus, M. (1999) Biomolecular NMR: recent advances in liquids, solids and screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 530-536.

25 Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Canada, F. J.; Poveda, A. (1999) Free and protein-bound carbohydrate structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 549-555.

26 Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wuthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 12366-12371.

27 Stockman, B. J. (1998) NMR spectroscopy as a tool for structure-based drug design. *Prog. NMR Spectrosc.* **33**, 109-151.

28 Meyer, B.; Weimar, T.; Peters, T. (1997) Screening mixtures for biological activity by NMR. *Eur. J. Biochem.* **246**, 705-709.

29 Henrichsen, D.; Ernst, B.; Magnani, J. L.; Wang, W.-T.; Meyer, B.; Peters, T. (1999) Bioaffinity NMR spectroscopy: Identification of an E-Selectin antagonist in a substance mixture by transfer NOE. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 98-102.

30 Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531-1534.

31 Hajduk, P. J.; Gerfin, T.; Boehlen, J. M.; Haberli, M.; Marek, D.; Fesik, S. W. (1999) High-throughput nuclear magnetic resonance-based screening. *J. Med. Chem.* **42**, 2315-2317.

32 Hajduk, P. J.; Dinges, J.; Miknis, G. F.; Merlock, M.; Middleton, T.; Kempf, D. J.; Egan, D. A.; Walter, K. A.; Robins, T. S.; Shuker, S. B.; Holzman, T. F.; Fesik, S. W. (1997) NMR-based discovery of lead inhibitors that block DNA binding of the human papillomavirus E2 protein. *J. Med. Chem.* **40**, 3144-3150.

33 Mayer, M.; Meyer, B. (2000). Mapping the active site of angiotensin-converting enzyme by transferred NOE spectroscopy. *J. Med. Chem.* **43**, 2093-9.

34 Herfurth, L.; Weimar, T.; Peters, T. (2000) Application of 3D-TOCSY-trNOESY for parallel screening and ab initio assignment of bioactive ligands from mixtures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 2097-2099.

35 Fesik, S. W. (1993) NMR structure-based drug design. *J. Biomol. NMR* **3**, 261-269.

36 Stoesz, J. D.; Redfield, A. G.; Malinowski, D. (1978) Cross relaxation and spin diffusion effects on the proton NMR of biopolymers in H2O. Solvent saturation and chemical exchange in superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **91**, 320-324.

37 Dalvit, C.; Pevarello, P.; Tatò, M-; Veronesi, M.; Vulpetti, A.; Sundström, M. (2000) Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water. *J. Biomol. NMR* **18**, 65-68.

38 Chen, A.; Shapiro, M. J. (2000) NOE pumping. 2. A high-throughput method to determine compounds with binding affinity to macromolecules by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 414-415.

39 Jahnke, W.; Perez, L. B.; Paris, C. G.; Strauss, A.; Fendrich, G.; Nalin, C. M. (2000) Second-site NMR screening with a spin-labeled first ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7394-95.

40 Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. (1998) NMR methods in combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 372-375.

41 Chen, A.; Shapiro, M. J. (1999) Affinity NMR. *Anal. Chem.* **71**, 669-675.

42 Chen, A.; Shapiro, M. J. (1999) Nuclear Overhauser Effect on diffusion measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5338-39.

43 Hajduk, P. J.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. (1997) One-dimensional ralaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12257-61.

44 Mengfin, L.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. (1997) Screening mixtures by affinity NMR. *J. Org. Chem.* **62**, 8930-31.

45 Mengfin, L.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. (1997) Diffusion-edited NMR - affinity NMR for direct observation of molecular interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5249-50.

46 Dalvit, C.; Floersheim, P.; Zurini, M.; Widmer, A. (1999) Use of organic solvents small molecules for locating binding sites on proteins in solutions. *J. Biomol. NMR* **14**, 23-32.

47 Verheyden, P.; Pletinckx, J.; Maes, D.; Pepermans, H. A.; Wyns, L.; Willem, R.; Martins, J. C. (1995) 1H NMR study of the interaction of N,N',N''-triacetyl chitotriose with Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from Amaranthus caudatus. *FEBS Lett.* **370,** 245-9.

48 Crocker, P. R.; Vinson, M.; Kelm, S.; Drickamer, K. (1999) Molecular analysis of sialoside binding to sialoadhesin by NMR and site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **341,** 355-61.

49 Akasaka, K. (1979) Intermolecular spin diffusion as a method for studying macromolecule-ligand interactions. *J. Magn. Reson.* **36**, 135-140.

50 Umemoto, K.; Oikawa, S.; Aida, M.; Sugawara, Y. (1988) Intermolecular nuclear Overhauser effect and atomic pair potential approaches to wheat germ agglutinin-sugar binding. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 593-608.

51 Chen, A.; Shapiro, M. J. (1998) NOE pumping: A novel NMR technique for identification of compounds with binding affinity to macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10258-10259.

52 Weimar, T. (2000) Recent trends in the application of evanescent wave biosensors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **39**, 1219-1221.

53 Nagata, K.; Handa, H. (2000) Real-time analysis of biomolecular interactions: Applications of Biacore. *Springer Verlag, Berlin*.

54 Rich, R. L.; Myszka, D. G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 54-61.

55 Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130.

56 Sharon, N. & Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949-59.

57 Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. (1998) Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 550-575.

58 Gabius, H.-J.; Rüdiger, H.; Uhlenbruck, G. (1988) Lektine. *Spektrum der Wissenschaft* **11**, 50-60.

59 Wright, C. S. (1984) Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J. Mol. Biol.* **178**, 91-104.

60 Wright, C. S.; Kellogg, G. E. (1996) Differences in hydropathic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes. *Protein Sci.* **5**, 1466-1476.

61 Kochibe, N.; Furukawa, K. (1980) Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of Aleuria aurantia. *Biochemistry* **19**, 2841-2846.

62 Debray, H.; Montreuil, J. (1989) Aleuria aurantia agglutinin. A new isolation procedure and further study of its specificity towards various glycopeptides and oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **185**, 15-26.

63 Yamashita, K.; Kochibe, N.; Ohkura, T.; Ueda, I.; Kobata, A. (1985) Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia lectin. *J. Biol. Chem.* **260**, 4688-4693.

64 Fukumori, F.; Takeuchi, N.; Hagiwara, T.; Ito, K.; Kochibe, N.; Kobata, A.; Nagata, Y. (1989) Cloning and expression of a functional fucose-specific lectin from an orange peel mushroom, Aleuria aurantia. *FEBS Lett.* **250**, 153-156.

65 Fukumori, F.; Takeuchi, N.; Hagiwara, T.; Ohbayashi, H.; Endo, T.; Kochibe, N.; Nagata, Y.; Kobata, A. (1990) Primary structure of a fucose-specific lectin obtained from a mushroom, Aleuria aurantia. *J. Biochem. (Tokyo)* **107**, 190-196.

66 Vold, R. L.; Waugh, J. S.; Klein, M. P.; Phelps, D. E. (1968) Measurement of spin relaxation in complex systems. *J. Chem. Phys.* **48**, 3831.

67 van de Ven, F. J. (1995) Multidimensional NMR in liquids. *VCH Publishers Inc*.

68 Torrey, H. C. (1949) Transient nutations in nuclear magnetic resonance. *Phys. Rev.* **76**, 1059-68.

69 Neuhaus, D.; Williamson, M, (1989) The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim*.

70 Eykyn, T. R.; Fruh, D.; Bodenhausen, G. (1999) Identification of spin diffusion pathways in isotopically labeled biomolecules. *J. Magn. Reson.* **138**, 330-333.

71 Kalk, A.; Berendsen, H. J. C. (1976) Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins. *J. Magn. Reson.* **24**, 343-366.

72 Akasaka, K.; Konrad, M.; Goody, R. S. (1978) Selective spin diffusion. A novel method for studying motional properties of biopolymers in solution. *FEBS Lett.* **96**, 287-290.

73 Highsmith, S.; Akasaka, K.; Konrad, M.; Goody, R.; Holmes, K.; Wade-Jardetzky, N.; Jardetzky, O. (1979) Internal motions in myosin. *Biochemistry* **18**, 4238-4244.

74 Andree, P. J. (1978) The effect of cross relaxation on the longitudinal relaxation times of small ligands binding to macromolecules. *J. Magn. Reson.***29**, 419-431.

75 Ni, F. (1994) Recent developments in transferred NOE methods. *Progr. NMR Spectrosc.* **26**, 517-606.

76 Forsén, S.; Hoffman, R. A. (1963) Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **39**, 2892-2901.

77 Forsén, S.; Hoffman, R. A. (1964) Exchange rates by nuclear magnetic resonance. III. Exchange reactions in systems with several nonequivalent sites. *J. Chem. Phys.* **40**, 1189-98.

78 Clore, G. M.; Roberts, G. C. K.; Gronenborn, A.; Birdsall, B.; Feeney, J. (1981) Transfer of saturation NMR studies of protein-ligand complexes. Three site exchange. *J. Magn. Reson.* **45**, 151-161.

79 Boulat, B.; Epstein, D. M.; Rance, M. (1999) Selective injection of magnetization by slow chemical exchange in NMR. *J. Magn. Reson.* **138,** 268-76.

80 Boulat, B.; Rance, M. (1996) Selective transfer of magnetization by incoherent processes in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Magn. Reson. B* **110,** 288-97.

81 Caines, G. H.; Schleich, T. (1991) Incorporation of saturation transfer into the formalism for rotating-frame spin-lattice NMR relaxation in the presence of an off-resonance irradiation field. *J. Magn. Reson.* **95**, 457-476.

82 Baguet, E.; Roby, C. (1997) Off-resonance irradiation effect in steady-state NMR saturation transfer. *J. Magn. Reson.* **128,** 149-60.

83 Mayer, M.; Meyer B. (1999) Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **111**, 1902-1906.

84 Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. (1999) Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5336-5337.

85 Sanders, J. K. M.; Mersh, J. D. (1982) Nuclear magnetic double resonance; the use of difference spectroscopy. *Progr. NMR Spectr.* **15**, 353-400.

86 Poppe, L.; Brown, G. S. ; Philo, J. S.; Nikrad, P. V.; Shah, B. H. (1997) Conformation of sLex tetrasaccharide, free in solution and bound to E-, P-, and L-Selectin. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1727-1736.

87 Kochibe, N.; Furukawa, K. (1980) Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of Aleuria aurantia. *Biochemistry* **19**, 2841-2846.

88 Bains, G.; Lee, R. T.; Lee, Y. C.; Freire, E. (1992) Microcalorimetric study of wheat germ agglutinin binding to N- acetylglucosamine and its oligomers. *Biochemistry* **31**, 12624-12628.

89 Privat, J. P.; Delmotte, F.; Mialonier, G.; Bouchard, P.; Monsigny, M. (1974) Fluorescence studies of saccharide binding to wheat-germ agglutinin (lectin). *Eur. J. Biochem.* **47**, 5-14.

90 Nagata, Y; Burger, M. M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.* **249**, 3116-3122.

91 Scherf, T.; Anglister, J. (1993). A T1 rho-filtered two-dimensional transferred NOE spectrum for studying antibody interactions with peptide antigens. *Biophys. J.* **64**, 754-61.

92 Bax, A.; Davis, D. G. (1985) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.

93 Schuster, O. (2000) Identifizierung und Charakterisierung neuer E-Selektin Antagonisten. *Dissertation Hamburg.*

94 Weimar, T.; Bukowski, R.; Young, N. M. (2000) The conformation of the T-antigen disaccharide bound to maclura pomifera agglutinin in aqueous solution, *J. Biol. Chem.* **275**, 37006-37010.

95 Espinosa, J. F.; Asensio, J. L.; Garcia, J. L.; Laynez, J.; Bruix, M.; Wright, C.; Siebert, H. C.; Gabius, H. J.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. (2000) NMR investigations of protein-carbohydrate interactions Binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N',N''-triacetylchitotriose. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3965-3978.

96 Asensio, J. L.; Canada, F. J.; Bruix, M.; Gonzalez, C.; Khiar, N.; Rodriguez-Romero, A.; Jimenez-Barbero, J. (1998) NMR investigations of protein-carbohydrate interactions: refined three-dimensional structure of the complex between hevein and methyl beta-chitobioside. *Glycobiology* **8**, 569-77.

97 Weaver, J. L.; Prestegard, J. H. (1998) Nuclear magnetic resonance structural and ligand binding studies of BLBC, a two-domain fragment of barley lectin. *Biochemistry* **37,** 116-28.

98 Kronis, K. A.; Carver, J. P. (1982) Specificity of isolectins of wheat germ agglutinin for sialyloligosaccharides: a 360-MHz proton nuclear magnetic resonance binding study. *Biochemistry* **21**, 3050-7.

99 Kronis, K. A.; Carver, J. P. (1985) Thermodynamics of wheat germ agglutinin-sialyloligosaccharide interactions by proton nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **24**, 834-40.

100 Kronis, K. A.; Carver, J. P. (1985) Wheat germ agglutinin dimers bind sialyloligosaccharides at four sites in solution: proton nuclear magnetic resonance temperature studies at 360 MHz. *Biochemistry* **24**, 826-33.

101 Cooper, A. (1999) Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 557-563.

102 Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.

103 Hwang, T.-L.; Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson. Series A* **112**, 275-279.

104 Canet, D.; Brondeau, J.; Mischler, E.; Humbert, F. (1993) Solvent suppression by use of a DANTE train of B_1 gradient pulses. *J. Magn. Reson. Series A* **105**, 239-244.

105 Möller, H. Diplomarbeit, (1999) Universität Hamburg.

106 Evans, J. N. S. (1995) Biomolecular NMR Spectroscopy. *Oxford University Press.*

107 Kochibe, N.; Furukawa, K. (1980) Purification and properties of a novel fucose-specific hemagglutinin of Aleuria aurantia. *Biochemistry* **19**, 2841-2846.

108 Kochibe, N.; Furukawa, K. (1982) Aleuria aurantia hemagglutinin. *Methods Enzymol.* **83**, 373-377.

109 Palmer III, A. G.; Cavanagh, J.; Wright, P. E.; Rance, M. (1991) Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy *J. Magn. Reson.* **93**, 151-170.

110 Bauer, C.; Freeman, R.; Frenkiel, T.; Keeler, J.; Shaka, A. J. (1983) Gaussian pulses. *J. Magn. Reson.* **58**, 442-457.

111 Sharma, S.; Bharadwaj, S.; Surolia, A.; Podder, S. K. (1998) Evaluation of the stoichiometry and energetics of carbohydrate binding to Ricinus communis agglutinin: a calorimetric study. *Biochem. J.* **333**, 539-42.

112 Bhattacharyya, L.; Brewer, C. F. (1988) Lectin-carbohydrate interactions. Studies of the nature of hydrogen bonding between D-galactose and certain D-galactose-specific lectins, and between D-mannose and concanavalin A [published erratum appears in *Eur. J. Biochem.* (1988) **3,** 693]. *Eur. J. Biochem.* **176**, 207-212.

113 Bhattacharyya, L.; Brewer, C. F. (1988) Binding and precipitation of lectins from Erythrina indica and Ricinus communis (agglutinin I) with synthetic cluster glycosides. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 605-608.

114 Bhattacharyya, L.; Brewer, C. F. (1992) Formation of homogeneous carbohydrate-lectin cross-linked precipitates from mixtures of D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine-specific lectins and multiantennary galactosyl carbohydrates. *Eur. J. Biochem.* **208**, 179-185.

115 Rivera-Sagredo, A.; Jimenez-Barbero, J.; Martin-Lomas, M.; Solis, D.; Diaz-Maurino, T. (1992) Studies of the molecular recognition of synthetic methyl beta-lactoside analogues by Ricinus communis agglutinin. *Carbohydr. Res.* **232**, 207-226.

116 Solis, D.; Fernandez, P.; Diaz-Maurino, T.; Jimenez-Barbero, J.; Martin-Lomas, M. (1993) Hydrogen-bonding pattern of methyl beta-lactoside binding to the Ricinus communis lectins. *Eur. J. Biochem.* **214**, 677-683.

117 Graphpad Software Inc.
URL:http://www.curvefit.com.

118 Wülfken, J. (2001) *Dissertation Hamburg*.

119 Bhattacharyya, L.; Haraldsson, M.; Brewer, C. F. (1988) Precipitation of Galactose-Specific Lectins by Complex-Type Oligosaccharides and Glycopeptides: Studies with Lectins from Ricinus communis (Agglutinin I), Erythrina indica, Erythrina arborescens, Arbrus precatorius (Agglutinin), and Glycin max (Soybean). *Biochemistry* **27**, 1034-1041.

120 Corradi da Silva, M. L.; Tamura, T.; McBroom, T.; Rice, K. G. (1994) Tyrosine derivatization and preparative purification of the sialyl and asialy-N-linked oligosaccharides from porcine fibrinogen. *Arch. Biochem. Biophys.* **312***,* 151-157.

121 Tamura, T.; Wadhwa, M. S.; Rice, K. G. (1994) Reducing-end modification of N-linked oligosaccharides with tyrosine. *Anal. Biochem.* **216***,* 335-344.

122 Shinohara, Y.; Sota, H.; Kim, F.; Shimizu, M.; Gotoh, M.; Tosu, M.; Hasegawa, Y. (1995) Use of a biosensor based on surface plasmOn-Resonance and biotinyl glycans for analysis of sugar binding specificities of lectins. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 1076-1082.

123 Zeng, X.; Murata, T.; Kawagishi, H.; Usui, T.; Kobayashi, K. (1998) Analysis of specific interactions of synthetic glycopolypeptides carrying N-acetyllactosamine and related compounds with lectins. *Carbohydr. Res.* **312**, 209-217.

124 de Waard, P.; Leeflang, B. R.; Vliegenthart, J. F.; Boelens, R.; Vuister, G. W.; Kaptein, R. (1992) Application of 2D and 3D NMR experiments to the conformational study of a diantennary oligosaccharide. *J. Biomol. NMR* **2**, 211-26.

125 Wieruszeski, J. M.; Michalski, J. C.; Montreuil, J.; Strecker, G. (1989) Sequential 1H and 13C resonance assignments for an octa- and decasaccharide of the N-acetyllactosamine type by multiple-step relayed correlation and heteronuclear correlation nuclear magnetic resonance. *Glycoconj. J.* **6**, 183-194.

126 Narasimhan, S.; Freed, J. C.; Schachter, H. (1986) The effect of a "bisecting" N-acetylglucosaminyl group on the binding of biantennary, complex oligosaccharides to concanavalin A, Phaseolus vulgaris erythroagglutinin (E-PHA), and Ricinus communis agglutinin (RCA-120) immobilized on agarose. *Carbohydr. Res.* **149**, 65-83.

127 Böttcher, K. (1998) Konformationsanalyse von *N*-Glycanen pankretischer Ribonucleasen. *Dissertation Hamburg.*

128 Nieba, L.; Krebber, A.; Pluckthun, A. (1996) Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.* **234**, 155-165.

129 Vortrag Mueller, L. IX ICMRBS-Tagung in Florenz (2000).

130 Vogtherr, M.; Peters, T. (2000) Application of NMR based binding assay to identify key hydroxy groups for intermolecular recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6093-6099.

131 Persönliche Mitteilung, Thomas Weimar und Lars Herfurth (Medizinische Universität Lübeck).

Danksagung:

- Jule, für die letzten acht wunderbaren Jahre.
- Meinen Eltern sowie meiner Familie diesseits und jenseits des Atlantiks, für die jahrelange moralische und finanzielle Unterstützung.
- Oliver Schuster, für die vielen "entspann dich mal"-Sessions wissenschaftlicher und privater Natur.
- Jan Wülfken, ¿qué pasa tío? Sonst noch Fragen?
- Florian Ende, ohne den ein Gang in die Mensa sterbenslangweilig wäre.
- Heiko Möller, für seine tatkräftige Unterstützung bei Eskimo-Rollen und sonstigen kinetischen Effekten.
- Robert Meinecke und Jens Klein, mit denen sogar Bruker-Benutzertagungen und Corel-War-Sitzungen (zähle Schriften!) Unterhaltung bieten.
- Erika Paul, für die netten Tage in Florenz.
- Christian Seeberger, fürs Eisgolfen im November und allem, was mit to_unix oder to_dos zu tun hat.
- Jutta Tost, für die Becky-Einweisung und die vielen Gummibären.
- Allen anderen Mitgleider des AK Meyer, die nicht namentlich erwähnt wurden. Ohne euch hätte es nur halb soviel Spass gemacht.
- Dr. Volker Sinnwell, für die vielen kleinen Hilfen rund um das NMR-Spektrometer.
- Thio, für die Biacore-Einführung und den Schlafplatz in Lübeck.

Lebenslauf

Name:	Moriz Mayer
Geburtsdatum:	15. Oktober, 1971
Geburtsort:	Hamburg

Ausbildung:

seit 01.98	Universität Hamburg, Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer am Institut für Organische Chemie **Titel**: STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen
10.93 - 12.97	Universität Hamburg, Studium der Chemie Diplomhauptprüfung
01.97 - 12.97	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer **Titel**: Untersuchungen an *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Ligand-Komplexen mit transferred-NOE Messungen
01.95 - 05.95	Erasmus-Austausch an die Universität von Sevilla (Spanien) im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Carmona
10.91 - 09.93	Universität Freiburg, Studium der Chemie Diplomvorprüfung
12.90	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife in La Paz / Bolivien

Anstellungsverhältnisse:

07.98 – 02.01	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg.
11.97 – 12.97	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Universität zu Lübeck.

Veröffentlichungen:

- M. Mayer, B. Meyer, Mapping the Active Site of Angiotensin-Converting Enzyme by Transferred NOE Spectroscopy. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2093-2099.
- M. Mayer, B. Meyer, Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectra. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *35*, 1784-1788.
- J. Klein, R. Meinecke, M. Mayer, B. Meyer, Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Proteins in Compound Libraries by HR-MAS STD NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336-5337.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.