

AUFKLÄRUNG DER INTERAKTION
ZWISCHEN DEM HUMANEN
PRIONPROTEIN UND DEM PEPTIDISCHEN
AGGREGATIONSINHIBITOR
NMHRYPNQ

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dirk Rehders

aus Hamburg

im Juni 2009

„Fortitudine Vincimus“

Sir Ernest Shackleton, Familienmotto

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von Januar 2006 bis Januar 2009 am Institut für Organische Chemie, Department Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Bernd Meyer, durchgeführt.

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 31.07.2009

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	1
1.1.1 Eine neue Krankheit	1
1.1.2 Der Erreger	2
1.1.3 Struktur des Prionproteins	3
1.1.4 Replikation des PrP ^{Sc}	5
1.1.5 Therapie von TSE	8
1.2 Methoden	10
1.2.1 Peptidsynthese	10
1.2.2 Rekombinante Expression von isotopenmarkierten Proteinen	12
1.2.3 NMR-spektroskopische Methoden	12
1.2.4 MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente	15
1.2.5 Oberflächenplasmonen Resonanz	16
1.2.6 Circular Dichroismus	19
1.2.7 <i>Molecular Modeling</i>	21
2 AUFGABENSTELLUNG	22
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
3.1 Rekombinante Expression des Prionproteins in E. coli	24
3.1.1 Expression des humanen Prionproteins (hPrP90-230)	24
3.1.2 Expression des ¹⁵ N markierten humanen Prionproteins (hPrP90-230)	25
3.2 Aufklärung der Peptidbindungsregion auf dem Prionprotein	27
3.2.1 ¹ H, ¹⁵ N-HSQC <i>chemical shift mapping</i> Experimente mit NMHRYPNQ	27
3.2.2 MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente mit NMHRYPNQ	32
3.2.3 Die Bindungsregion des Peptids 1 auf dem Prionprotein	38
3.3 Alaninscan von ¹⁴⁹YYRENMHR¹⁵⁶ und ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰	39
3.3.1 Synthese der Alaninscan Peptide	39
3.3.2 SPR Studien der Peptide aus dem Alaninscan	41
3.4 STD NMR-Experimente	49
3.4.1 Bestimmung der Proteinsättigung	49
3.4.2 STD NMR-Experimente mit Peptiden aus dem Alaninscan	50
3.4.3 STD NMR-Experimente mit Peptid 11	52
3.4.4 Bestimmung des Bindungsepitops des Peptids 11	57
3.5 <i>Molecular docking</i> des Peptids 1 mit dem PrP^C	61

3.6 Untersuchung der Peptide im Aggregationsassay	64
3.6.1 CD-spektroskopische Untersuchungen	64
3.6.2 Konzentrationsabhängige Inhibition der Prionaggregation	70
3.6.3 Aggregationsverhalten in einem nichtoxidativen Konversionsassay	71
3.6.4 Aggregationsassay der Peptide aus dem Alaninscan	72
3.7 Analyse des flankierenden Sequenzbereiches des Peptids 1	76
3.7.1 Synthese der Peptide	76
3.7.2 Bestimmung der Bindungskonstanten mittels SPR	78
3.7.3 Untersuchung der Peptide im oxidativen Aggregationsassay	81
3.8 Bindung der Chitobiose an das humane Prionprotein	83
3.8.1 SPR-Experimente mit Chitobiose	84
3.8.2 STD NMR-Experimente mit Chitobiose	86
3.8.3 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC <i>chemical shift mapping</i> Experimente mit der Chitobiose	87
3.8.4 Dockingstudien der Chitobiose	90
3.9 Kombination der Bindungsepitope von Peptid 1 und Chitobiose	93
3.9.1 Synthese des Chitobiosylasparaginbausteins	93
3.9.2 Synthese des Glycopeptids 39	95
3.9.3 SPR-Bindungsstudien mit dem Peptid 39	96
3.9.4 Synthese des Glycopeptids 40	98
3.9.5 SPR-Bindungsstudien und Aggregationsassay des Peptids 40	99
3.10 Ausblick	102
4 ZUSAMMENFASSUNG	104
5 SUMMARY	106
6 EXPERIMENTELLER TEIL	108
6.1 Verwendete Geräte und Chemikalien	108
6.1.1 Verwendete Geräte	108
6.1.2 Verwendete Chemikalien	109
6.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen	110
6.2 Rekombinante Expression des Prionproteins	112
6.2.1 Expression des Prionproteins	112
6.2.2 Expression des ^{15}N -markierten Prionproteins	113
6.3 NMR-Experimente	114
6.3.1 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC- <i>chemical shift mapping</i> Experimente	114
6.3.2 STD NMR-Experimente	115
6.4 MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente	118
6.5 Synthese des Chitobiosylasparaginbausteins	120
6.5.1 Deacetylierung von Chitobioseoctaacetat	120
6.5.2 Darstellung von 1-Aminochitobiose (31)	121

6.5.3 Darstellung von 5-(9 <i>H</i> -9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopentansäure (32)	121
6.5.4 Darstellung von <i>N</i> -(5 <i>N</i> -(9 <i>H</i> -9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (33)	122
6.5.5 Darstellung von <i>N</i> -(5-Aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid (34)	125
6.5.6 Darstellung von <i>N</i> -((5 <i>N</i> -Aminopentanamidyl)-5'- <i>N</i> -(9 <i>H</i> -9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (35)	127
6.5.7 Darstellung von <i>N</i> -((5 <i>N</i> -Aminopentanamidyl)-5'-aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid (36)	129
6.5.8 Darstellung von <i>N</i> -((5 <i>N</i> -Aminopentanamidyl)-5'- <i>N</i> -(asparaginylo-(¹ butyl)- <i>N</i> -(9 <i>H</i> -9-fluorenylmethoxycarbonyl))aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (37)	132
6.5.9 Darstellung von <i>N</i> -((5 <i>N</i> -Aminopentanamidyl)-5'- <i>N</i> -(asparaginylo- <i>N</i> -(9 <i>H</i> -9-fluorenylmethoxycarbonyl))aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (38)	135
6.6 Peptidsynthese	137
6.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften	137
6.6.2 Synthese der Peptide 1-19	140
6.6.3 Synthese der Peptide 20-28	150
6.6.5 Synthese des Glycopeptids 39	155
6.6.6 Synthese des Glycopeptids 40	157
6.7 SPR-Bindungsstudien	158
6.7.1 Immobilisierung des Prionproteins auf dem Messchip	158
6.7.2 Aufnahme der Konzentrationsreihen	159
6.8 Molecular docking	160
6.9 Aggregationsassays und CD-Spektroskopie	162
6.9.1 Oxidativer Aggregationsassay	162
6.9.2 Nichtoxidativer Aggregationsassay	163
6.9.3 Circular Dichroismus (CD) Messungen	163
7 TOXIKOLOGIE	164
8 ANHANG	166
8.1 Proteinsequenzen	166
8.1.1 Proteinsequenz hPrP(90-230)	166
8.1.2 Proteinsequenz hPrP(90-230)- <i>His-Tag</i>	166
8.1.3 Proteinsequenz hPrP(121-230)- <i>His-Tag</i>	166
8.2 NMR-Pulsprogramme	166
9 LITERATURVERZEICHNIS	175
10 DANKSAGUNG	192
11 CURRICULUM VITAE	194

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
äq	Äquivalent
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CD	Circular Dichroismus
Chi	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosaminyl-β-(1,4)- <i>N</i> -acetyl-D-glucosamin
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CJD	<i>Creutzfeldt Jakob disease</i>
CWD	<i>Chronic wasting disease</i>
CV	<i>column volume</i>
<i>d</i>	Dublett
<i>dd</i>	Dublett von einem Dublett
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser (18.8 MΩ)
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FFI	<i>fatal familia insomnia</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GSS	Gerstmann-Straußler-Scheinker-Syndrom
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HATU	2-(1- <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)1,1,3,3,-tetramethyluronium-hexafluorophosphat

HBS-N	<i>Hepes buffered saline-N</i>
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
hPrP	humanes Prionprotein
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die zu 50% Inhibition führt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
k	1k entspricht 1024 Einheiten
kDa	Kilodalton
k _{on}	Assoziationsrate [M ⁻¹ s ⁻¹]
k _{off}	Dissoziationsrate [s ⁻¹]
K _D	thermodynamische Dissoziationskonstante
<i>m</i>	Multipllett
M	Molar [mol L ⁻¹]
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	Molgewicht [g mol ⁻¹]
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaAc	Natriumacetat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>Nuclear overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear overhauser and exchange spectroscopy</i>
ns	<i>number of scans</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei λ = 600 nm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL	Peptidamid-Linker
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
ppm	<i>parts per million</i>
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	pathogenes Prionprotein

PS	Polystyrol
R _f	Retentionsfaktor
ROESY	<i>Rotating Frame Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy</i>
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response unit</i>
SAR	<i>structure activity relationship</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
STD	Sättigungstransfer Differenz
<i>t</i>	Triplett
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBTU	2-(1- <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Tri- <i>iso</i> -propylsilan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
v/v	Volumen per Volumen
WATERGATE	<i>water suppression by gradient taylorred excitation</i>
w/v	Masse per Volumen
Zers.	Zersetzung

Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 *Transmissible Spongiforme Enzephalopathien*

1.1.1 Eine neue Krankheit

Die erste medizinische Beschreibung einer spongiformen Enzephalopathie des Menschen erfolgte in den Jahren 1920/21, als H. G. Creutzfeldt und A. Jakob unabhängig voneinander über eine neuartige Erkrankung des Zentralnervensystems berichteten.^{1;2}

Mittlerweile sind eine Reihe von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) bei diversen Spezies bekannt. Zu den beim Menschen auftretenden Formen zählen neben der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) unter anderem Kuru, eine durch rituellen Kannibalismus übertragene TSE in Neuguinea und die beiden erblich bedingten Formen *fatal familia insomnia* (FFI) und das Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrom (GSS).³ Die nicht humanen Varianten umfassen unter anderem die Traberkrankheit (*scrapie*) bei Schafen, *chronic wasting disease* (CWD) bei Hirschartigen und die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern.⁴⁻⁶

Alle diese Krankheiten zeichnen sich durch eine lange symptomlose Inkubationszeit aus, der ein schnell fortschreitender Krankheitsverlauf folgt. In dieser Phase kommt es zunächst zu Schreckhaftigkeit und Ataxie. Nach darauffolgender zunehmender Demenz steht am Ende der Tod des Patienten, jedoch ohne das eine Immunantwort des Körpers zu beobachten ist.^{7;8}

Histologisch ist eine schwammartige Auflockerung des Hirngewebes zu beobachten, die aus der Apoptose der Neuronen resultiert und des Weiteren werden Proteinablagerungen in Form von amyloiden Plaques nachgewiesen (Abbildung 1).^{5;9} Diese Befunde werden auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten, wie z. B. Alzheimer, beobachtet. Die TSEs unterscheiden sich jedoch von diesen nicht nur in ihrer Symptomatik, welche auf den unterschiedlichen betroffenen Regionen des Gehirns beruht, sondern vor allem durch ihre Übertragbarkeit.^{10;11} Diese wurde zum ersten Mal von Gibbs *et al.* und Gajdusek *et al.* bewiesen, die Kuru bzw. CJD auf Schimpansen übertrugen.^{12;13} Später sind Fälle bekannt geworden, in denen TSEs während Operationen im Hirnbereich durch kontaminiertes OP-Besteck oder durch das Verabreichen von Hypophysenhormonen übertragen wurde.¹⁴

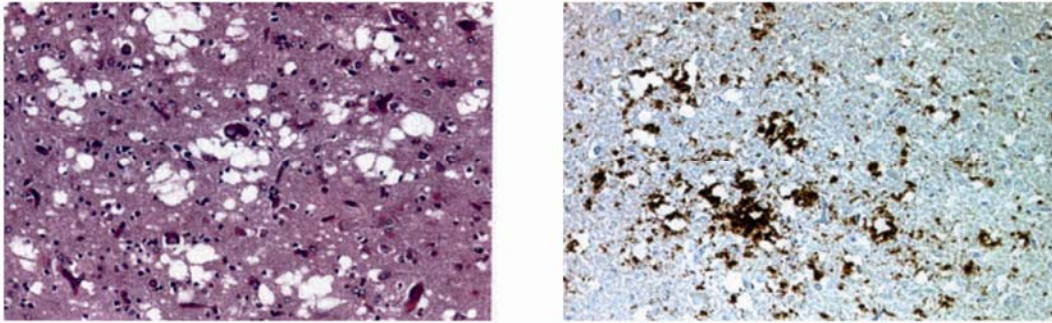


Abbildung 1: Gewebeproben aus dem frontalen Cortex eines CJD Patienten. **Links:** Anfärbter Gewebequerschnitt. Deutlich sind Vakuolen zu erkennen, die zu der schwammartigen Gewebeauflockerung führen. **Rechts:** Ablagerungen des Prionoproteins in Form von amyloiden Plaques.⁹

Im Jahre 1986 wurde zum ersten Mal über die bovine Form der TSEs berichtet, die hiermit in den Blickpunkt der Öffentlichkeit rückten. BSE wurde sehr bald mit der Fütterung von Tiermehl, das aus *scrapie* infizierten Schafen hergestellt wurde, in Verbindung gebracht, da sich im Gehirngewebe der infizierten Rinder *scrapie* ähnliche Proteinablagerungen nachweisen ließen.¹⁵⁻¹⁷

Das Auftreten einer neuen Form der CJD im Jahr 1996 in Großbritannien, brachte die TSEs erneut in die Schlagzeilen.¹⁸ Diese Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD), die mit dem Verzehr von BSE infiziertem Rindfleisch zusammenhängen könnte, unterscheidet sich vor allem darin, dass sie eine wesentlich kürzere Inkubationszeit aufweist und vor allem jüngere Patienten betrifft.^{19;20}

1.1.2 Der Erreger

Über die Natur des Erregers der TSE wurde lange Zeit und wird zum Teil noch heute, kontrovers diskutiert.²¹⁻²⁵ Die beiden wichtigsten Theorien sind die Virus-Theorie, die von einem „langsamen Virus“ als Erreger ausgeht²⁶⁻²⁹ und die Protein-*only*-Theorie, die besagt, dass der Erreger nur aus einem Protein besteht.^{5;30;31}

Die ersten Untersuchungen, die den Erreger identifizieren sollten, wurden in den sechziger Jahren unter anderem von Alper *et al.* durchgeführt. Ihre Untersuchungen zeigten, dass die Infektiosität des Erregers auch nach einer UV-Bestrahlung oder der Behandlung mit DNA degenerierenden Chemikalien erhalten blieb.³²⁻³⁴ Gegen ein Virus als Erreger spricht außerdem, dass die Größe des infektiösen Partikels nur 20 kDa beträgt und ein Virus eine erheblich höhere Masse aufweisen würde.³⁵ Basierend auf diesen Ergebnissen wurde 1967 von Griffith erstmals die Vermutung geäußert, dass es sich bei dem Erreger um ein Protein handelt, das im Krankheitsfall durch ein fehlgeschaltetes Gen aktiviert wird.³⁰ Dieses Protein konnte jedoch erst 1982 aus TSE infizierten Gewebeproben isoliert werden.³⁶ Prusiner

formulierte daraufhin die Prion-Theorie (*proteinacious infectious only*), nach der dieser Erreger nur ein Protein ist, für die er 1997 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.^{5;31} Experimente, in denen die Infektiosität durch anti-Prion Antikörper oder proteindenaturierende Reagenzien herabgesetzt wurde, bestätigten Prusiners Theorie.³⁷⁻³⁹ Weitere Beweise für die Richtigkeit Prusiners Theorie wurden erbracht, als nachgewiesen werden konnte, dass *PrP-knock-out* Mäuse, nicht mit TSE infiziert werden konnten.⁴⁰⁻⁴²

Der Übertragungsweg ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es konnte nachgewiesen werden, dass im Falle einer peripheren Infektion zunächst das Lymphgewebe infiziert wird, lange bevor das Zentralnervensystem befallen wird.⁴³⁻⁴⁹ Dieser Verlauf konnte später auch im Falle einer oralen Infektion von *Odocoileus hemionus* nachgewiesen werden.⁵⁰

Die Theorie von Griffith ging von einem fehlregulierten Gen aus, das im Krankheitsfall angeschaltet würde. Entsprechend groß war die Überraschung, als das prionkodierende Gen in allen untersuchten Spezies gefunden wurde und es sich herausstellte, dass dieses dauerhaft exprimiert wurde. Sowohl im gesunden, als auch im TSE infizierten Fall wurde das selbe Gen exprimiert. Es mussten also posttranslationale Effekte für die Krankheit verantwortlich sein.⁵¹⁻⁵³ Um die beiden Proteinspezies zu unterscheiden, wurden für die native Form die Bezeichnung zelluläres Prionprotein (PrP^{C}), für die fehlgefaltete, pathogene Form die Bezeichnung *scrapie-like* Prionprotein (PrP^{Sc}) eingeführt.

1.1.3 Struktur des Prionproteins

Das Prionprotein ist ein 30 kDa großes Membranprotein, das über einen am Ser230 verknüpften Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) in der Zellmembran verankert ist.^{54;55} Es wird unter anderem von neuronalen Zellen, Lymphozyten, dendritischen Zellen und Gliazellen exprimiert.⁵⁶⁻⁵⁹

Erste strukturelle Untersuchungen mittels CD- und IR-Spektroskopie zeigten, dass es sich bei dem zellulären Prionprotein um ein Protein handelt, das reich an α -Helix-Elementen ist, während die fehlgefaltete Variante, das PrP^{Sc} , einen höheren Anteil an β -Faltblattstrukturen aufweist.^{60;61} Ein weiterer Unterschied der beiden Spezies zeigt sich in ihrer Proteasestabilität gegenüber Proteinase K. Das PrP^{C} lässt sich leicht durch Proteinase K abbauen, während das PrP^{Sc} nur bis zum Trp90 abgebaut werden kann.⁶² Zudem ist das PrP^{Sc} unlöslich und liegt in aggregierter Form vor, so dass die Tertiärstruktur bisher nicht aufgeklärt werden konnte. Für das zelluläre humane Prionprotein liegen zwei Röntgenkristallstrukturen vor. Die 2001 von Knaus veröffentlichte Struktur zeigt ein zweifach disulfidverbrücktes Dimer des Proteins, in dem jedoch nur die Sequenz ab Aminosäure 119 aufgelöst werden konnte (Abbildung 2).⁶³ In jüngster Zeit konnte eine monomere Kristallstruktur des humanen Prionproteins erhalten werden, allerdings war hierzu die Kokristallisation mit einem Antikörper nötig.⁶⁴



Abbildung 2: Die Struktur des dimeren, rekombinanten Prionproteins in der *ribbon* Darstellung und als *relaxed*-Aufnahme. Die beiden Polypeptidketten sind in grün bzw. in violett dargestellt. Die Struktur wurde mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.⁶³

Die Struktur des monomeren zellulären Prionproteins in seiner gesamten Sequenz konnte durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (Abbildung 3).⁶⁵

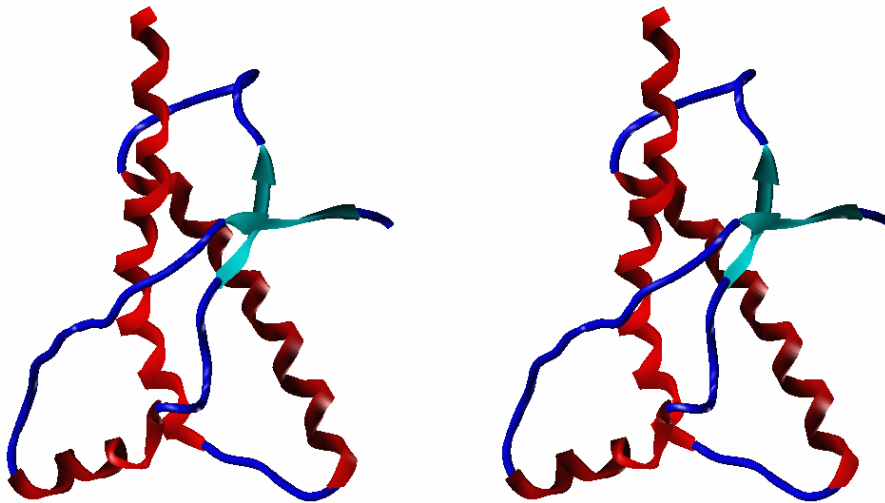


Abbildung 3: NMR-spektroskopisch aufgeklärte Struktur des rekombinanten zellulären Prionproteins in *crossed-eye*-, *ribbon*-Darstellung. **Rot** markiert sind die α -Helices, **cyan** die β -Faltblattstrukturen. Der unstrukturierte Teil des Proteins ist in **blau** dargestellt.⁶⁵

Die NMR-Struktur des PrP^C zeigt einen flexiblen ungefalteten N-Terminus, der von Lys23 bis zum Val121 reicht. Hierauf folgt der globuläre C-Terminus, der drei α -Helices und zwei β -Faltblätter enthält. Die Helices umfassen die Bereiche von ¹⁴⁴Asn-Asn¹⁵³ (Helix-1), ¹⁷⁴Asn-Lys¹⁹⁴ (Helix-2) und von ²⁰⁰Glu-Arg²²⁸ (Helix-3). Die beiden β -Faltblätter reichen von ¹²⁸Tyr-

Gly¹³¹ (β -1) und von ¹⁶¹Val-Tyr¹⁶³ (β -2). Der restliche Teil des Proteins liegt ungefaltet vor. Zudem sind die Helices 2 und 3 durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys179 und Cys214 verbunden. Alle Strukturen haben gemein, dass die Kohlenhydratstrukturen der beiden Glycosylierungsstellen an Asn181 und Asn197 nicht enthalten sind, da die Strukturaufklärung mit dem rekombinant aus *E. coli* exprimierten Prionprotein durchgeführt wurde.

Der ungefaltete N-Terminus weist als Besonderheit eine vierfach wiederholte *octarepeat*-Sequenz (PHGGGWGQ) auf. Diese Histidin enthaltene Region bindet Kupferionen ebenso wie Manganionen.⁶⁶⁻⁷¹ Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass das Prionprotein ein Metallionentransport- oder -speicherprotein ist.^{72;73} Brown *et al.* konnten außerdem zeigen, dass das Prionprotein eine Superoxid-Dismutase-Funktion übernimmt, wenn es in Anwesenheit von Kupfer-(II)-ionen gefaltet wurde, wobei diese Funktion jedoch sehr kontrovers diskutiert wird.^{74;75} Allerdings muss auch erwähnt werden, dass es gerade in der letzten Zeit Hinweise auf weitere Funktionen des Prionproteins gibt, die direkt mit dem Geruchssinn gekoppelt sind.⁷⁶

Im Gegensatz zu der pathogenen Form des Prionproteins (PrP^{Sc}), die sich durch eine hohe chemische und physikalische Stabilität auszeichnet, wird das zelluläre Prionprotein schon durch niedrige Salzkonzentrationen destabilisiert. Dieser Effekt tritt jedoch nicht bei hohen Konzentrationen von Natriumacetat oder Natriumsulfat auf, die das Protein stabilisieren. Dieser Effekt hängt jedoch nicht direkt mit den hohen Salzkonzentrationen zusammen, da beispielsweise hohe Konzentrationen an Natriumchlorid wiederum für eine Destabilisierung des Proteins sorgen. Der Grund für diese Destabilisierung liegt wahrscheinlich in einer ionen-induzierten Veränderung der Salzbrücken in Helix-1.⁷⁷ Diese Helix ist äußerst hydrophob und eine hier erfolgende Strukturänderung kann direkt mit der Konformationsänderung des gesamten Proteins zusammenhängen.⁷⁸

Wie bereits erwähnt, weist das Prionprotein zwei *N*-Typ Glycosylierungsstellen an Asparagin181 und 197 auf, an denen ca. 60 verschiedene *N*-Typ Glycane des Komplex-Typs mit zum Teil hohen Sialysierungsgrad gefunden wurden.^{79;80} Die Kohlenhydratstrukturen haben im Allgemeinen einen stabilisierenden Einfluss auf Proteine.⁸¹ Dieser Effekt konnte auch für das Prionprotein nachgewiesen werden. Durch Mutation der Glycosylierungsstellen von Asparagin zum Glutamin konnte ein unterschiedlicher Glycosylierungsgrad des Prionproteins erreicht werden. In Aggregationsassays konnte nachgewiesen werden, dass die Umfaltungsgeschwindigkeit mit zunehmender Glycosylierung abnimmt.⁸² Ein Grund hierfür könnte in der Abschirmung einer möglichen Umfaltungsregion liegen.

1.1.4 Replikation des PrP^{Sc}

Der Mechanismus der Replikation des pathogenen Prionproteins ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch zwei Modelle, die die Umfaltung des Prionproteins

erklären. Dies ist zum einen das Heterodimer-Modell von Prusiner, zum anderen das Nukleations-Polymerisationsmodell von Lansbury.

Das Heterodimer-Modell geht von einer hohen Energiebarriere aus, die eine spontane Umwandlung des Prionproteins von der zellulären Form (PrP^{C}) in die pathogene Form (PrP^{Sc}) verhindert. Erst durch ein von außen zugefügtes Molekül PrP^{Sc} , das als Templat für die Umfaltung fungiert, kommt es zur Bildung eines Heterodimers. Dieses Heterodimer katalysiert also die Umfaltung des PrP^{C} zum PrP^{Sc} , so dass ein Homodimer aus PrP^{Sc} entsteht. Dieses Homodimer kann dann weitere Moleküle PrP^{Sc} anlagern und es bilden sich amyloide Plaques (Abbildung 4).⁶² Die Umfaltung verläuft in diesem Fall über mehrere Zwischenstufen, bei denen ein als Chaperon fungierendes Protein X beteiligt sein könnte, da die Überwindung der hohen Energiebarriere sonst nicht erklärbar wäre.⁸³

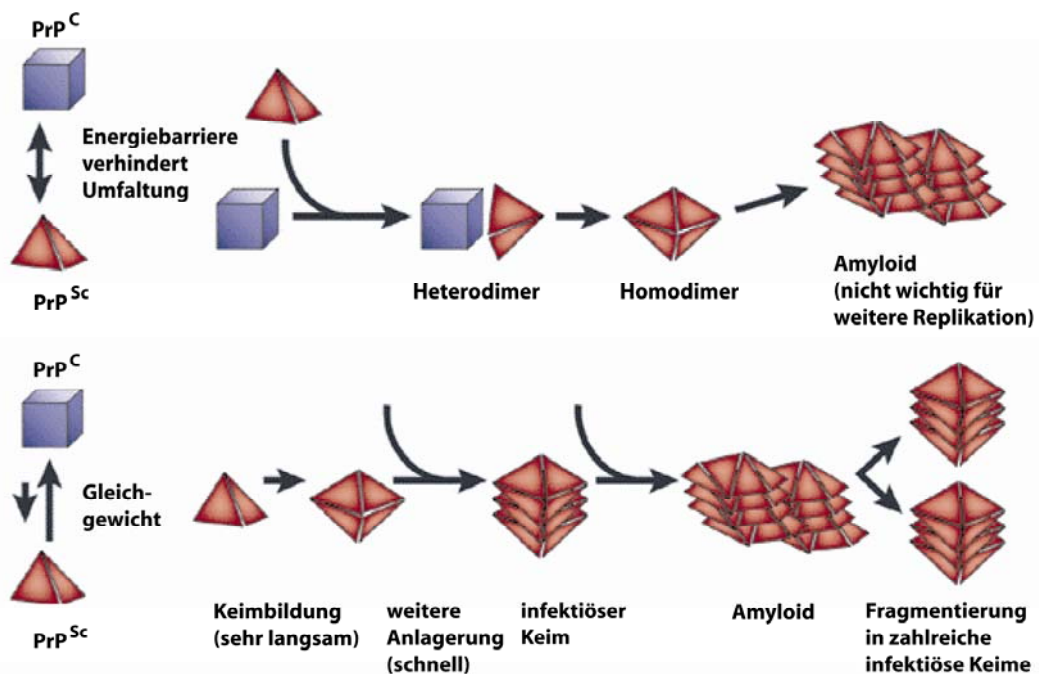


Abbildung 4: Graphische Darstellung der beiden Modelle der Prionreplikation. **Oben:** Das Heterodimer-Modell geht von einer Energiebarriere aus, die die spontane Umwandlung von PrP^{C} in das thermodynamisch stabilere PrP^{Sc} verhindert. Durch einen von außen zugeführten Keim kommt es zur Bildung eines Heterodimers, welches die Umwandlung des PrP^{C} zum PrP^{Sc} katalysiert. **Unten:** Das Nukleations-Polymerisationsmodell geht von einem thermodynamischen Gleichgewicht aus, in dem das PrP^{C} thermodynamisch begünstigt ist. Erst durch die Anordnung mehrerer PrP^{Sc} Moleküle in einem stabilen Keim kommt es zu einer schnellen Rekrutierung weiterer PrP^{Sc} Moleküle. Durch Fragmentierung der gebildeten amyloiden Plaques kommt es zu einer exponentiellen Zunahme dieser Keime.⁹

Das Nukleations-Polymerisationsmodell geht zunächst von einem vorgelagerten thermodynamischen Gleichgewicht zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} aus, das fast vollständig auf der Seite des zellulären Prionproteins liegt. Erst wenn mehrere PrP^{Sc} Moleküle sich zu einem hochgeordneten infektiösen Keim zusammenlagern, kommt es zu einer raschen Anlagerung weiterer PrP^{Sc} Moleküle, die dem Gleichgewicht entzogen und in diesem Keim stabilisiert

werden. Durch weitere Anlagerung von PrP^{Sc} Molekülen bilden sich schließlich amyloide Plaques. Diese Plaques können dann wiederum fragmentieren und dabei weitere infektiöse Keime bilden (Abbildung 4).⁸⁴ Dieses Modell erklärt die langen Inkubationszeiten und den darauf folgenden schnellen Krankheitsverlauf besser, da durch die Fragmentierung der amyloiden Plaques und der hieraus resultierenden exponentiellen Vermehrung der infektiösen Keime eine schnellere Bildung des PrP^{Sc} erklärt werden kann.

Für den letzten unumstößlichen Beweis der Protein-*only*-Theorie müsste es gelingen, aus einer reinen, also zellfreien, Prionproteinprobe entweder durch Zugabe von PrP^{Sc} oder durch eine anderweitig induzierte Umfaltung infektiöses PrP^{Sc} zu erzeugen. Dies gelang Caughey und seine Mitarbeitern, als sie nachweisen konnten, dass durch Zugabe von PrP^{Sc}-Aggregaten die Umwandlung des PrP^C in PrP^{Sc} eingeleitet werden kann.⁸⁵⁻⁸⁸ Allerdings war das aus diesem Ansatz erhaltene Material nicht infektiös.⁸⁹ Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass in den gereinigten PrP^{Sc} Aggregaten weitere Cofaktoren, wie z. B. das postulierte Protein-X, enthalten waren. Um dieses auszuschließen, wurde eine Vielzahl an Konversionsassays etabliert, die von der direkten Konformationsänderung des zellulären Prionproteins ausgeht. Die Umfaltung des Prionproteins wird durch die Destabilisierung der Struktur des PrP^C eingeleitet. Diese Destabilisierung wird z. B. erreicht, indem das PrP^C durch denaturierende Reagenzien teilweise entfaltet wird. Die Umfaltung wird durch den Einfluss eines erhöhten pH-Werts oder durch erhöhten Druck erreicht und führt daraufhin zur Bildung von Fibrillen und amyloiden Plaques.⁹⁰⁻⁹² Ein anderer Ansatz geht von dem natürlich gefalteten Protein aus, das dann unter Zusatz von SDS, auch in niedrigen, nicht denaturierenden Konzentrationen, ebenfalls in die amyloide Form übergeht.⁹³⁻⁹⁵ Es konnte bisher jedoch keine Infektiosität des so erhaltenen Materials nachgewiesen werden.²¹

Ein weiterer Ansatz, der ebenfalls die Konformationsänderung des PrP^C *in vitro* einleitet, beruht auf der oxidativen Schädigung des Proteins, die im direkten Zusammenhang mit der Konformationsänderung steht.⁹⁶ Um diesen oxidativen Stress *in vitro* einzuleiten, werden als reaktive Spezies unter anderem UV-Licht,⁹⁷ Wasserstoffperoxid,⁹⁸ und Kupferionen,⁹⁹ die zum Teil *in situ* erzeugt werden,¹⁰⁰ verwendet. Jedoch konnte auch für das so erzeugte Material bisher keine Infektiosität nachgewiesen werden.

Die bisher einzige Methode zur *in vitro* Generierung von infektiösem PrP^{Sc} ist die von Soto *et al.* entwickelte Methode der *protein misfolding cyclic amplification* (PMCA).¹⁰¹ Das System beruht darauf, dass zu homogenisiertem Hirngewebe eines TSE infizierten Individuums Hirnhomogenisat eines gesunden Individuums zugegeben wird. Die sich nun bildenden PrP^{Sc}-Aggregate werden durch Ultraschall in kleinere Einheiten gespalten, so dass die Umwandlung schneller verläuft. Durch mehrfaches Wiederholen dieser Schritte wird eine starke Verdünnung der Ursprungsprobe erreicht, so dass die Masse des ursprünglichen PrP^{Sc} schon nach wenigen Zyklen nur noch 1% beträgt. Das so erzeugte PrP^{Sc} erwies sich in

Tierversuchen als infektiös, jedoch mit einer 10-100fach niedrigeren Infektiosität im Vergleich zu *in vivo* erzeugten PrP^{Sc}.^{102;103} Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Größe der erzeugten PrP^{Sc}-Aggregate zurückzuführen, da nachgewiesen werden konnte, dass eine Kupplung der durch PMCA erzeugten PrP^{Sc}-Aggregate an Nitrocellulosepartikel die Infektiosität auf das natürliche Niveau steigern konnte.¹⁰⁴ Dies ist letztlich als Beweis für die Gültigkeit der Protein-*only*-Hypothese anzusehen.

1.1.5 Therapie von TSE

Es handelt sich bei den Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien um eine Erkrankung handelt, die von einer Konformationsänderung des Prionproteins hervorgerufen wird. Aus diesem Grund können bekannte Wirkstoffe, wie z. B. Antibiotika oder Hormone, nicht eingesetzt werden. Die Ursache der Konformationsänderung liegt in der Interaktion zwischen dem PrP^{Sc} und dem PrP^C. Für eine wirksame Therapie müsste dieser Protein-Protein-Kontakt unterbunden oder die Struktur des PrP^C stabilisiert werden. Bisher gibt es eine Reihe von potentiellen Wirkstoffen, die die Bildung von PrP^{Sc} unterbinden oder zumindest verlangsamen.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Es zeigte sich, dass unter anderem sulfonierte Farbstoffe wie z. B. Congo Rot an das Prionprotein in der PrP^{Sc}-Konformation binden und so die Neubildung weiterer PrP^{Sc}-Moleküle verhindern. Dies konnten *in vivo* Studien mit Neuroblastom-Zellen zeigen.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Des Weiteren konnten Polyanionen, wie z. B. das Pentosan Polysulfat, die ebenfalls an das PrP^{Sc} binden die Inkubationszeit einer TSE Infektion im Mausmodell signifikant verlängern.^{111;112} Ebenso konnten Polyamine die PrP^{Sc} Konzentration in Neuroblastom-Zellen senken.¹¹³ Das Erreichen einer spezifischen Bindung ist bei derartigen polyanionischen Verbindungen jedoch schwierig.

Eine weitere Substanzklasse, die *in vitro* die PrP^{Sc}-Bildung verhindern können, sind die Phtalocyanine und Porphyrine.¹¹⁴ Für diese Substanzklasse konnte außerdem auch eine *in vivo* Aktivität im Mausmodell nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, dass durch die Gabe dieser Substanzen zum Zeitpunkt der Infektion der Krankheitsverlauf verlangsamt werden konnte.¹¹⁵

Ein ebenfalls vielversprechender Ansatz die PrP^{Sc}-Konzentration zu verringern und so eine passive Immunisierung zu erreichen, ist eine Antikörpertherapie. So konnte die Infektion von Zellkulturen durch die Zugabe eines monoklonalen anti-PrP-Antikörpers verhindert werden.^{37;39} Auch im Tiermodell waren diese Antikörper erfolgreich, sofern sie direkt nach der Infektion verabreicht wurden. Nach dem Auftreten von klinischen Symptomen hatten die Antikörper jedoch keinen Effekt mehr. Dies liegt möglicherweise an dem niedrigen Level an Antikörpern, die das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke erreichen.¹¹⁶

Obwohl Peptide unter anderem wegen ihrer schlechten Bioverfügbarkeit und der schnellen Metabolisierung keine besonders geeigneten Wirkstoffe sind, wird versucht die Protein-Protein-Wechselwirkung durch Peptide zu unterbinden, da diese unter anderem leicht herstellbar sind und im Regelfall eine geringe Toxizität aufweisen. Hier wurden verschiedene Peptidsequenzen untersucht, von denen mehrere *in vitro* die PrP^{Sc}-Bildung verhinderten.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Allerdings zeigten *in vivo* Studien, dass das Proteinfragment 106-126 aufgrund der Bildung von Membrankanälen cytotoxisch ist.^{120;121} Soto *et al.* gelang zudem die Entwicklung der sogenannten *β-sheet-breaker* Peptide, die teilweise in der Lage waren PrP^{Sc} *in vitro* wieder in das zelluläre Prionprotein PrP^C zurück zu falten.¹²² Insgesamt sind eine Reihe von Peptidsequenzen in diesem Zusammenhang patentrechtlich geschützt.¹²³⁻¹²⁷

Abschließend bleibt zu bemerken, dass es bisher nicht gelungen ist, eine Heilung von TSE infizierten Individuen zu erreichen. Für die weitere Erforschung von potentiellen Wirkstoffen ist die Untersuchung der Interaktion der beiden Proteinkonformere und potentiellen Wirkstoffen von großer Bedeutung.

1.2 Methoden

1.2.1 Peptidsynthese

Die Synthese von Peptiden kann unter anderem auf biochemischen Wege erfolgen. Diese Methode, die besonders für Polypeptide geeignet ist, erfolgt unter der Verwendung von Enzymen oder bakteriellen Expressionssystemen.^{128;129} Für die Synthese von Oligopeptiden eignet sich besonders die chemische Synthese, auch wenn diese wegen der verschiedenen funktionellen Gruppen der Aminosäuren nicht trivial ist und eine entsprechende Schutzgruppenstrategie erfordert.

Eine erhebliche Vereinfachung der chemischen Peptidsynthese konnte durch die von Merrifield entwickelte Festphasenpeptidsynthese und deren spätere Automatisierung erreicht werden.^{130;131} Bei dieser Methode wird das Peptid zu Beginn der Synthese kovalent an ein Polymer gebunden. Hierdurch wird die Reinigung nach einzelnen Syntheseschritten stark vereinfacht, da nicht umgesetzte Reagenzien und Nebenprodukte durch einfaches Waschen des Polymers entfernt werden können, ohne größere Verluste der Ausbeute zu erleiden.

Die Synthese des Peptids erfolgt in mehreren Zyklen, die sich für jede zu kuppelnde Aminosäure wiederholen. Die funktionellen Gruppen der Seitenketten sind hierbei mit säurelabilen Schutzgruppen blockiert, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Die Aminogruppe wird meist durch die Fmoc-Schutzgruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) blockiert, die unter leicht basischen Bedingungen abgespalten werden kann (Abbildung 5).^{132;133} Zudem kann die Ausbeute eines jeden Kupplungsschrittes UV-spektroskopisch bestimmt werden. Hierzu wird die Menge des gebildeten Dibenzofulvens über die Absorption bei $\lambda = 302$ nm bestimmt.

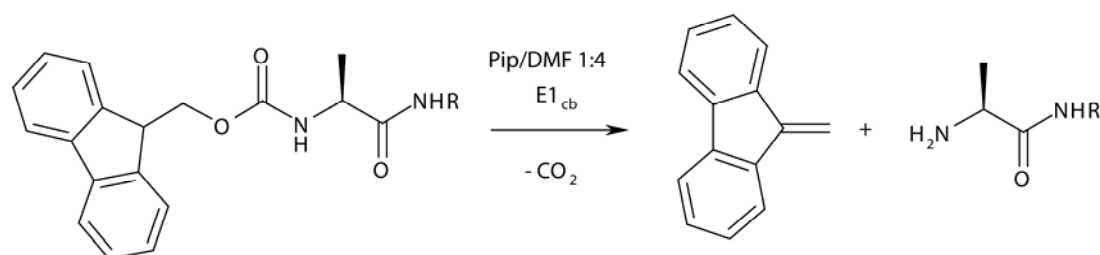


Abbildung 5: Mechanismus der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Unter leicht basischen Bedingungen wird zunächst in einem E1_{cb}-Mechanismus das Proton des Fünfrings abgespalten. Das entstehende resonanzstabilisierte Anion spaltet dann unter Bildung eines Carbamats Methylenefluoren ab. Das Carbamat decarboxyliert daraufhin zum freien Amin.

Die Kupplung der Aminosäuren erfolgt entgegen der biologischen Synthese vom C- zum N-Terminus des Peptids. Um die Kupplung mit guten Ausbeuten durchführen zu können, ist die Verwendung von Aktivatoren nötig, die die Reaktivität der Säurefunktion der Aminosäure durch die Bildung eines Aktivesters erhöhen. Ohne diese Aktivatoren würde es nur zu einer

Säure-Base-Reaktion zwischen Aminogruppe und Carboxylgruppe kommen.¹³⁴ Die früher verwendeten Aktivatoren, wie z. B. DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) wurden durch neuere Aktivatoren, wie z. B. TBTU und HATU ersetzt, die sich durch eine höhere Aktivität und geringere Racemisierungsraten auszeichnen.¹³⁵⁻¹³⁷ Die höhere Aktivität dieser Aktivatoren liegt darin, dass nicht mehr der Aktivester die reaktive Spezies ist, sondern ein *O*-Acyluroniumkation (Abbildung 6).¹³⁸ Die treibende Kraft der Reaktion ist dabei die Bildung von Tetramethylharnstoff.

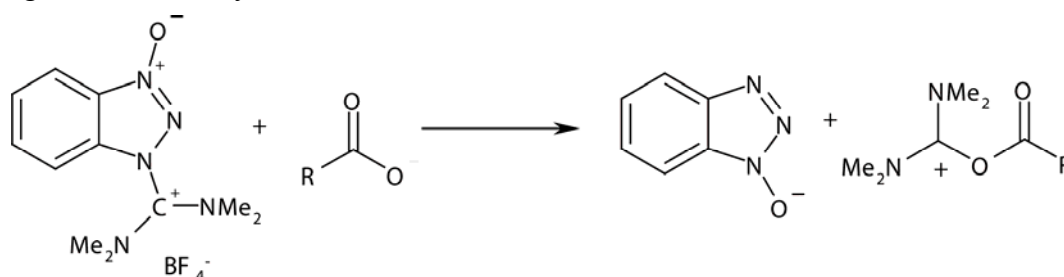


Abbildung 6: Postulierter Mechanismus der Aktivierung der Aminosäure durch TBTU. Es bildet sich zunächst ein *O*-Acyl-Uroniumion, das dann mit der Aminogruppe weiter zum Amid reagiert.

Nach dem erfolgten Kupplungsschritt ist die Blockierung der nicht umgesetzten Aminogruppen nötig, um die Entstehung von Deletionspeptiden zu verhindern und so eine einheitliche Sequenz zu gewährleisten. Diese Blockierung wird durch die Acetylierung der Aminofunktion unter Einsatz von Essigsäureanhydrid erreicht.

Am Ende der Synthese wird das entstandene Peptid sowie die Schutzgruppen der Seitenketten durch TFA (*trifluoroacetic acid*) abgespalten. Hierbei wird Tri-*iso*-propylsilan (TIPS) als *scavenger* verwendet, um intermediär auftretende Kationen abzufangen.¹³⁹

Einen besonderen Fall der Peptidsynthese stellt die Synthese von Glycopeptiden dar. Da die biochemische Synthese von Glycopeptiden durch posttranslationale Modifikation des Peptids erfolgt, ist eine einheitliche Glycosylierung nur schwer zu erreichen.¹⁴⁰ Die chemische Synthese der Glycopeptide ist daher das Mittel der Wahl, obwohl die Synthese der verwendeten Glycosylaminosäuren aufwendig ist und die bei der Kupplung auftretenden Nebenreaktion die Ausbeuten verringern.^{141;142} Für die Synthese von *N*-Typ Glycopeptiden wird meist ein Asparaginbaustein verwendet, an dessen γ -Amidgruppe Chitobiose gebunden ist, da die Chitobiose die erste Einheit der *N*-Typ Glycosylierung darstellt und so als Modellsaccharid dienen kann. Die Synthese dieses Bausteins geht von der Chitobiose aus, deren Hydroxylgruppe an dem anomeren C-Atom entweder zunächst in ein Azid überführt und anschließend zum Amin reduziert wird, oder mit Hilfe von Ammoniumhydrogencarbonat direkt aminiert wird. Eine weitere Möglichkeit verläuft über die Bildung eines Ammonium-carbamats, welches dann in das Amin überführt wird.¹⁴³ Dieses Amin kann dann mit TBTU an Aspartats zum fertigen Baustein gekuppelt werden.

1.2.2 Rekombinante Expression von isotopenmarkierten Proteinen

Die rekombinante Expression von Proteinen durch Überexpression in *E. coli* ist ein Standardverfahren der Biochemie. Hierbei werden in die *E. coli*-Zelle Plasmide transformiert, in welche die DNA-Sequenz des jeweiligen Proteins kloniert wurde. Zusätzlich enthält das Plasmid neben Antibiotika-Resistenzgenen, die für die Selektion der transformierten Bakterien notwendig sind, das *Lac*-Operon. Das *Lac*-Operon stellt hierbei den molekularen Schalter dar, der durch die Zugabe von *Iso*-propyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Expression des gewünschten Proteins einleitet. IPTG selbst ist ein nicht metabolisierbarer Induktor des *Lac*-Operon, so dass die Konzentration über die Dauer der Expression konstant bleibt. Dies garantiert eine hohe Expressionsrate des gewünschten Proteins. Die Isolierung und Reinigung des Proteins erfolgt nach Lyse der *E. coli*-Zellen z. B. durch Säulenchromatographie.¹⁴⁴

Für die Aufklärung von Proteinstrukturen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mittels NMR-Spektroskopie ist eine Isotopenmarkierung der Proteine nötig, da die benötigten Isotope (^2H , ^{13}C , ^{15}N) nur in geringer natürlicher Häufigkeit vorhanden sind. Die Markierung der Proteine mit Deuterium gelingt durch den Einsatz von Deuteriumoxid im Kulturmedium relativ leicht.¹⁴⁵ Die Markierung der Kohlenstoff- und Stickstoffisotope hingegen ist wesentlich schwieriger und vor allem kostenintensiver. Für die ^{13}C -Markierung wird im Allgemeinen ^{13}C -Glucose oder ^{13}C -Acetat verwendet, während für die ^{15}N -Markierung $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ oder $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet wird.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Um eine vollständige Markierung des Proteins zu erhalten, dürfen keine weiteren Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen vorhanden sein. Die Nährmedien werden daher auch als Minimalmedien bezeichnet, da keine leicht zugänglichen Aminosäurequellen für die Proteinsynthese vorhanden sind und daher alle Aminosäuren *de novo* synthetisiert werden müssen. Dies führt zu einem schlechteren Wachstum der *E. coli*-Zellen und damit zu einer schlechteren Proteinausbeute im Vergleich zu den nicht isotopenmarkierten Proteinen.

1.2.3 NMR-spektroskopische Methoden

Die NMR-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten Verfahren für das *screening* von Substanzbibliotheken und die Charakterisierung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen entwickelt.¹⁴⁹ Die beiden wichtigsten Verfahren sind das *chemical shift mapping* und die Sättigungstransfer-Differenz NMR-Spektroskopie.

1.2.3.1 *Chemical shift mapping*

Für die Aufklärung von Bindungsereignissen kann unter anderem die Veränderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale verwendet werden (*chemical shift*

mapping).¹⁵⁰ Bindet ein Ligand an den Rezeptor, so kommt es zu einer Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale, die in der Nähe der Bindungsregion liegen. Dieser Effekt wird ausgenutzt, um nicht nur qualitativ das Bindungsereignis nachzuweisen, sondern auch um ebenfalls die an der Bindung beteiligten Aminosäuren des Proteins zu identifizieren. Hierdurch kann die Bindungstasche eines Liganden auf dem Rezeptor aufgeklärt werden. Die Zuordnung anhand von Protonenspektren erweist sich hierbei jedoch als kaum handhabbar, da die Zuordnung der Protonensignale, die eine Verschiebung aufweisen, zu den entsprechenden Aminosäuren wegen der Signalüberlappung schwierig ist.¹⁵¹ Um dieses Problem zu umgehen, werden heteronuklear gekoppelte Spektren aufgenommen, bei denen das Protein entweder ¹³C oder ¹⁵N markiert ist.¹⁴⁹ Für die Aufklärung der Bindungsregion wird zunächst ein ¹H,¹⁵N-HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) Spektrum des Proteins aufgenommen und die Signale der Amidprotonen den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet. Anschließend wird das Experiment unter gleichen Bedingung wiederholt, allerdings ist nun der Ligand oder eine Ligandbibliothek der Probe beigefügt. Aus dem Vergleich beider Spektren erhält man nun die Verschiebung der Amidsignale und hieraus die Bindungsregion.¹⁵² Für die Identifizierung der beteiligten Aminosäurereste ist jedoch die vollständige Aufklärung der Resonanzsignale des Proteins nötig, weshalb diese Methode sich auf kleinere Proteine im Bereich von < 30 kDa beschränkt. Allerdings gibt es in neuerer Zeit auch Ansätze, in denen durch selektive ¹³C-Markierung einzelner Aminosäuren oder der selektiven ¹³C-Markierung einzelner Seitenkettengruppen die Spektren vereinfacht werden konnten, so dass mittlerweile auch größere Proteine für dieses System geeignet sind.^{153;154}

1.2.3.2 Sättigungstransfer-Differenz NMR-Spektroskopie

Während mit dem Verfahren des *chemical shift mappings* die Bindungsregion eines Liganden auf dem Rezeptor aufgeklärt werden kann, wird keine Aussage über die Bindungseigenschaften des Liganden selbst erhalten. Um die Bindungseigenschaften von der Seite des Liganden aufzuklären, bedient man sich der Technik der Sättigungstransfer-Differenz (STD) NMR-Spektroskopie. Mit dieser Methode lassen sich mit einer geringen Proteinmenge zum einen Substanzbibliotheken auf mögliche Liganden untersuchen, zum anderen können Bindungs epitope des Liganden auf atomarer Ebene aufgeklärt werden und sogar die thermodynamischen Dissoziationskonstanten (K_D) der Liganden bestimmt werden.^{151;155;156}

Für die STD NMR-Spektroskopie werden die spektroskopischen Eigenschaften von Makromolekülen ausgenutzt. Zum einen zeigen Makromoleküle mit einer Masse größer als 10 kDa das Phänomen der Spindiffusion, die dazu führt, dass die Magnetisierung schnell über das gesamte Molekül verteilt wird.¹⁵⁷ Zum anderen kommt es durch die kurzen transversalen

Relaxationszeiten (T_2 -Relaxation) zu einer hohen Linienbreite der Protonensignale. Aus diesem Grund lassen sich Protonenfrequenzen des Proteins durch Einstrahlung einer Serie von Gauss-Pulsen auch außerhalb des normalen ^1H -Resonanzbereichs sättigen, während die Resonanzen des Ligand nicht gesättigt werden. Die so erzielte Sättigung verteilt sich dann aufgrund der Spindiffusion schnell über das gesamte Molekül. Bindet nun ein Ligandmolekül an den Rezeptor, so wird die Magnetisierung des Proteins auf den Liganden übertragen. Der Ligand diffundiert aus der Bindungstasche heraus und kann somit in Lösung detektiert werden. Molekülgruppen, die während der Bindung in enger Nachbarschaft zum Rezeptor standen, zeigen eine höhere Sättigung als solche, die weiter vom Rezeptor entfernt waren. Die teilweise Sättigung der Signale in diesem als *on-resonance* bezeichneten Experiment, führt nun zu einer verminderten Signalintensität im Vergleich zu dem sogenannten *off-resonance* Experiment, bei der ein Sättigungspuls außerhalb der Protonenresonanzsignale eingestrahlt wird. Die Differenz von *on-resonance* und *off-resonance* Spektrum führt zu dem STD Spektrum, das nun ausschließlich jene Signale des Liganden zeigt, die mit dem Rezeptor in Wechselwirkung getreten sind (Abbildung 7). Signale des Proteins, die zum Teil ebenfalls im Differenzspektrum auftreten, werden mit einem $T_{1\rho}$ -Filter unterdrückt. Aus der relativen Sättigung der einzelnen Protonen des *on-resonance* Spektrums im Vergleich zum *off-resonance* Spektrum kann dann das Bindungsepitop erstellt werden.

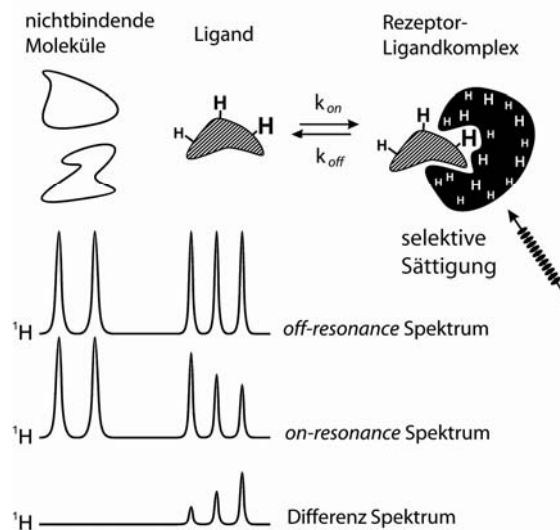


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Prinzips der STD NMR-Spektroskopie. Durch die selektive Sättigung des Rezeptors im *on-resonance* Experiment wird Magnetisierung vom Rezeptor auf den Liganden übertragen, so dass die Signalintensität in diesem Spektrum verringert ist. Protonen, die einen geringen Abstand zum Rezeptor aufweisen, werden stärker gesättigt als solche, die weiter entfernt sind. Das Differenzspektrum, das durch Subtraktion des *on-* vom *off-resonance* Spektrum erzeugt wird, zeigt die Signale der an der Bindung beteiligten Protonen. Nichtbindende Moleküle werden nicht gesättigt und zeigen daher auch keine Signale im Differenzspektrum.¹⁵¹

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten ist die Aufnahme von mehreren STD-Experimenten bei unterschiedlicher Ligandkonzentration notwendig. Aus den so gewonnen

prozentualen STD-Effekten wird der STD-Amplifikationsfaktor ($STD_{Ampl.}$) berechnet (Gleichung 1), der den Durchsatz an Ligandmolekülen berücksichtigt.

$$STD_{Ampl} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} * \frac{[L]_{total}}{[P]_{total}}$$

Gleichung 1: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors ($STD_{Ampl.}$). Mit I_0 = Signalintensität des *off-resonance* Spektrums, I_{sat} = Signalintensität des *on-resonance* Spektrums, $[L]_{total}$ = Gesamtkonzentration des Liganden und $[P]_{total}$ = Gesamtkonzentration des Proteins.

Für die Berechnung der thermodynamischen Dissoziationskonstante (K_D) wird nun der STD-Amplifikationsfaktor gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Die so erhaltene Kurve kann dann nach dem *one-site-binding* Modell (Gleichung 2) angefüttet und der K_D -Wert erhalten werden.

$$STD_{Ampl} = \frac{STD_{Ampl,max} * [L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 2: Berechnung des K_D -Wertes nach dem *one-site-binding* Modell. $STD_{Ampl.}$ = STD-Amplifikationsfaktor, $[L]$ = Konzentration des Liganden, $STD_{Ampl,max.}$ = Gleichgewichtswert des STD-Amplifikationsfaktor bei unendlich hoher Ligandkonzentration und K_D = thermodynamische Dissoziationskonstante.

Die STD NMR-Spektroskopie ist auch deshalb so ein leistungsfähiges Verfahren, weil es sich nicht nur auf den Einsatz von kleinen und isolierbaren Proteinen beschränkt. Durch die Weiterentwicklung der STD NMR-Spektroskopie zur STDD (Sättigungstransfer Doppeldifferenz-) NMR-Spektroskopie lassen sich nun sogar Bindungsstudien an Transmembranproteinen, die für die Wirkstoffentwicklung von enormer Wichtigkeit sind, innerhalb der intakten Zelle durchführen.¹⁵⁸

1.2.4 MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente

Für die Aufklärung von Bindungsregionen auf Proteinen, von denen weder eine Röntgenkristallstruktur noch eine NMR-spektroskopische Struktur vorliegt, hat sich in den letzten Jahren eine massenspektrometrische Methode etabliert, die auf dem Vergleich der Austauschraten von Amidprotonen des Proteins gegen Deuterium in Abwesenheit und im gebunden Zustand des Liganden beruht.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Hierzu wird zunächst das Protein ohne den Liganden in deuteriertem Puffer gelöst und zu verschiedenen Zeiten eine Probe entnommen. Diese wird sofort auf 0 °C gekühlt und bis zu einem pH-Wert von 2.5 angesäuert. Dies ist nötig, um den Rücktausch der Deuteronen gegen Protonen auf ein Minimum zu verlangsamen.¹⁶¹ Durch Kühlen der Probenplatte auf -20 °C und einer schnellen Probenpräparation kann die Rücktauschrate weiter gesenkt werden.¹⁶²

Die angesäuerte Proteinprobe wird im Anschluss mit immobilisiertem Pepsin verdaut und die erhaltene Lösung der Proteinfragmente mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Aus den erhaltenen Massen des Massenspektrums kann die Sequenz der erhaltenen Peptide bestimmt werden. Aus dem zeitlichen Verlauf der Massenzunahme der Fragmente wird der prozentuale Deuteriumeinbau berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 8).

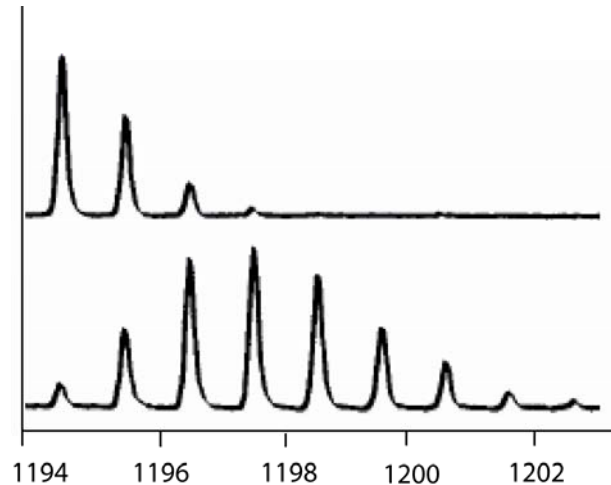


Abbildung 8: Beispielhaftes MALDI-TOF-MS Spektrum für den Proton-Deuterium-Austausch. **Oben:** Masse eines Peptids ohne Deuteriumeinbau. **Unten:** Das gleiche Peptid nach 10 minütigen Deuteriumeinbau. Das Isotopenmuster hat sich deutlich verändert und die Masse des stärksten Signals ist deutlich zu höheren Massen verschoben.¹⁶⁰

Aus dem Vergleich dieser Einbauraten mit der Einbauraten der gleichen Fragmente in Anwesenheit des Liganden kann die Bindungsregion auf dem Protein bestimmt werden, da Proteinbereiche, in denen die Bindung des Liganden stattfindet, wegen der Abschirmung der Oberfläche eine langsamere Einbauraten des Deuteriums zeigen.¹⁶⁰

1.2.5 Oberflächenplasmonen Resonanz

Ein leistungsstarkes Verfahren zur Quantifizierung von Bindungseigenschaften zwischen Ligand und Rezeptor basiert auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonen Resonanz.

Im Falle der optischen Totalreflektion an einer Grenzfläche zweier Medien unterschiedlicher optischer Dichte entsteht ein evaneszierendes Feld. Ist zudem ein dünner Streifen eines leitenden Materials, z. B. ein Metallfilm, an der Grenzfläche des optisch dichteren Mediums aufgebracht, so kommt es unter einem bestimmten Einfallswinkel zur Anregung von Oberflächenplasmonen, die das evaneszierende Feld verstärken.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Das Auftreten dieser Oberflächenplasmonen Resonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) erzeugt wiederum eine Abschwächung der Lichtintensität. Diese Abschwächung, die als Dunkelfeld bezeichnet wird, tritt nur bei einem bestimmten Winkel auf. Durch eine Änderung der optischen Dichte ändert sich daher auch der Winkel bei dem das Dunkelfeld auftritt.

Dieses Prinzip macht sich das SPR-System der Firma Biacore[®] zunutze. Es basiert auf einem Sensorchipsystem, mit dem Bindungsereignisse zwischen Ligand und Rezeptor in

Echtzeit untersucht werden können.¹⁶⁷ Diese Methode beschränkt sich nicht nur auf Protein-Ligand-Interaktion. Es können auch Interaktionen mit Viren, Bakterien oder Zellen untersucht werden.^{168;169}

Der Sensorchip besteht aus einem Glaskörper, der mit einer dünnen Goldschicht versehen ist und das optisch dichtere Medium darstellt. Auf dieser Oberfläche wird einer der Bindungspartner immobilisiert. Hierfür sind je nach verwendetem System verschiedene Möglichkeiten vorhanden. Am häufigsten wird die kovalente Bindung an eine Dextranmatrix verwendet.¹⁷⁰ Das optisch dünnere Medium stellt der gelöste Bindungspartner dar, der in einer Flusszelle über den immobilisierten Bindungspartner geleitet wird. Im Falle einer Bindung kommt es wegen der Massenzunahme zu einer Änderung der optischen Dichte und daher auch des Winkels unter dem das Dunkelfeld auftritt. Diese Änderung kann detektiert werden und korreliert direkt mit der Menge an gebundenem Ligand. Eine Änderung des Brechungsindex um 0.001 entspricht einer Änderung des SPR-Winkels um 0.1° , wobei die heutigen Geräte in der Lage sind, Winkeländerungen von $1 \cdot 10^{-4}^\circ$ aufzulösen. Die Winkeländerung wird als *response unit* (RU) angegeben, wobei eine Änderung von 1 RU einer Massenzunahme von etwa 1 pg entspricht.

Da durch den gelösten Liganden die Eigenschaften des Lösungsmittels verändert werden, kommt es auch in Abwesenheit von spezifischen Bindungsereignissen zu einer Änderung des SPR-Winkels. Um diesen Effekt auszugleichen, wird parallel zu der Messzelle immer eine Referenzzelle vermessen. Dabei stellt Differenz der beiden erhaltenen Kurven die eigentliche Messkurve dar. Hierbei wird die Differenz der Winkeländerung gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 9).

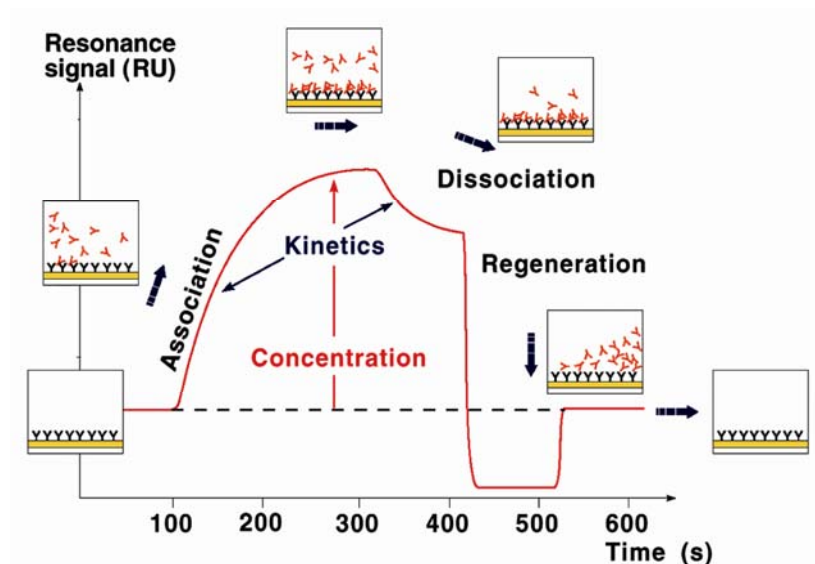


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt ein idealisiertes SPR-Sensorgramm. Das SPR-Signal wird in RU-Einheiten gegen die Zeit aufgetragen. Zunächst erfolgt die Injektion des gelösten Bindungspartners, der an den Rezeptor bindet und dabei einem maximalen Wert zustrebt, bei dem alle Rezeptoren belegt sind (*steady state*). Aus dem Verlauf dieser Kurve kann die Assoziationsgeschwindigkeit k_{on} bestimmt werden. Nach beendeter Injektion folgt die Dissoziationsphase, in der die Liganden wieder vom Rezeptor dissoziieren. Aus dieser Phase des Sensorgramms lässt sich die Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} bestimmen. In der Regenerationsphase werden nicht dissoziierte Bindungspartner mittels einer Regenerationslösung vom Rezeptor gelöst.

Das Sensorgramm unterteilt sich in drei Phasen: die Assoziationsphase, in welcher der Bindungspartner injiziert und durch die Flusszelle geleitet wird und die Bindung des Liganden an den Rezeptor stattfindet, die Dissoziationsphase, in der die Injektion des Liganden gestoppt wird und so die Liganden wieder von den Bindungsstellen dissoziieren und die Regenerationsphase, in der die nicht dissoziierten Moleküle durch Injektion einer Regenerationslösung von dem Rezeptor gelöst werden.

Das erhaltene Sensorgramm liefert die kinetischen Daten der Bindung k_{on} und k_{off} , aus denen die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D berechnet werden kann (Gleichung 3).^{171;172}

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

Gleichung 3: Berechnung der thermodynamische Dissoziationskonstante (K_D). Mit $[A]$ = Konzentration des immobilisierten Bindungspartners, $[B]$ = Konzentration des gelösten Bindungspartners, $[AB]$ = Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes und k_{on} = Assoziationskonstante und k_{off} = Dissoziationskonstante.

Da es bei dieser Methode unter anderem durch die Datenrate des Gerätes, durch Rückbindungseffekte und Wechselwirkungen mit der Referenzzelle zu Fehlern kommen kann, wird der K_D -Wert meist über die Aufnahme von Konzentrationsreihen bestimmt.^{173;174}

Hierbei wird die maximale RU-Antwort der erhaltenen Sensorgramme gegen die Konzentration aufgetragen und die Kurve an das *one-site-binding* Modell angefitet (Gleichung 4)

$$RU = RU_{\max} * \frac{c}{(K_D + c)}$$

Gleichung 4: Berechnung der thermodynamische Dissoziationskonstante K_D nach dem *one-site-binding* Modell. RU = Gleichgewichtswert der SPR-Antwort bei der Konzentration c , c = Konzentration des in Lösung befindlichen Bindungspartners, RU_{\max} = Gleichgewichtswert der SPR-Antwort bei unendlich hoher Konzentration des gelösten Liganden.

Durch die geringen Substanzmengen, die für eine SPR-Messung nötig sind, sowie den breiten Anwendungsbereich, ist die Oberflächenplasmonen Resonanz eine der wichtigsten Methoden für die Charakterisierung von Bindungsereignissen.

1.2.6 Circular Dichroismus

Informationen zur Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen liefert die Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie. Die Methode beruht hierbei auf der Wechselwirkung von circular polarisiertem Licht mit Chiralitätszentren.¹⁷⁵

Im Gegensatz zu linear polarisiertem Licht, bei dem der Feldvektor in einer festen Ebene liegt und die Magnitude oszilliert, ist im Falle von circular polarisiertem Licht die Magnitude konstant und der Feldvektor oszilliert mit fester Winkelgeschwindigkeit um den Wellenvektor. Da die Polarisation als Überlagerung zweier Basispolarisationen gesehen werden kann, ist im Falle des circular polarisierten Lichts das Produkt der beiden Basispolarisationen (links- und rechtsdrehend) linear. Im Falle einer Circular Dichroismus zeigenden Probe wird eine der beiden Komponenten stärker durch die Chromophore absorbiert.^{176;177} Hieraus resultiert dann eine unterschiedliche Amplitude der beiden Basispolarisationen und somit eine ellipsoide Polarisation (Abbildung 10).

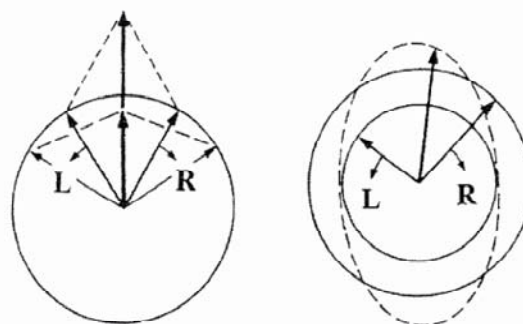


Abbildung 10: Darstellung des CD-Effekts. **Links:** Beide Basisvektoren des circular polarisierten Lichts haben die gleiche Magnitude und erscheinen als linearer Vektor. **Rechts:** Die links- und rechtsdrehende Komponente haben eine unterschiedliche Magnitude, was eine elliptische Polarisation zur Folge hat.¹⁷⁸

Bei der CD-Spektroskopie wird die Differenz der Absorption der beiden Basisvektoren in Abhängigkeit zur Wellenlänge gemessen. Je nachdem, ob die links- oder rechtsdrehende Komponente stärker absorbiert wird, ergibt sich ein positiver oder ein negativer circular Dichroismus. Dies wird als Cotton-Effekt bezeichnet. Der erhaltene Wert der Elliptizität wird in Milligrad (mdeg) angegeben und nach Gleichung 5 in die *mean residue ellipticity* umgerechnet.^{178;179}

$$[\Theta] = \Theta * \frac{M [g/mol]}{10 * c [mol/L] * l [cm] * n}$$

Gleichung 5: Berechnung der *mean residue ellipticity* $[\Theta]$. Θ = gemessene Elliptizität in Milligrad, M = molare Masse in g/mol, c = Konzentration des Analyten, l = Länge der Küvette, die der Lichtstrahl durchdringt und n = Anzahl der Aminosäuren in dem Protein.

Die unterschiedliche Absorption der beiden Komponenten des circular polarisierten Lichts wird im Falle von Proteinen und Peptiden durch die Amidbindung gewährleistet, die in direkter Nachbarschaft des asymmetrischen α -C-Atoms liegt. Aus diesem Grunde werden die CD-Spektren im Regelfall im Fern-UV (180-250 nm) gemessen.^{177;180} Ein weiterer Beitrag kommt durch die Asymmetrie der Sekundärstruktur zustande. Beispielsweise erzeugt die α -Helix als asymmetrische Struktur ebenfalls optisch aktive Chromophore.^{177;180}

In Abbildung 11 sind die unterschiedlichen CD-Spektren der jeweiligen Sekundärstrukturen am Beispiel des Polylysins gezeigt, das je nach Temperatur und pH-Wert unterschiedliche Konformationen annimmt.¹⁸¹

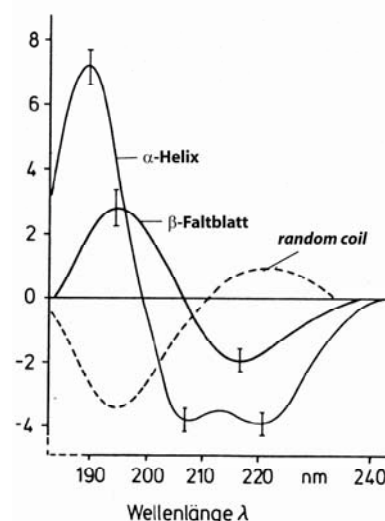


Abbildung 11: CD-Spektrum für die verschiedenen Konformationen von Polylysin. Die α -Helix Konformation wird bei pH 11.1 und Raumtemperatur erhalten. Sie zeichnet sich durch die beiden Minima bei 220 bzw. 208 nm aus. Die Struktur des β -Faltblatts, die durch das Minimum bei 215 nm und das Maximum bei 195 nm charakterisiert ist, wird durch 15 minütiges Erhitzen auf 52°C bei pH 11.1 erhalten. Ist Polylysin in entsalzten Wasser gelöst, so bildet sich die *random coil* Struktur. Diese zeigt ein Maximum bei 220 nm und ein Minimum bei 195 nm.¹⁸¹

Die gemessenen CD-Spektren zeigen die gesamten CD-Effekte aller Sekundärstrukturen eines Proteins und müssen daher durch geeignete Programme mit Einträgen aus Datenbanken verglichen werden. Nur so ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Sekundärstrukturen zu bestimmen. Ein geeignetes Programm stellt zum Beispiel das von Perez-Iratxeta *et al.* entwickelte Programm K2D2 dar.¹⁸²

1.2.7 *Molecular Modeling*

Unter dem Begriff des *molecular modeling* wird die computergestützte Analyse von Molekülstrukturen und intermolekularen Wechselwirkungen verstanden.¹⁸³

Durch die Entwicklung leistungsfähiger Computer ist es mittlerweile möglich, die Molekülstrukturdaten komplexer Systeme, die z. B. aus der Röntgenkristallographie erhalten wurden, zu modellieren. Durch den Einsatz von Kraftfeld basierten Parametern können so die dynamischen Eigenschaften von Molekülen bis hin zu Protein-Protein-Interaktionen berechnet werden. Des Weiteren können Moleküle durch das *molecular docking* Verfahren auf ihre Bindungseigenschaften untersucht werden. Durch dieses Verfahren ist es mittlerweile möglich ganze Substanzbibliotheken auf ihre Bindungseigenschaften *in silico* zu untersuchen, weshalb durch dieses Verfahren kosten- und zeitaufwendige *in vitro* Studien vermieden werden können.¹⁸³

Im Falle des Programms FlexiDock™ handelt es sich um ein *docking* Programm, das auf einem genetischen Algorithmus aufbaut. Dieser Algorithmus nutzt eine der Evolutionstheorie Darwins angelehnten Methodik. Der in der Bindungstasche vorpositionierte Ligand wird mit wenigen Zufallskonformationen versehen und diese Lösungen energetisch verglichen. Die jeweils besten Eigenschaften der jeweiligen Konformation werden dann kombiniert und leicht verändert, um eine neue Generation zu erzeugen. Dieser Kreislauf wiederholt sich, bis es zu keiner weiteren Verbesserung der Ergebnisse mehr kommt oder die maximal erlaubte Anzahl an Generationen erreicht ist. In die Berechnung der Bindungsenergien fließen neben van der Waals und elektrostatischen Wechselwirkungen auch Torsionsenergien ein.¹⁸⁴

Die erhaltenen Ergebnisse liefern für klar definierte Bindungstaschen und kleine Liganden, die wenige Freiheitsgrade aufweisen, gute Ergebnisse. Für die Berechnung von schlecht definierten Oberflächenbindungen, die z. B. bei der Interaktion von Kohlenhydraten mit Lektinen auftreten oder für Liganden, die eine hohe Anzahl an flexiblen Bindungen aufweisen, kann das Programm nur Anhaltspunkte über die Bindungseigenschaften liefern.¹⁸⁴

2 Aufgabenstellung

Der Erreger der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien ist das Prionprotein (PrP), das in zwei verschiedenen Konformationen auftritt. Obgleich der Mechanismus der Konformationsänderung noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, wird davon ausgegangen, dass hierfür eine Wechselwirkung des pathogenen Konformers PrP^{Sc} mit der zellulären Konformation PrP^C nötig ist. Eine Inhibition dieser Wechselwirkung ist ein möglicher Ansatzpunkt für die Therapie der TSE.

B. Claasen konnte in einem *screening* von Octapeptiden aus dem globulären Bereich des Prionproteins zeigen, dass Peptide aus dem Bereich ¹⁴⁹YYRENMHRYPNQVYYR¹⁶⁴ an das Prionprotein binden und dass das Peptid ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ die Konformationsänderung *in vitro* inhibiert.¹⁸⁵ Des Weiteren wurde anhand des Peptids ¹⁹²TTKGENFTET²⁰¹ nachgewiesen, dass die unglycosylierte Form dieses Peptids nicht an das Prionprotein bindet, wohingegen die am Asn¹⁹⁷ mit Chitobiose glycosylierte Variante eine deutliche Bindung an das Prionprotein zeigte. Es liegt daher der Schluss nahe, dass in diesem Falle die Bindung durch die Chitobiose vermittelt wird.¹⁸⁵

Im Rahmen dieser Dissertation soll in einem ersten Teil die Bindungsinteraktion des Peptids ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ mit dem Prionprotein untersucht werden. Hierzu muss zunächst mit Hilfe von ¹H,¹⁵N-HSQC NMR-Experimenten die Bindungsregionen des Peptids ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ auf dem Prionprotein identifiziert werden. Im Anschluss daran sollen die Bindungsbeiträge der einzelnen Aminosäuren der Sequenzen ¹⁴⁹YYRENMHR¹⁵⁶ und ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ durch einen Alaninscan bestimmt werden. Anhand eines Peptids soll zusätzlich das Bindungsepitop auf atomarer Ebene durch STD NMR-Experimente aufgeklärt werden. Aus den erhaltenen Daten sind weitere Analysen der Interaktion unter zu Hilfenahme von *molecular modeling* möglich, die für eine weitere Leitstrukturentwicklung notwendig sind. Zusätzlich sollen die im Rahmen des Alaninscans synthetisierten Peptide in einem *in vitro* Aggregationsassay auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht werden, um die für die protektive Wirkung wichtigen Aminosäuren herauszustellen.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit fokussiert sich auf die Interaktion der Chitobiose mit dem Prionprotein, da es Hinweise auf eine Bindung der Chitobiose an das Prionprotein gibt. Im Falle einer durch SPR nachgewiesenen Bindung, soll durch ¹H,¹⁵N-HSQC NMR-Experimente die Bindungsregion auf dem Prionprotein identifiziert und das Bindungsepitop der Chitobiose unter Verwendung des STD NMR-Verfahrens aufgeklärt werden.

Durch eine geeignete Kombination des Bindungsmotivs vom Peptid und dem der Chitobiose können dann neue Liganden entwickelt werden, die durch die Besetzung zweier Bindungsregionen stärker an das Prionprotein binden und auch die

aggregationsinhibitorischen Eigenschaften des Peptids $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ aufweisen und so eine Weiterentwicklung der Leitstruktur ermöglichen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Rekombinante Expression des Prionproteins in *E. coli*

Als Erreger der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien wird das Prionprotein angesehen, das in zwei verschiedenen Konformationen auftritt.⁵ Obgleich der Mechanismus der Konformationsänderung noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, wird davon ausgegangen, dass hierfür eine Wechselwirkung des pathogenen Konformers PrP^{Sc} mit der zellulären Konformation PrP^C nötig ist. Eine Inhibition dieser Wechselwirkung ist ein möglicher Ansatzpunkt für die Therapie der TSE. Für die Entwicklung solcher Inhibitoren ist die Aufklärung der Bindungsregion und die Untersuchung des aggregationsinhibitorischen Potentials der Liganden zwingend erforderlich.

3.1.1 Expression des humanen Prionproteins (hPrP90-230)

Das für die Aggregationsassays und die MALDI-TOF-MS-H/D Austauschexperimente benötigte humane Prionprotein (hPrP90-230) wurde in Kooperation mit dem AK Prof. Dr. Dr. Betzel, Abteilung für Biochemie der Universität Hamburg, nach einem Standardprotokoll in *E. coli*-Zellen exprimiert.¹⁸⁶ Das Prionprotein codierende Plasmid (pRSET A hsPrP90-230), das zudem eine Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenz enthielt, wurde durch Elektropulstransformation in die *E. coli*-Zellen eingeschleust und die Zellen auf Agar-Platten ausplattiert, die Chloramphenicol und Ampicillin beinhalten. Aus den so selektierten Klonen wurde eine 100 mL Vorkultur in 2YT Medium angesetzt, die als Impfkultur für den 1 L Ansatz verwendet wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1.5 wurde die Proteinexpression durch IPTG (c = 0.4 mM) induziert. Nach dreistündiger Expression wurden die Zellen isoliert und anschließend lysiert. Die Vorreinigung erfolgte durch eine Reihe von Waschschritten mit Puffern unterschiedlicher Guanidiniumhydrochlorid Konzentration. Das so erhaltene vorgereinigte Protein konnte dann über den N-terminalen *His-Tag* an eine Ni-NTA-Säule gebunden und gereinigt werden. Die Faltung des Proteins wurde durch langsamen Pufferaustausch ebenfalls auf der Säule durchgeführt. Die Elution des Proteins erfolgte daraufhin mit 500 mM Imidazol. Für den anschließenden Verdau des *His-Tags* wurde zunächst gegen Tris-Puffer (pH 8.0) dialysiert und anschließend eine Stunde lang mit Thrombin der *His-Tag* abgespalten und nach Inaktivierung und Abtrennung des Thrombin wurde gegen Natriumacetatpuffer pH 5.0 dialysiert und auf eine Konzentration von 3 mg/mL konzentriert. Die Identität des Proteins wurde durch SDS-PAGE überprüft, während die korrekte Faltung mittels CD-Spektroskopie bestätigt wurde. Die Ausbeuten an hPrP(90-230) betragen zwischen 20 und 25 mg pro Liter Kulturmedium.

Im Verlauf der Arbeit kam es zu Komplikationen bei der proteolytischen Abspaltung des *His-Tags*. Nach einem erzwungenen Anbieterwechsel des kommerziell erhältlichen Thrombins war der Verdau nicht mehr möglich. Die erste Vermutung, dass es zu einer Mutation innerhalb der Thrombin-Schnittstelle gekommen sei, konnte nicht bestätigt werden. Auch die Neuklonierung des Proteins brachte keine Besserung. Die Umklonierung auf eine Faktor Xa Schnittstelle gelang ebenfalls nicht. Da sich jedoch im Laufe der Umklonierung zeigte, dass die Aggregationsassays auch mit dem Prionprotein, das den *His-Tag* trägt, identisch verlaufen, wurde auf weitere Versuche der Umklonierung verzichtet und die folgenden Aggregationsassays mit dem *His-Tag*-Prionprotein durchgeführt.

3.1.2 Expression des ^{15}N markierten humanen Prionproteins (hPrP90-230)

Für die Aufklärung der Bindungsregion des Peptids $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (1) und der Chitobiose auf dem Prionprotein mittels $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC *chemical shift mapping* Experimenten musste das Protein vollständig ^{15}N -markiert werden.

Zunächst wurde die Transformation der *E. coli*-Zellen und die Selektion der Klone analog zu der Expression des nicht markierten hPrP durchgeführt. Um eine vollständige Markierung mit ^{15}N zu gewährleisten, musste jedoch das Wachstum der *E. coli*-Zellen und die Proteinexpression in einem ^{15}N -Minimalmedium erfolgen. Das Minimalmedium aus dem Expressionsprotokoll von Zahn *et al.*¹⁸⁶ enthielt neben $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ($c = 18.4 \text{ mM}$) noch eine Mischung verschiedener Vitamine (u. a. Thiamin, Folsäure, Biotin und Riboflavin), führte jedoch in 100 mL Testkulturen nur zu einem linearen Wachstum der Zellen, so dass die Zusammensetzung des Mediums modifiziert werden musste (Abbildung 12).

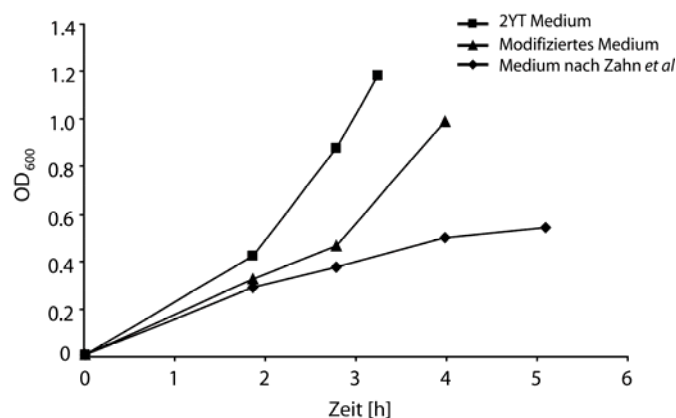


Abbildung 12: Auftragung der optischen Dichte (600 nm) der *E. coli*-Expressionsansätze in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei 37 °C. **Quadrate:** Zell-Wachstum im 2YT Vollmedium. Die Zellen zeigen ein gutes exponentielles Wachstum und erreichen nach 3 h eine OD_{600} von 1.2. **Rauten:** Im Minimalmedium nach Zahn *et al.* wurde ein langsames, lineares Wachstum der Bakterien beobachtet, das bei einer OD_{600} von 0.6 stagniert und daher nicht für die Expression geeignet ist. **Dreiecke:** Das Wachstum der *E. coli*-Zellen im Minimalmedium von Zahn *et al.*, dem zusätzlich noch MgSO_4 und CaCl_2 zugefügt wurden, zeigt erneut einen exponentiellen Verlauf und erreicht nach 4 h eine OD_{600} von 1.0.

Um das Wachstum der Zellen zu verbessern, wurde in einer weiteren 100 mL Testkultur MgSO_4 ($c = 1 \text{ mM}$) und CaCl_2 ($c = 0.1 \text{ mM}$) zu dem Minimalmedium zugegeben.¹⁸⁷ Hierdurch konnte eine deutliche Steigerung der Wachstumsraten der *E. coli*-Zellen erreicht werden (Abbildung 12). Auch wenn das Zellwachstum nicht die Wachstumsraten des Vollmediums erreicht, so wurde doch nach ca. vier Stunden eine OD_{600} von 1.0 erreicht. Diese Wachstumsrate ist ausreichend, um anschließend eine Expression des Proteins in hohen Ausbeuten zu erreichen.

Das für die Experimente benötigte Protein wurde in 1 L des modifizierten Kulturmediums exprimiert. Die Expression erfolgte analog zu der des nicht markierten Prionproteins. Allerdings wurde nach sieben Stunden die Expression mit IPTG ($c = 0.4 \text{ mM}$) induziert, obwohl die OD_{600} nur 0.85 betrug. Dies war nötig, da die verwendeten Antibiotika, insbesondere Ampicillin, mit zunehmender Inkubationszeit bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ degradieren, so dass der erforderliche Selektionsdruck abnimmt und die Zellen folglich das Prionprotein-kodierende Plasmid ausschleusen. Um trotzdem eine ausreichende Menge des Proteins zu erhalten, wurde die Expression über einen Zeitraum von sieben Stunden durchgeführt.

Die Aufarbeitung des Proteins erfolgte analog zu dem nicht markierten Protein. Die anschließende Analyse des erhaltenen ^{15}N -markierten PrPs mittels SDS-PAGE bestätigte sowohl die Identität als auch die Reinheit des Proteins (Abbildung 13).

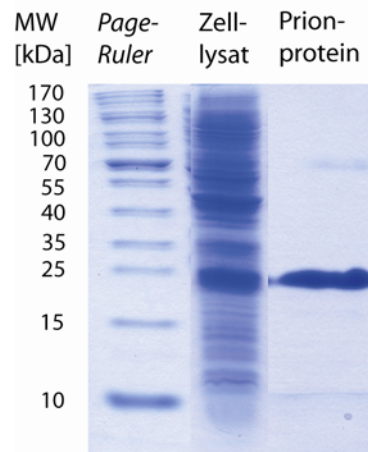


Abbildung 13: SDS-PAGE-Analyse (Coomassie-Färbung) der Expression und Reinigung des ^{15}N -hPrP(90-230). Die linke Spalte zeigt den Molekulargewichtsstandard (PAGE RulerTM). In der mittleren Spalte ist eine Probe des Zellextraktes aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist die starke Bande bei ca. 20 kDa, die dem Prionprotein zuzuordnen ist. Die rechte Spalte zeigt eine Probe des aufgereinigten Proteins. Diese Probe zeigt nur die Bande des Prionproteins.

Es wurden 5 mg des ^{15}N -markierten humanen Prionproteins (90-230) pro Liter Kulturmedium erhalten. Die Ausbeute beträgt nur 20-25% im Vergleich zu dem Ansatz des nicht markierten Proteins. Dies ist auf das geringere Wachstum der Zellen und eine verlangsamte Proteinexpression in dem Minimalmedium zurückzuführen.

3.2 Aufklärung der Peptidbindungsregion auf dem Prionprotein

3.2.1 ^1H , ^{15}N -HSQC *chemical shift mapping* Experimente mit NMHRYPNQ

Die Aufklärung der Bindungsregion des aggregationsinhibitorischen Peptids $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) sollte durch *chemical shift mapping* anhand von ^1H , ^{15}N -HSQC Experimenten erfolgen. Dieses Verfahren, das von Fesik *et al.* entwickelt wurde, basiert auf der Änderung der chemischen Verschiebung der Amid-NH-Gruppen des Proteins im Falle einer Ligandbindung.¹⁵²

Hierzu wurden zunächst ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren des humanen Prionproteins in Abwesenheit des Liganden aufgenommen. Um die erhaltenen Resonanzsignale anhand der von Zahn *et al.* veröffentlichten Daten zuordnen zu können, wurde ein Spektrum unter den gleichen Bedingungen aufgenommen wie in der Literatur beschrieben.⁶⁵ In diesem Experiment betrug die Proben temperatur 293 K. Da jedoch die Bindung des Peptids mit $K_D = 25 \mu\text{M}$ nicht besonders stark ist, wurden zusätzlich noch Spektren bei 285 K und 305 K aufgenommen. Ziel war es die Bindungskinetik so zu verändern, dass stärkere Effekte zu beobachten waren. Die Zuordnung der Signale gelang auch in diesen Spektren anhand der veröffentlichten Daten. Insgesamt konnten jedoch bei keinem der Experimente alle Signale zweifelsfrei zugeordnet werden, da zum Teil Überlagerungen einzelner NH-Signale zu beobachten waren.

Für die Bestimmung der Bindungsregion wurde im Anschluss unter jeweils identischen Bedingungen ein ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des humanen Prionproteins in Anwesenheit des Peptids **1** aufgenommen. Da die Aggregationsinhibitions-Assays bei einem siebenfachen Überschuss des Peptids relativ zum Protein eine deutliche Inhibition der Aggregation zeigten, sollten die ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren bei gleichem Peptidüberschuss aufgenommen werden. Da jedoch die Signalverschiebung dem Mittelwert der einzelnen Resonanzen entspricht, muss eine ausreichende Rezeptorbelegung gewährleistet sein. Um diese berechnen zu können, musste zunächst die Konzentration des gebildeten Protein-Ligand-Komplexes nach Gleichung 6 ermittelt werden, um mit dem so erhaltenen Ergebnis im Anschluss die Rezeptorbelegung berechnen zu können (Gleichung 7).¹⁵¹

$$[PL] = \frac{1}{2} (K_D + [P]_0 + [L]_0) - \sqrt{\frac{1}{4} (K_D + [P]_0 + [L]_0)^2 - [L]_0 [P]_0}$$

Gleichung 6: Berechnung der Konzentration des gebildeten Protein-Ligand-Komplexes $[PL]$. Mit: K_D = thermodynamische Dissoziationskonstante, $[P]_0$ = Gesamtkonzentration Protein, $[L]_0$ = Gesamtkonzentration Ligand.

$$r = \frac{[L]_{\text{gebunden}}}{[P]_{\text{total}}} = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}$$

Gleichung 7: Berechnung der Rezeptorbelegung. Mit: r = Rezeptorbelegung, $[L]_{\text{gebunden}}$ = Konzentration des gebundenen Liganden, $[P]_{\text{total}}$ = Gesamtkonzentration des Proteins, $[PL]$ = Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes, und $[P]$ = Konzentration des freien Proteins.

Im Falle eines siebenfachen Überschusses an Ligand beträgt die Rezeptorbelegung somit 95%. In Abbildung 14 ist die Überlagerung der bei 293 K gemessenen HSQC-Spektren mit und ohne Ligand gezeigt. In der Vergrößerung ist eine eindeutige Signalverschiebung zu erkennen. Die Gründe für die geringe Verschiebung liegen vermutlich in der vergleichsweise schwachen Bindung des Peptids an das Protein.

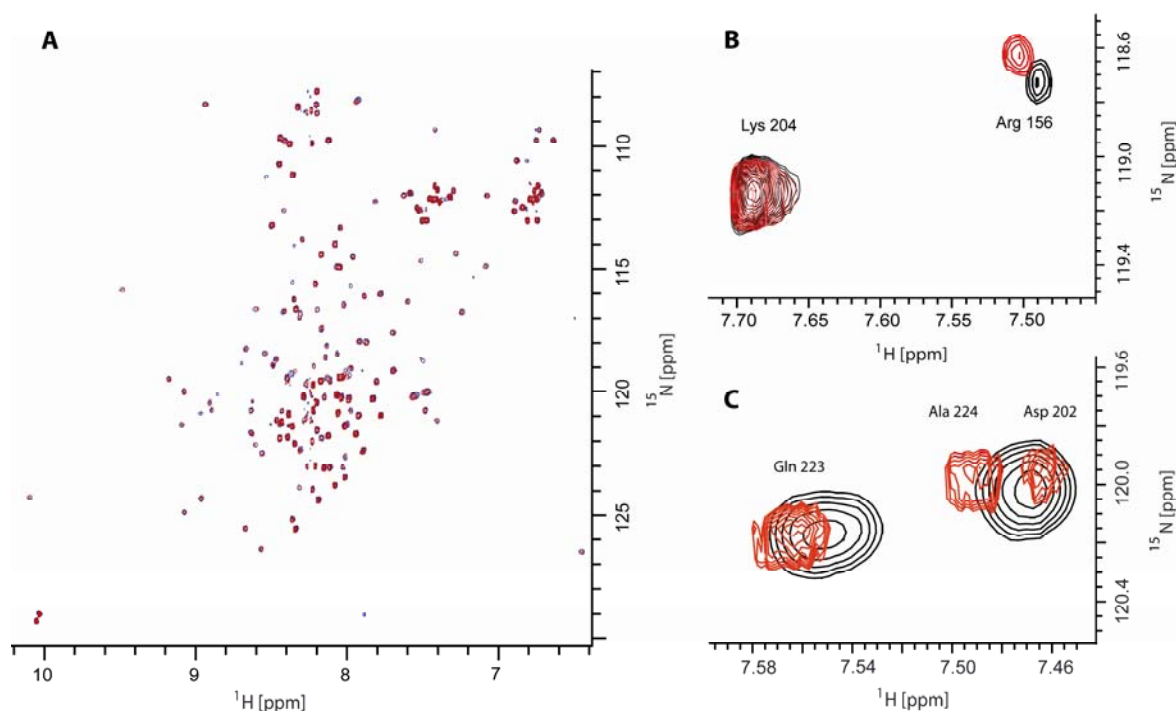


Abbildung 14: Überlagerung der ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren ohne (**schwarz**) und mit zusätzlichem Peptid **1** (**rot**) aufgenommen bei $T = 293$ K. **A:** Die Abbildung zeigt den gesamten Bereich der NH-Protonen. Es ist keine deutliche Signalverschiebung zu erkennen. **B:** Ausschnitt des Spektrums von 7.70-7.40 ppm bzw. 119.4-118.6 ppm. Das Signal des Lys204 zeigt keine Veränderung, während das Signal des Arg156 eine Verschiebung aufweist. **C:** Ausschnitt des Spektrums von 7.58-7.46 ppm bzw. 120.4-119.6 ppm. Im Spektrum ohne Ligand (**schwarz**) überlagern sich die Signale von Asp202 und Ala224. Im Spektrum mit zusätzlichem Peptid **1** verschiebt sich das Signal des Ala224 ebenso wie das Signal des Gln223, während das Signal des Asp202 keine Veränderung zeigt.

Die Auswertung der Resonanzsignale, die eine Verschiebung aufwiesen, erfolgte nach Gleichung 8, mit der die gemittelte chemische Verschiebung der NH-Resonanzsignale berechnet wurde.¹⁵²

$$\Delta\delta(^1H, ^{15}N) [ppm] = \Delta\delta(^1H)[ppm] + 0.2 * (\Delta\delta(^{15}N) [ppm])$$

Gleichung 8: Berechnung der gemittelten Veränderung der chemischen Verschiebung der NH-Resonanzsignale. Mit $\Delta\delta$ = Veränderung der chemischen Verschiebung.

In Tabelle 1 sind die Signale, die eine Veränderung der chemischen Verschiebung zeigen, für die Experimente bei drei verschiedenen Temperaturen zusammengefasst. Als Schwellenwert für eine signifikante Bindung wurde ein $\Delta\delta$ -Wert von 0.01 ppm angenommen, da die beobachteten Veränderungen der Resonanzsignale wegen der relativ schwachen Bindung insgesamt sehr klein waren.

Tabelle 1: Zusammenfassung der beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebung der NH-Resonanzsignale der Amidprotonen bei drei verschiedenen Messtemperaturen. Aufgeführt sind nur Signale, die in mindestens zwei Experimenten eine Veränderung zeigen. Ein $\Delta\delta$ -Wert von 0.01 ppm wurde als Schwellenwert für eine signifikante Veränderung angesehen.

T = 285 K		T = 293 K		T = 305 K	
$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure	$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure
0.0120	129M u 150Y	0.0104	129M u 150Y	0.0117	150Y
0.0118	141F	0.0151	141F	0.0111	141F
0.0215	153N-NH- δ 1	0.0144	153N-NH- δ 1	0.0102	153N-NH- δ 1
0.0215	153N-NH- δ 2	-	-	-	-
0.0193	155H u 190T	0.0280	155H u 190T	0.0283	155H u 190T
0.0293	156R	0.0230	156R	0.0329	156R
0.0137	159N	-	-	0.0144	159N
-	-	0.0140	164R-NH- δ	0.0122	164R-NH- δ
0.0140	166M u 176V	-	-	0.0115	166M
0.0158	171N-NH- δ 1	0.0374	171N-NH- δ 1	-	-
0.0107	193T u 201T	0.0142	193T u 201T	-	-
0.0108	198F	0.0108	198F	-	-
0.0173	210V	-	-	0.0102	210V
-	-	0.0115	217Q	0.0111	217Q
0.0113	217Q-NH- ϵ 1	-	-	0.0101	217Q-NH- ϵ 1
-	-	0.0137	217Q-NH- ϵ 2	0.0115	217Q-NH- ϵ 2
0.0311	220R	0.0211	220R	-	-
0.0330	223Q	0.0330	223Q	0.0222	223Q
0.0184	224A	0.0138	224A	0.0239	224A

Für die Erstellung der Bindungsregion wurden nur solche Signale bewertet, die neben der Überschreitung des Schwellenwertes zusätzlich bei mindestens zwei Messtemperaturen der durchgeführten Experimente signifikante Veränderungen zeigten (Abbildung 15).

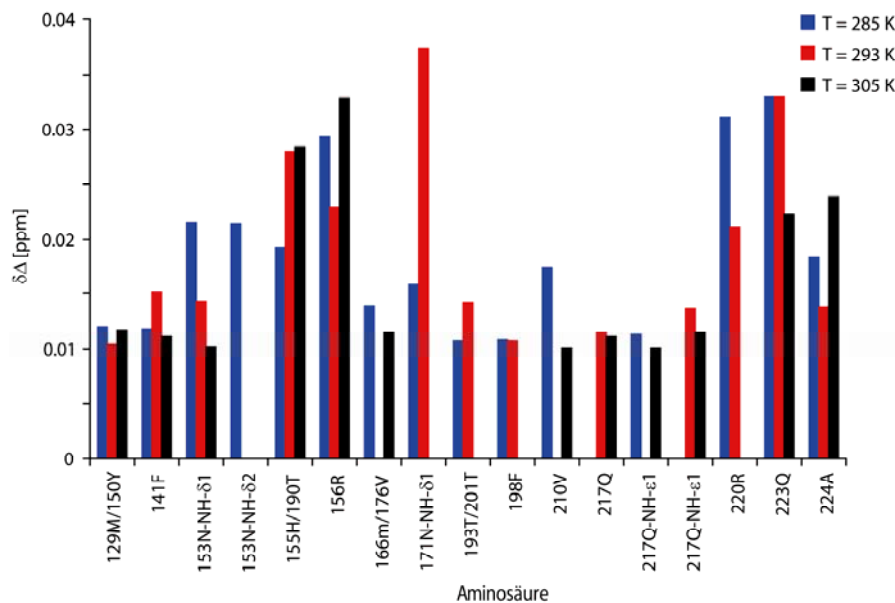


Abbildung 15: Auftragung der Änderungen der chemischen Verschiebung gegen die Aminosäure bei den drei unterschiedlichen Temperaturen. **Blau:** Änderung der chemischen Verschiebung bei 285 K, **rot:** bei 293 K und **schwarz:** bei 305 K. Für die Bewertung der Bindungsregion wurden nur Aminosäuren aufgenommen, deren Amidgruppe bei mindestens zwei Temperaturen eine signifikante Änderung der chemischen Verschiebung aufwies.

Die Unterschiede in den $\Delta\delta$ -Werten, die zwischen den Experimenten unterschiedlicher Temperatur zu beobachten sind, lassen sich auf die unterschiedliche Bindungskinetik zurückführen, da die Veränderung der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale den Mittelwert zwischen gebundenem und nicht gebundenem Zustand beschreibt.

Aus den erhaltenen Daten wurden mithilfe der *molecular modeling* Software Sybyl[®] die Oberflächenbereiche des Prionproteins bestimmt, die an der Bindung des Peptids **1** ($^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$) beteiligt sind. In der grafischen Darstellung sind deutlich zwei Bindungsregionen zu erkennen. Die erste liegt am Ende der Helix-1 und stellt den Bereich des Proteins dar, aus dem das Peptid **1** ($^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$) stammt. Diese Region ist in der Abbildung rechts unten zu erkennen. Die zweite Region ist im C-terminalen Bereich der Helix-3 lokalisiert, die sich in der Abbildung an der obersten Spitze des Proteins befindet (Abbildung 16).

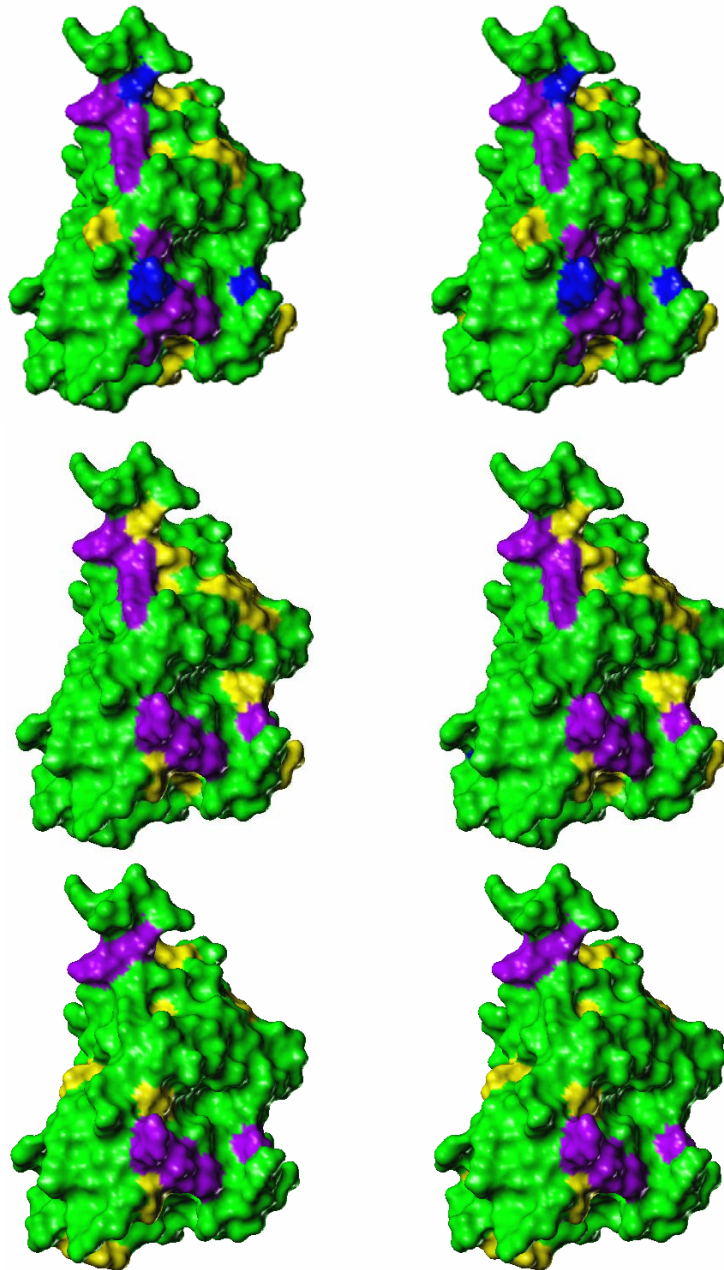


Abbildung 16: Darstellung der beiden Bindungsregionen des Peptids **1** auf dem Prionprotein in der *crossed-eye* Projektion der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. **Oben:** Messung bei 285 K, **Mitte:** Messung bei 293 K, **Unten:** Messung bei 305 K. Die Aminosäuren sind nach der unterschiedlich starken Veränderung der chemischen Verschiebung farblich markiert. **Violett:** $\Delta\delta > 0.020$ ppm, **blau:** $\Delta\delta > 0.015$ ppm, **gelb:** $\Delta\delta > 0.010$ ppm.

Da sich aus den Daten zwei völlig voneinander getrennte aber gleich zu bewertende Bindungsregionen ergaben, konnte keine eindeutige Aussage über die Lage der Bindungsstelle des Peptid **1** gemacht werden. Daher musste eine weitere unabhängige Methode angewandt werden, um das Bindungsepitop zweifelsfrei zu identifizieren. Hierzu bot sich das nachfolgend beschriebene massenspektrometrische Verfahren an.

3.2.2 MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente mit NMHRYPNQ

Die MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente wurden in Kooperation mit Lars Redecke, Martin von Bergen und Nico Jehmlich am Zentrum für Umweltforschung Department Proteomik in Leipzig durchgeführt.

Für die Messungen wurde das Prionprotein (90-230) ohne und mit dem Liganden Peptid **1** gemessen. Hierzu wurde das Protein aus der nicht deuterierten Stammlösung in deuteriertem Puffer verdünnt, so dass der Gesamt-Deuteriumgehalt des Puffers bei 96% lag. In diesem Puffer wurde das Protein nun inkubiert und nach 0, 10, 20, 30 und 60 min eine Probe entnommen. Diese wurde sofort auf 0 °C gekühlt und mit verdünnter TFA auf pH 2.5 angesäuert, so dass der Rücktausch der Deuteronen gegen Protonen soweit wie möglich verringert werden konnte. Der anschließende Verdau erfolgte für 4 min bei 0 °C mit immobilisiertem Pepsin, da dieses durch Zentrifugation leicht abzutrennen war. Aus den so erhaltenen Lösungen wurden 1 µL entnommen und auf dem MALDI-Target mit der Matrix kokristallisiert. Das Verdampfen des Lösungsmittels fand in einer *Speedvac* statt, um auch hier die Rücktauschrate gegen Protonen zu verringern. Die Proben wurden daraufhin sofort gemessen. Die Spektren wurden in einen Massenbereich von 700-5000 g/mol gemessen. Die erhaltenen Spektren zeigen ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis. Aus den Pepsinschnittstellen ergaben sich die möglichen Proteinfragmente, die mit den ermittelten Massen eines jeden Peaks verglichen wurden. Die Deuteriumeinbaurrate wurde anhand einer von Nico Jehmlich für das System H/D modifizierten Software bestimmt.¹⁸⁸ Diese simuliert die theoretischen Peptidmassen Atom für Atom von 0-100% Einbau gegen die gemessene Masse und berechnet mithilfe von Gleichung 9 eine Funktion mit der kleinsten Abweichung zur gemessenen Masse.¹⁸⁹

$$y = \left[\sum_{i=1}^n \left[\text{Masse}_i (\text{theoretisch}_i - \text{gemessene}_i)^2 \right] \right] / \left[N \sum_{i=1}^n (\text{Masse}_i) \right]$$

Gleichung 9: Berechnung des Fits für den Vergleich von gemessener und theoretischer Massenverteilung. y = Güte des Fits, i = jedes Ion und N = Anzahl der verglichenen Punkte.¹⁸⁹

Zunächst wurde das Prionprotein ohne Peptid **1** (¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰) vermessen und die einzelnen Spektren eines jeden Zeitpunktes analysiert. Es musste zum einen die Abdeckung des gesamten Proteins anhand der erhaltenen Fragmente sichergestellt werden, zum anderen sollte die Deuteriumeinbaurrate für den ungebundenen Zustand ermittelt werden. In Abbildung 17 ist das MS-Spektrum des verdauten hPrP(90-230) ohne zusätzlichem Peptid **1** gezeigt.

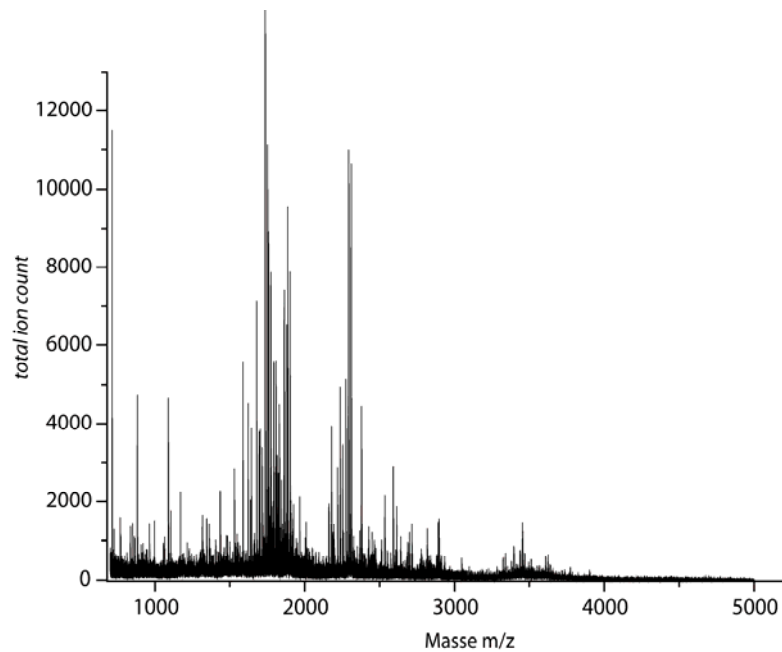


Abbildung 17: MALDI-TOF-MS Spektrum des humanen Prionproteins (90-230) nach Verdau mit Pepsin in nicht deuteriertem Puffer. Das Spektrum zeigt ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis und eine hohe Effizienz der Proteolyse mit Pepsin. Bereits nach vier minütiger Inkubation konnten keine nennenswerten Fragmente mit einem Molekulargewicht von mehr als 3500 g/mol mehr detektiert werden.

Es konnte fast die gesamte Sequenz des Prionproteins durch die erhaltenen Fragmente abgedeckt werden, mit Ausnahme der Bereiche von ⁹⁰Gly-Trp⁹⁹, ¹²⁶Gly-Tyr¹²⁸ und von ¹⁹⁶Glu-Glu²⁰⁰. Eine Übersicht der zugeordneten Fragmente ist in Abbildung 18 gezeigt.

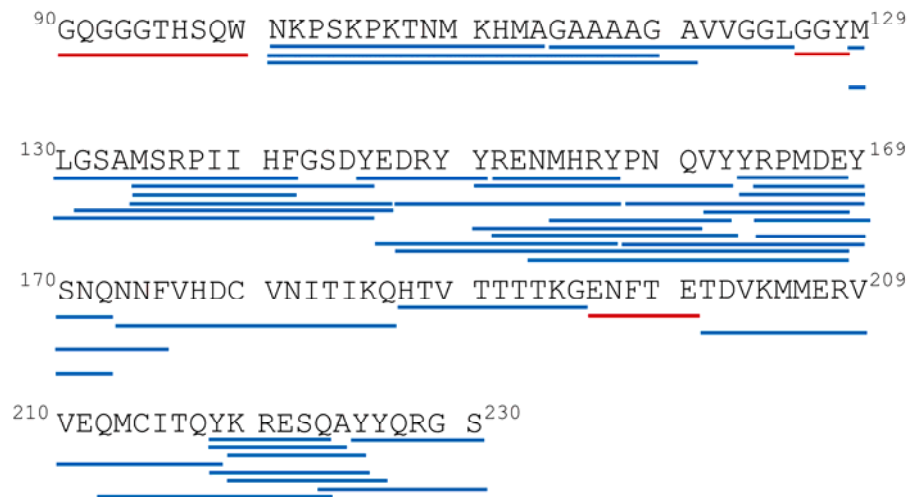


Abbildung 18: Zuordnung der im MALDI-TOF-MS Spektrum detektierten Proteinfragmente (**blaue Linien**) nach Proteolyse mit Pepsin zur Sequenz des humanen Prionproteins (90-230). Die **rot** markierten Bereiche konnten nicht nachgewiesen werden.

In Abbildung 19 ist beispielhaft gezeigt, wie der Deuteriumeinbau zu einer Veränderung der Isotopenverteilung eines Peptids führt. Aus dieser Verteilung konnte die Deuteriumeinbaurrate für die entsprechenden Peaks bestimmt werden.

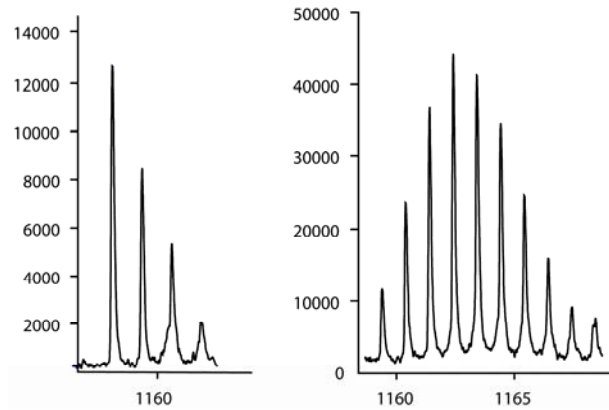


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt zwei MALDI-TOF-MS-Spektrenauschnitte im Massenbereich bei 1160 g/mol. Beide Spektren zeigen das Fragment $^{164}\text{NFVHDCVNI}^{172}$. **Links:** Das Fragment aus einer deuteriumfreien Probe, **rechts:** das gleiche Fragment nach 60 minütigem Deuteriumeinbau. Die Verschiebung der Isotopenpeaks ist deutlich zu erkennen.

Die im Anschluss vermessene Zeitreihe des Verdauens des Prionproteins mit zusätzlichem Peptid **1** wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt, es wurde nun jedoch wiederum ein siebenfacher Überschuss des Peptids **1** hinzugegeben. Bei einer Bindungskonstante von K_D 25 μM des Peptids an das Protein beträgt die Belegung des Rezeptors, wie schon für die ^1H , ^{15}N -HSQC Experimente berechnet, 95% (Gleichung 6 und Gleichung 7). Die Auswertung der erhaltenen Spektren wurde durch die starke Überlagerung im Bereich von 1058 g/mol mit Signalen des Peptids erschwert (Abbildung 20).

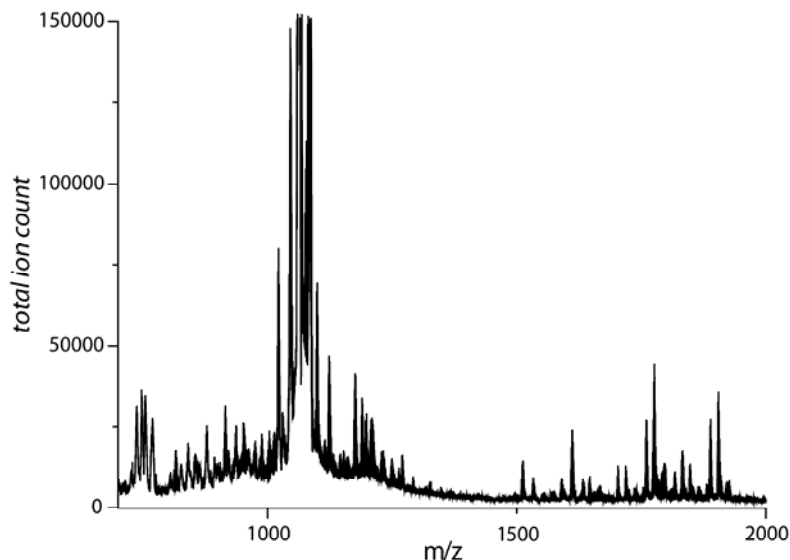


Abbildung 20: Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-MS-Spektrum von hPrP(90-230) in Gegenwart eines siebenfachen Überschusses an Peptid **1** nach Proteolyse mit Pepsin. Durch die Signale des Peptids ($M = 1058$ g/mol) ist in diesem Massenbereich eine deutliche Überlagerung der Proteinfragmentsignale zu beobachten.

Zudem konnten nicht alle Fragmente, die aus den ligandfreien Proben erhalten wurden, wiedergefunden oder einwandfrei identifiziert werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass

durch die Abschirmung der Proteinoberfläche der Angriff der Protease an dem Prionprotein verhindert wurde, so dass in diesem Falle im Bereich der Bindungsregion andere Fragmente entstanden sind. Da nur gleiche Fragmente miteinander verglichen werden konnten, wurde nicht die gesamte Proteinsequenz durch Fragmente abgedeckt. Um die nach Gleichung 9 berechneten Deuteriumeinbauquoten der Fragmente, die sowohl in den Proben mit als auch in denen ohne zusätzlichem Peptid **1** zweifelsfrei zuzuordnen waren, vergleichen zu können, wurden die ermittelten Werte gegen die Zeit aufgetragen und nach einer asymptotischen Exponentialfunktion angefügt.¹⁹⁰ Die erhaltenen Kurven aller Fragmente sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

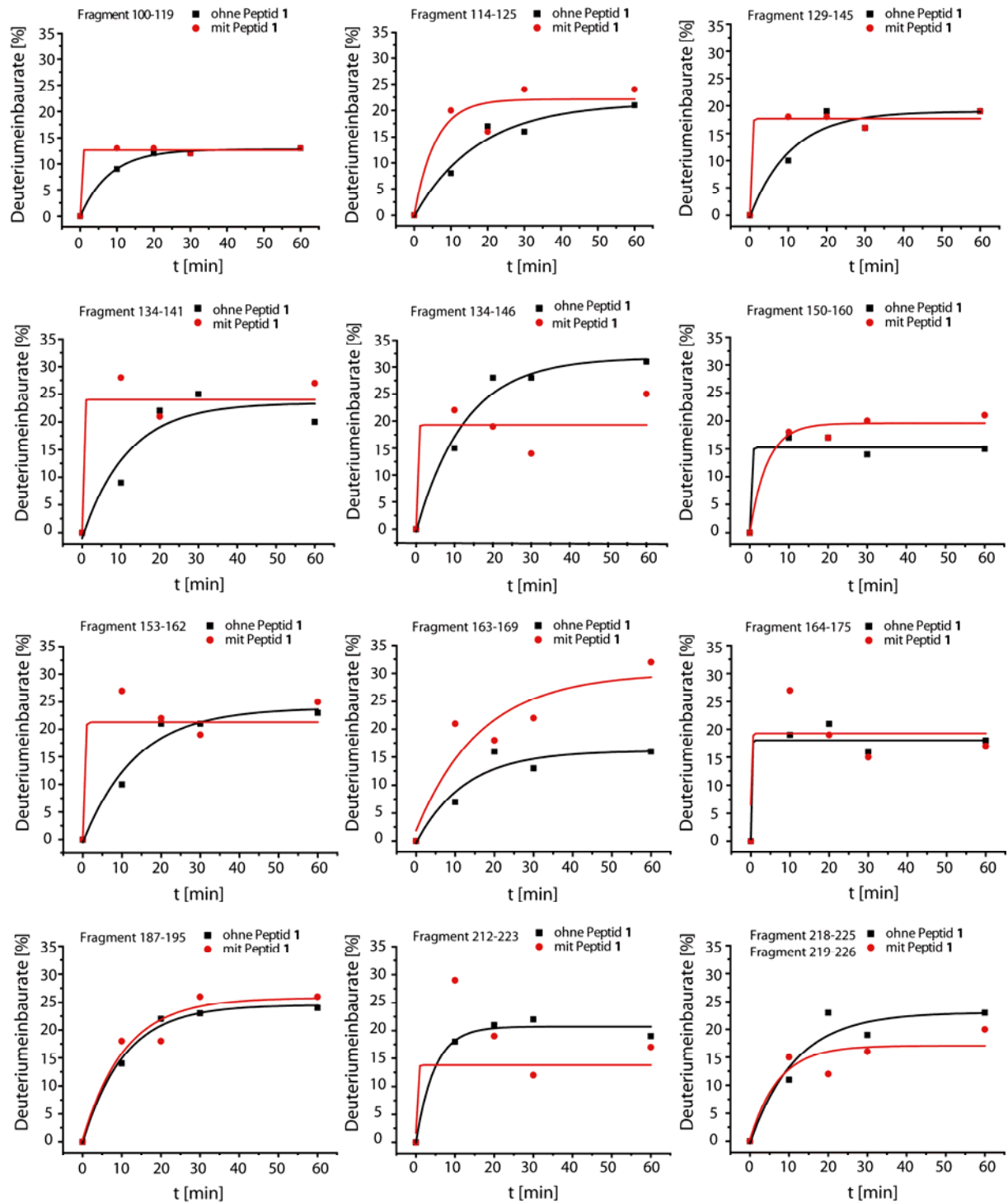


Abbildung 21: Zeitabhängigkeit der Deuteriumeinbauraten der Proteinfragmente des hPrP(90-230) in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart (rot) eines siebenfachen Überschusses an Peptid 1. Die Grafik zeigt, dass die Deuteriumeinbauraten der meisten Fragmente für die Messungen mit zusätzlichem siebenfachen Überschuss an Peptid 1 gleich schnell oder sogar schneller verlaufen als die für die Messungen ohne Peptid 1. Die Fragmente $^{212}\text{Gln-Gln}^{223}$ und $^{218}\text{Tyr-Tyr}^{225}$ (massenidentisch mit $^{219}\text{Lys-Tyr}^{226}$) zeigen jedoch eine deutlich langsamere Deuteriumeinbaurate im Fall der Ligandzugabe. Das Fragment $^{134}\text{Met-Glu}^{146}$ zeigt ebenfalls einen verlangsamten Verlauf der Einbaurate, der jedoch durch die umliegenden Fragmente nicht bestätigt wird.

Die Datenpunkte der Deuteriumeinbauraten zeigen zum Teil eine erhebliche Streuung. Außerdem zeigen manche Fragmente der Proben mit zusätzlichem Peptid **1** nicht wie zu erwarten vergleichbare Einbauraten wie die Fragmente der ligandfreien Proben, sondern eine schnellere Deuteriumaufnahme. Als mögliche Ursache dieser Abweichung kann der nicht absolut identische zeitliche Ablauf der Probenpräparation angesehen werden. Schon kleine Abweichungen während der Präparation können deutliche Unterschiede hervorrufen. Zudem ist durch den schnellen Deuteriumeinbau auch ein schneller Rücktausch zu beobachten, weshalb die detektierte maximale experimentelle Einbauraten bei 30% liegt. Auch dies führt dazu, dass kleine Ungenauigkeiten große Abweichungen zur Folge haben.

Beim Vergleich der Einbauraten aller Fragmente untereinander ergeben sich zwei Bereiche, in denen die Massenzunahme durch Deuteriumaufnahme langsamer verläuft, als in den Vergleichsfragmenten. Der erste Bereich umfasst die Sequenz von $^{134}\text{MSRPIIHFGSDYE}^{146}$. Dieser Bereich wird jedoch von keinem der anderen Fragmente, die in diesem Bereich überlappen ($^{129}\text{Met-Tyr}^{145}$, $^{134}\text{Leu-Gly}^{141}$) bestätigt. Der zweite Bereich umfasst die Sequenz $^{212}\text{QMCITQYKRESQAYY}^{226}$. Dieser Bereich wird im Gegensatz zu dem ersten Bereich durch drei Proteinfofragmente gestützt. Die drei Fragmente sind $^{212}\text{QMCITQYKRESQ}^{223}$, $^{218}\text{YKRESQAY}^{225}$ und $^{219}\text{KRESQAYY}^{226}$, wobei die beiden letztgenannten Fragmente eine identische Masse besitzen und daher nicht unterschieden werden können. Basierend auf diesen Daten muss die Bindungsregion im Bereich von $^{212}\text{Gln-Tyr}^{226}$ postuliert werden (Abbildung 22).

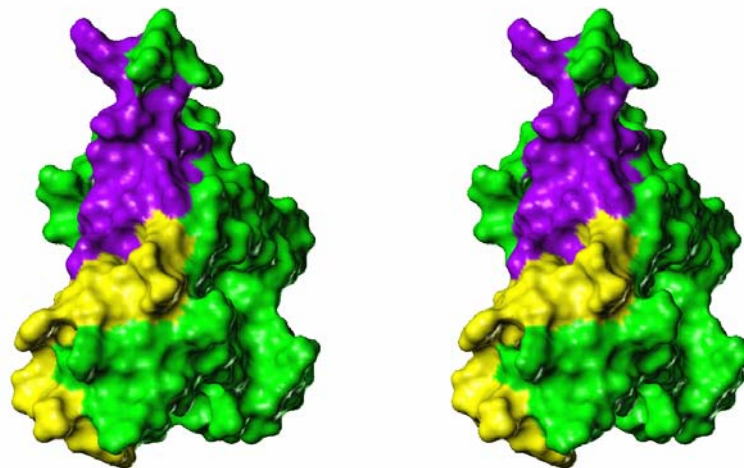


Abbildung 22: *Crossed-eye* Darstellung der Bindungsregion des Peptids NMHRYPNQ (**1**) auf dem Prionprotein basierend auf den Ergebnissen der MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente. Der violett markierte Bereich stellt die Region von $^{218}\text{Tyr-Tyr}^{226}$ dar, der gelb markierte Bereich die Region $^{212}\text{Gln-Tyr}^{217}$.

Da aber auch die mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Daten eine gewisse Unsicherheit aufweisen, dürfen diese Ergebnisse jedoch nicht alleinstehend betrachtet werden. Erst durch den Vergleich mit den Resultaten aus den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Experimenten können belastbare Aussagen getroffen werden.

3.2.3 Die Bindungsregion des Peptids 1 auf dem Prionprotein

Die vergleichende Analyse der Daten aus den ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Experimenten mit den Ergebnissen, die aus den MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimenten erhalten wurden, identifizierte letztlich die Bindungsregion des Peptids $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) auf der Oberfläche des humanen Prionproteins. Die Abbildung 23 zeigt die graphische Zusammenfassung der Ergebnisse beider Methoden.

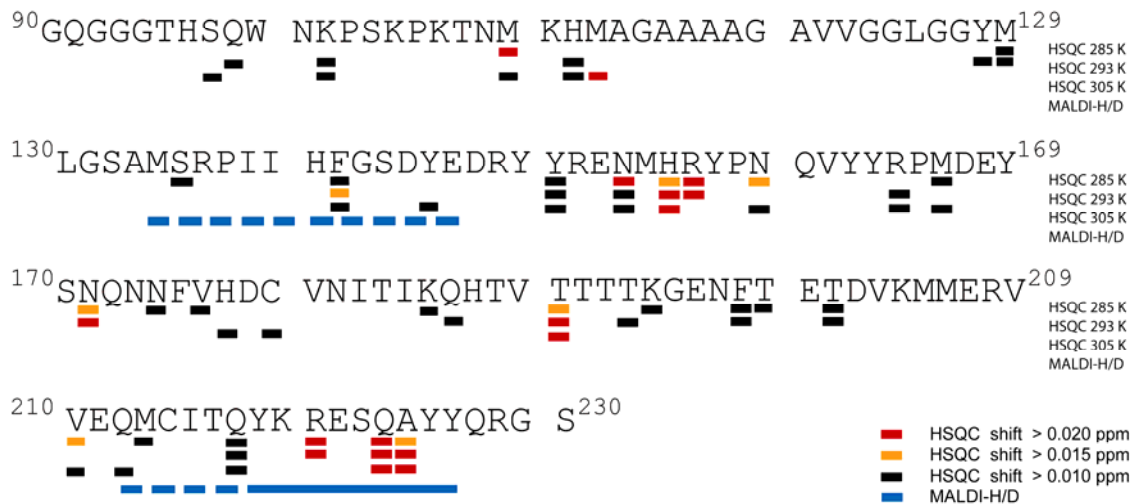


Abbildung 23: Aminosäuresequenz des humanen Prionproteins (90-230) und die graphische Zusammenfassung der Ergebnisse aus NMR- und MALDI-TOF-MS-Experimenten. Die blau markierten Bereiche sind die Fragmente, die eine verlangsamte Deuteriumeinbaurrate zeigen. In schwarz, orange und rot sind die Aminosäuren markiert, die in den ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Experimenten eine Veränderung der chemischen Verschiebung der Amidsignale zeigen. Die Übereinstimmung der Bindungsregion im Bereich von $^{218}\text{Tyr-Tyr}^{226}$ ist deutlich sichtbar.

Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass eine signifikante Übereinstimmung nur in dem Bereich von $^{217}\text{Gln-Tyr}^{226}$ zu finden ist. Der zweite Bereich, der durch die NMR-Experimente als mögliche Bindungsregion in Frage kam ($^{149}\text{Tyr-Asn}^{159}$) wird durch die MALDI-TOF-MS-H/D-Austauschexperimente nicht bestätigt. Gleiches gilt für den Bereich von $^{134}\text{Met-Glu}^{146}$, der ausschließlich aus den massenspektrometrischen Experimenten als mögliche Interaktionsregion identifiziert wurde. Allerdings wurde dieser Bereich bereits zuvor als sehr unwahrscheinlich deklariert, da nur eines der Fragmente den Effekt der verlangsamten Deuteriuminkorporation zeigte. Der Bereich von $^{212}\text{Gln-Thr}^{216}$, der aufgrund der massenspektrometrischen Daten als Teil der Bindungsregion postuliert wurde, wird nicht durch die NMR-Daten bestätigt. Die verlangsamte Deuteriumaufnahme des Fragmentes $^{212}\text{Gln-Gln}^{223}$ kann jedoch mit der Überlappung dieses Fragmentes mit dem Teil der Bindungsregion ab dem Gln217 erklärt werden, die mit den Daten aus den NMR-Experimenten übereinstimmt. Zusammengefasst ergibt sich hieraus, dass die Bindungsregion

des Peptids **1** in dem C-terminalen Bereich der Helix-3 der humanen Prionproteins lokalisiert ist (Abbildung 24).

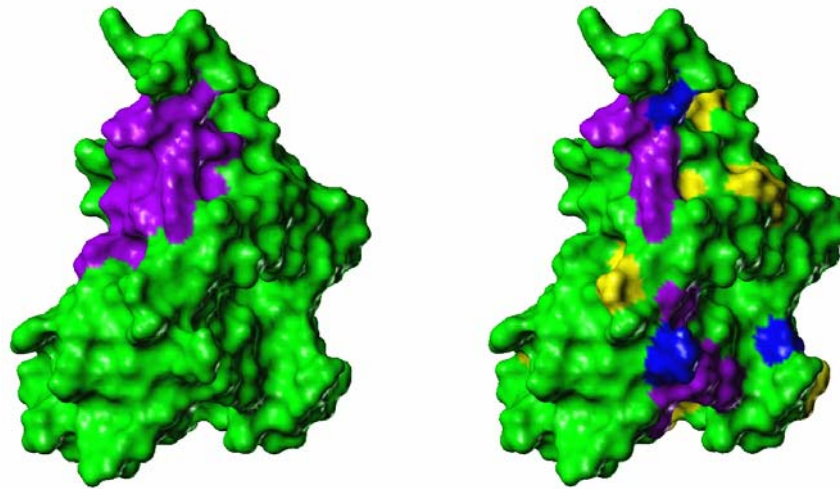


Abbildung 24: Zusammenfassende Betrachtung der Bindungsregion. **Links:** Die Bindungsregion, die sich aus den Ergebnissen der massenspektrometrischen Experimente ableitet und den Bereich von $^{217}\text{Gln-Tyr}^{226}$ umfasst (**violett** markiert). **Rechts:** Die beiden Bindungsregionen, die sich aus den Ergebnissen der NMR-Experimente ableiten lassen. Die Übereinstimmung der beiden Bindungsregionen im Bereich der Helix-3 (oberer Teil des Proteins) sind deutlich sichtbar. Die Aminosäuren sind nach der unterschiedlich starken Veränderung der chemischen Verschiebung farblich gekennzeichnet. **Violett:** $\Delta\delta > 0.020$ ppm, **blau:** $\Delta\delta > 0.015$ ppm, **gelb:** $\Delta\delta > 0.010$ ppm.

Die in dieser Arbeit postulierte Bindungsregion steht in guter Übereinstimmung mit theoretischen Berechnung von Colombo *et al.*, die einen direkten Einfluss des Met213 auf die Stabilität des Prionproteins nachweisen konnten.¹⁹¹ Die Oxidation der Seitenkette dieses Methionins zum Sulfoxid resultiert in einer direkten Destabilisierung der Tertiärstruktur. Da es sich bei dem Aggregationsassay von Redecke *et al.* ebenfalls um einen oxidativen Aggregationsassay handelt und das Peptid **1** ($^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$) in der Region der Helix-3 bindet, wird das Methionin durch das Peptid abgeschirmt und damit vor einem oxidativen Angriff geschützt, so dass der Konformationswechsel nicht stattfindet.

3.3 Alaninscan von $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ und $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$

3.3.1 Synthese der Alaninscan Peptide

Für das Peptid **1** ($^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$) konnte eine Bindung an das humane Prionprotein mit $K_D = 25 \mu\text{M}$ und ein aggregationsinhibitorisches Potential *in vitro* nachgewiesen werden. Das Peptid $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ zeigt dagegen keinen aggregationsinhibitorischen Effekt obwohl die Bindung mit $21 \mu\text{M}$ gleichstark ist. Das C-terminal gelegene Peptid $^{157}\text{YPNQVYYR}^{164}$ bindet mit $K_D = 164 \mu\text{M}$ deutlich schwächer und zeigt ebenfalls keinen Effekt auf die *in vitro* Aggregation des Prionproteins.¹⁸⁵ Wegen der ungünstigen Bindungskinetik der Peptide konnte keine Charakterisierung der Bindung auf atomarer Ebene

erfolgen. Diese ist jedoch für die weitere Optimierung der Peptide zu möglichen Leitstrukturen eines neuen TSE-Wirkstoffes zwingend notwendig. Aus diesem Grund sollten die bindungsrelevanten Aminosäuren zunächst durch SPR-Experimente von Alanin-scans der Peptide $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ und $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ aufgeklärt werden.

Die Synthese der Peptide erfolgte in 30 μmol Ansätzen unter Verwendung eines Polystyrol-PAL-PEG-Harzes an einem Syntheseroboter *ACT MOS 496* Ω . Die einzelnen Kupplungsschritte der Aminosäuren erfolgten mit einem vierfachen Überschuss der Aminosäure und einem fünffachen Überschuss des Aktivators TBTU und der Base DIPEA, wobei eine dreifache Wiederholung des Kupplungsschrittes mit Kupplungszeiten von 25, 40 und 50 Minuten erfolgte. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte zeitgleich mit der Abspaltung der Schutzgruppen mit TFA/TIPS/ H_2O (95/3/2 v/v). Das Peptid wurde so mit einem freien N-Terminus und einer C-terminalen Säureamidgruppe erhalten. Anschließend wurden die Peptide durch Fällung mit *tert*-Butylmethylether vorgereinigt und darauf folgend über *RP*-HPLC mittels einer C_{18} -Säule und einem Wasser/Acetonitril-Gradienten mit zusätzlichen 0.1% TFA gereinigt. In Tabelle 2 sind die synthetisierten Peptide und die erhaltenen Ausbeuten nach Reinigung über HPLC zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht der synthetisierten Peptide und deren prozentuale Ausbeute. Alle Peptide wurden über *RP*-HPLC gereinigt.

Peptid	Sequenz	Ausbeute [%]
	$^{149}\text{YYRENMHRYPNQVYYR}^{164}$	
1	$^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$	53
2	$^{149}\text{AYRENMHR}$	47
3	$^{149}\text{YARENMHR}$	42
4	$^{149}\text{YYAENMHR}$	40
5	$^{149}\text{YYRANMHR}$	60
6	$^{149}\text{YYREAMHR}$	61
7	$^{149}\text{YYRENAHR}$	64
8	$^{149}\text{YYRENMAR}$	41
9	$^{149}\text{YYRENMHA}$	36
10	$^{153}\text{AMHRYPNQ}^{160}$	27
11	$^{153}\text{NAHRYPNQ}^{160}$	42
12	$^{153}\text{NMARYPNQ}^{160}$	72
13	$^{153}\text{NMHAYPNQ}^{160}$	16
14	$^{153}\text{NMHRAPNQ}^{160}$	35
15	$^{153}\text{NMHRYPANQ}^{160}$	41
16	$^{153}\text{NMHRYPANQ}^{160}$	40
17	$^{153}\text{NMHRYPNA}^{160}$	60

Alle synthetisierten Peptide wurden mittels MALDI-TOF-MS und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Daten der Charakterisierung sind im Abschnitt 6 zusammengefasst.

3.3.2 SPR Studien der Peptide aus dem Alaninscan

Die Bestimmung der Bindungseigenschaften der Peptide des Alaninscans (**2-17**) erfolgte durch Oberflächenplasmonen Resonanz Experimente an einem Biacore 3000 Gerät. Als Messchip wurden kommerziell erhältliche CM5 Chips der Firma Biacore benutzt.

Für die Messungen wurde das rekombinant exprimierte humane Prionprotein (90-230) verwendet. Die Immobilisierung des Proteins auf der Oberfläche des Messchips erfolgte mit EDC/NHS in Acetatpuffer (pH 4.0) und die nicht umgesetzten Bindungsstellen wurden mit Ethanolamin blockiert. Die Messungen der Peptide **2-17** wurde in zwei Messreihen durchgeführt. Die Menge an immobilisiertem Protein betrug hierbei 1629 RU und 6500 RU, was einer Menge von 101 fmol bzw. von 405 fmol an immobilisiertem Protein entspricht. Bei einer angenommenen 1:1 Interaktion zwischen Peptid und Protein ergeben sich für die Peptide, deren Molmassen alle im Bereich um 1000-1100 g/mol liegen, theoretische RU_{max} -Werte von ca. 100 RU für den Fall der 101 fmol und 400 RU im Falle der 405 fmol an immobilisiertem Protein. Die Überprüfung der Proteinintegrität erfolgte mit dem Peptid **1** ($^{153}NMHRYPNQ^{160}$), das von B. Claasen charakterisiert wurde.¹⁸⁵ Auf die alternative Überprüfung der Integrität anhand des monoklonalen anti-hPrP Antikörpers 15B6 der Firma Roboscreen wurde verzichtet, da die Dissoziation des Antikörpers von dem Protein sehr langsam und nicht vollständig verläuft. Die Messungen wurden in einem kommerziell erhältlichen HBS-N Puffer (pH 7.4) der Firma Biacore mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Diese geringe Flussrate wurde gewählt, weil einerseits die Menge des benötigten Materials sehr gering ist, andererseits, um die Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten mit den von B. Claasen ermittelten Werten zu gewährleisten. Die geringe Flussrate ist allerdings auch eine mögliche Fehlerquelle, da es verstärkt zu Rückbindungseffekten und zu diffusionsbedingten Massentransportlimitierungen kommt.^{173;192} Sowohl die Assoziationszeit als auch die Dissoziationszeit betrug 300 s. Die vermessenen Peptidkonzentrationen lagen im Bereich von 5-1000 μM .

Zunächst wurde das Peptid **1** gemessen, das als Referenzsubstanz diente. Da es bei Konzentrationen oberhalb von 100 μM zu unspezifischen Wechselwirkungen mit der Referenzzelle kam, wurden nur Konzentrationen von 5-100 μM vermessen. Die erhaltenen RU_{max} -Werte wurden mit der Software Origin 7.5 nach dem *one-site-binding* Modell gefittet (Gleichung 10). Aus dem erhaltenen Fit ergab sich ein K_D -Wert von 28 μM (Abbildung 25). Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von B. Claasen ermittelten Wert von 25 μM überein. Die RU-Antwort ist jedoch wesentlich geringer als die maximal berechnete RU_{max} -Antwort. Der Grund hierfür können unter anderem darin liegen, dass das Protein im Bereich der

Bindungsregion (Lys219) an die Dextranmatrix gebunden wurde und somit die Bindungsregion nicht frei zugänglich ist.

$$RU = RU_{\max} * \frac{c}{(K_D + c)}$$

Gleichung 10: Berechnung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D nach dem *one-site-binding* Modell. RU = Gleichgewichtswert der SPR-Antwort bei der Konzentration c , c = Konzentration des in Lösung befindlichen Bindungspartners, RU_{\max} = Gleichgewichtswert der SPR-Antwort bei unendlich hoher Konzentration des gelösten Liganden.

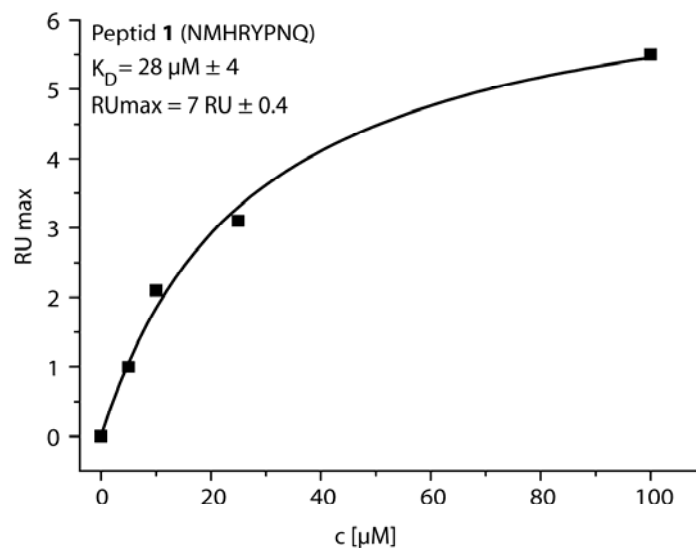


Abbildung 25: Auftragung der maximalen RU-Antwort des Peptids **1** gegen die Konzentration. Die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D resultierte aus dem Fit der Daten an das *one-site-binding* Modell und führte zu einem Wert von $K_D = 28 \mu\text{M}$.

Nachdem die Integrität des Proteins gewährleistet war, wurden Konzentrationsreihen der Peptide **2-9** vermessen, bei denen die Aminosäuren der Sequenz $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ ($K_D = 21 \mu\text{M}$)¹⁸⁵ sukzessiv gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die erhaltenen RU_{\max} -Werte wurden gegen die Konzentration aufgetragen und an das *one-site-binding* Modell gefittet. Die erhaltenen Fits sind in Abbildung 26 zusammengefasst.

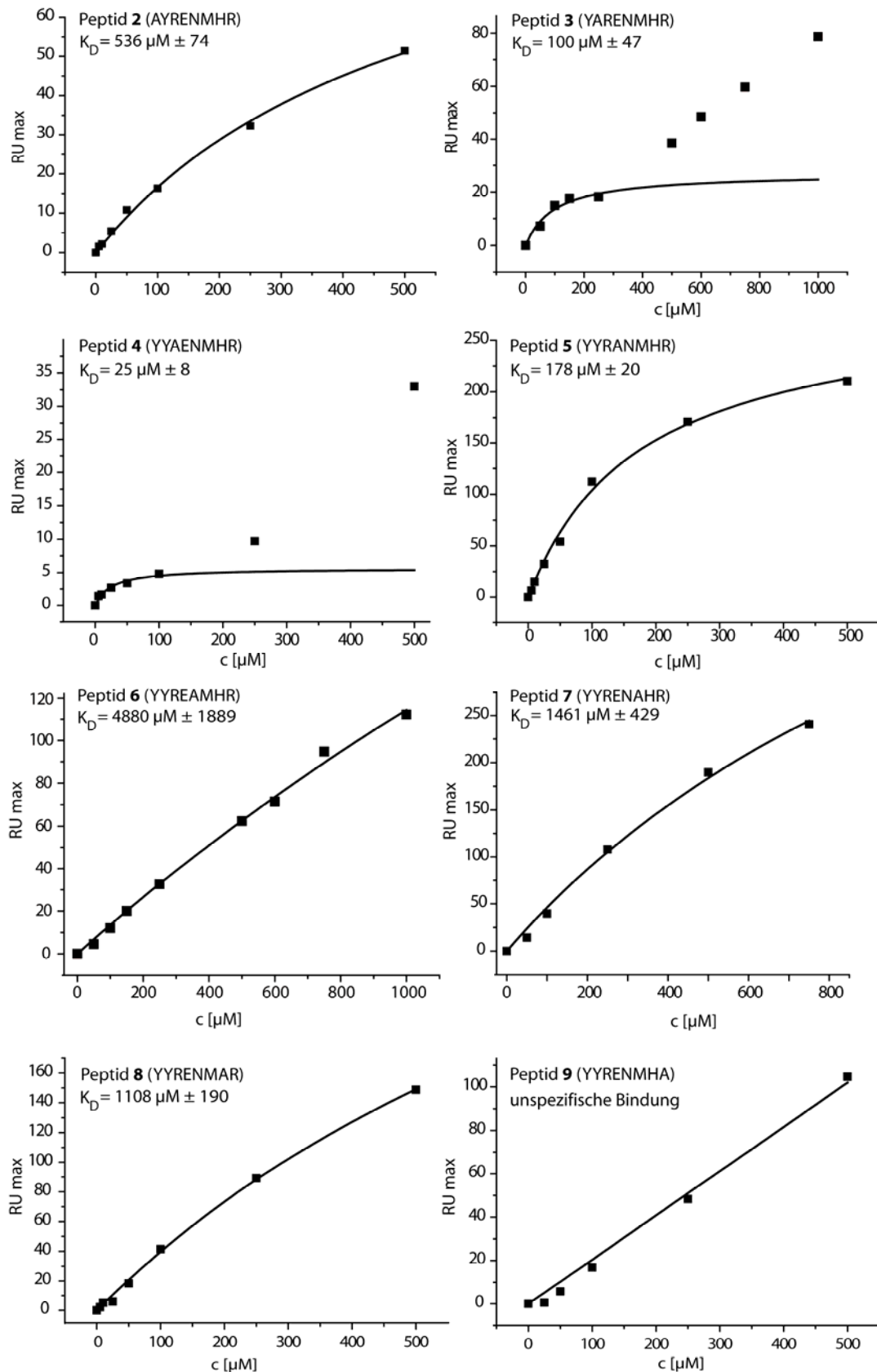


Abbildung 26: Affinitätsplots der Peptide 2-9, die den Alaninscan der Sequenz $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ darstellen. Für die Peptide 3 und 4 wurden nicht alle Datenpunkte in den Fit einbezogen, da die Peptide in den höheren Konzentrationen unspezifisch an das Protein binden. Das Peptid 6 zeigt eine sehr schwache Bindung, die auch schon als unspezifisch betrachtet werden kann. Das Peptid 9 zeigt eine unspezifische Bindung.

Die Bindungskonstante für das Peptid **2** beträgt $536 \mu\text{M}$, was einer Verschlechterung der Bindungsaffinität um den Faktor 21 darstellt. Das Tyr149 hat also einen Einfluss auf die Bindungsaffinität. Ob diese jedoch auf strukturellen Stabilisierungen der Peptidkonformation oder auf direkten Wechselwirkungen der Seitenkette mit dem Protein beruhen, kann aus diesen Messungen nicht geklärt werden. Die Substitution des Tyr150 gegen Alanin im Peptid **3** zeigt dagegen kaum Einfluss auf die Bindung, da die Bindungskonstante sich nur um den Faktor 4 auf $K_D = 100 \mu\text{M}$ verschlechtert. Für die Bestimmung dieses Wertes konnten nur die RU_{max} -Werte der Peptidkonzentrationen bis $250 \mu\text{M}$ verwendet werden, da bei höheren Ligandkonzentrationen unspezifische Wechselwirkungen überwiegen. Dies ist im Affinitätsplot durch den linearen Anstieg der Datenpunkte im Bereich von $500\text{-}1000 \mu\text{M}$ zu erkennen.

Das Peptid **4**, in dem das Arg151 substituiert wurde, bindet mit $K_D = 24 \mu\text{M}$ an das Prionprotein und besitzt daher identische Bindungseigenschaften wie das Peptid mit der Ursprungssequenz. Auch die Substitution der Glutaminsäure an Position 152 (Peptid **5**) zeigt nur einen geringen Einfluss auf die Bindungseigenschaften. Die Bindungskonstante ist nur um den Faktor 7 schlechter als die des Ursprungpeptids.

Einen gravierenden Effekt auf die Bindung zeigt dagegen die Substitution des Asn153 in Peptid **6**. Die Bindung des Peptids ist mit einem K_D -Wert von $4880 \mu\text{M}$ mehr als 200fach schwächer als die des Vergleichspeptids. Dies deutet darauf hin, dass das Asparagin wahrscheinlich mit der Säureamidgruppe der Seitenkette starke Wechselwirkungen mit dem Protein, z. B. in Form von Wasserstoffbrückenbindungen, eingeht. Die Gründe für den großen Fehler von 39% in der Bestimmung der Bindungskonstante liegen unter anderem an dem vermessenen Konzentrationsbereich, da nur Ligandkonzentrationen bis zu einer Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ vermessen wurden und so die Kurve noch nicht im Bereich der halbmaximalen Sättigung liegt.

Die Peptide **7** und **8** zeigen ebenfalls eine wesentlich schwächere Bindung im Vergleich zu dem Ursprungspeptid. Die Bindungskonstanten betragen für das Peptid **7** $1461 \mu\text{M}$ und für das Peptid **8** $1108 \mu\text{M}$. Für das Peptid **9** konnte keine Bindungskonstante bestimmt werden. Die maximalen RU Antworten der vermessenen Konzentrationen im Bereich von $5\text{-}500 \mu\text{M}$ zeigen einen linearen Zusammenhang. Höhere Konzentrationen des Peptids konnten nicht vermessen werden, da es zu starken Interaktionen des Peptids mit der Referenzzelle kam.

Insgesamt zeigt sich, dass die bindungsrelevanten Aminosäuren des Proteinfragmentes $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ im Bereich der Aminosäuren $^{153}\text{NMHR}^{156}$ liegen. Die N-terminal gelegenen Aminosäuren haben wenig bis gar keinen Einfluss auf die Bindung an das Prionprotein (Abbildung 27).

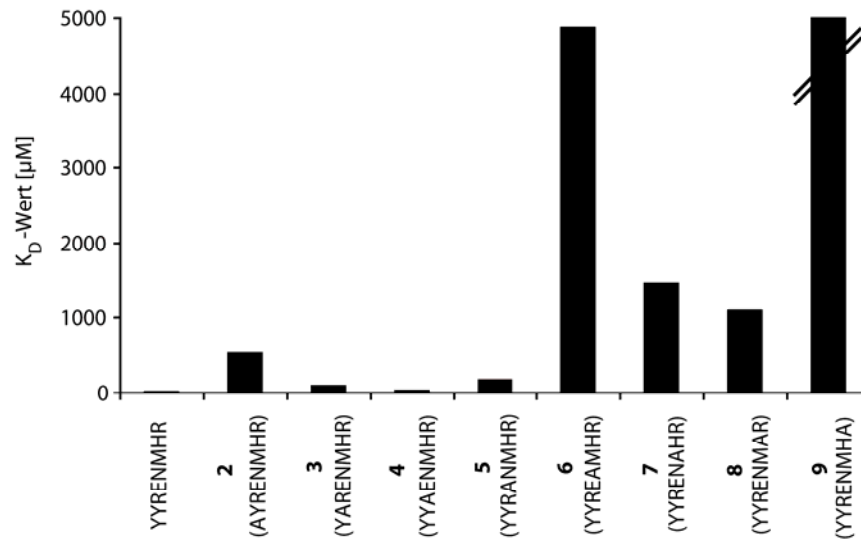


Abbildung 27: Auftragung der ermittelten K_D -Werte der Peptide 2-9. Die Bindungskonstanten der Peptide 2, 3, 4 und 5 liegen ungefähr in dem Bereich des Ursprungspeptids $^{149}\text{YYRENMHR}^{153}$ mit $K_D = 21 \text{ mM}$. Die Substitution des Asn153 bzw. der C-terminal gelegenen Aminosäuren (Peptide 6, 7, 8 und 9) führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Bindungskonstanten. Im Falle des Peptids 9 konnte keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden.

Ebenso wie die Peptide des Alaninscans der Sequenz $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ wurden die Peptide, die aus dem Alaninscan der Sequenz $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ erhalten wurden (Peptide 10-17) vermessen. In Abbildung 28 sind die erhaltenen Affinitätsplots zusammengefasst.

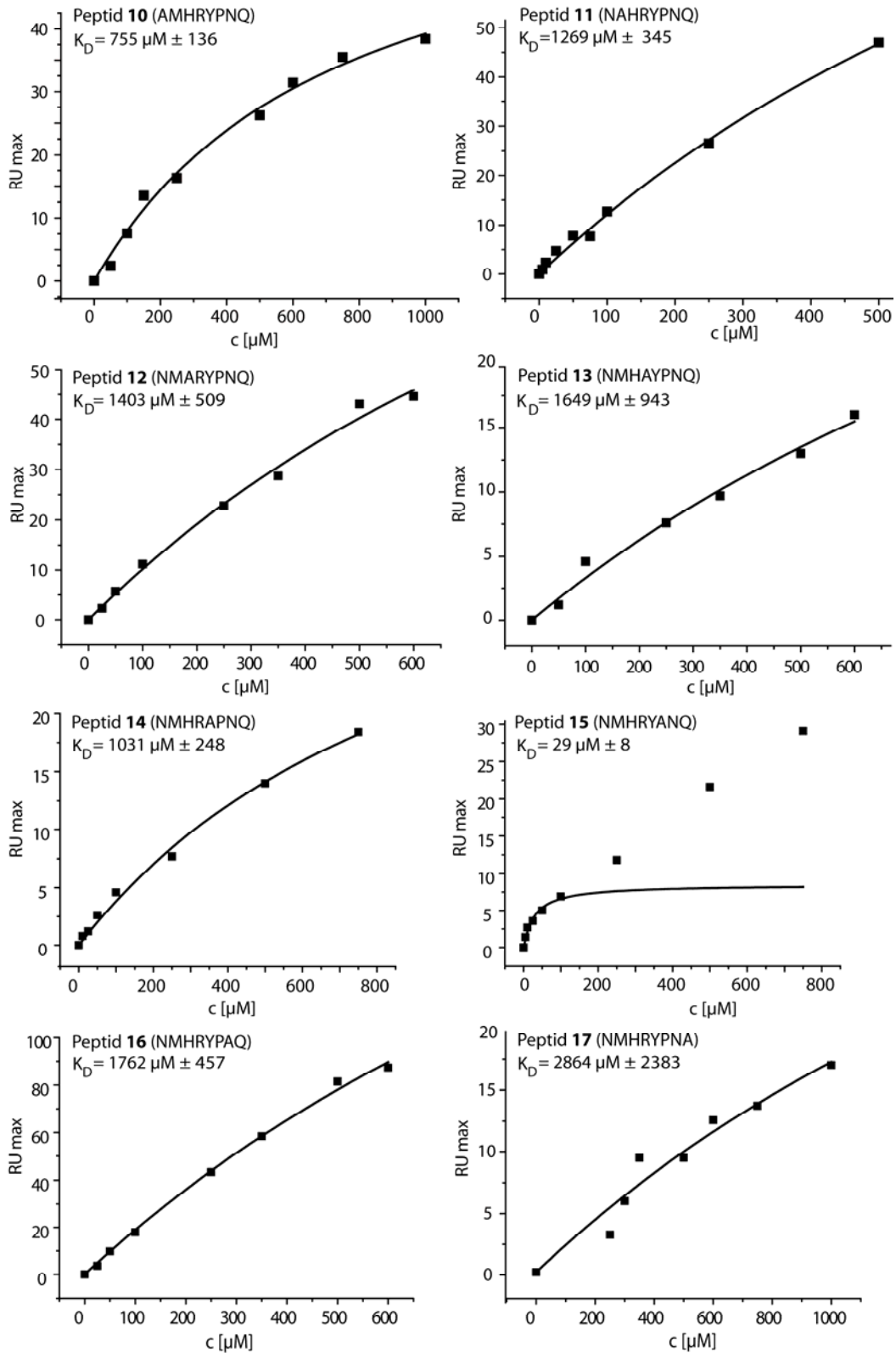


Abbildung 28: Affinitätsplots der Peptide 10-17, die den Alaninscan der Sequenz $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ darstellen. Das Peptid 15, bei dem Pro158 substituiert wurde, zeigt als einziges keine Auswirkung der Substitution gegen Alanin auf die Bindungskonstante. Für diesen Fit konnten die Konzentrationen größer als $250 \mu\text{M}$ nicht berücksichtigt werden, da der lineare Verlauf auf unspezifische Wechselwirkungen hindeutete. Alle anderen Peptide haben deutlich schwächere Bindungskonstanten die im Bereich von $755 \mu\text{M}$ bis $2864 \mu\text{M}$ liegen. Im Falle des Peptids 17 $^{153}\text{NMHRYPNA}^{160}$ ist die Bindung sehr schwach bis unspezifisch.

Die Peptide **10-13**, bei denen die Teilsequenz $^{153}\text{NMHR}^{156}$ des Peptids $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) sukzessive gegen Alanin ausgetauscht wurde, besitzen eine wesentlich geringere Bindungsaffinität an das humane Prionprotein als das Ursprungspeptid. Die K_D -Werte dieser Peptide liegen im Bereich von 755 bis 1649 μM , was eine Verschlechterung der Bindung um den Faktor 30 bis 66 bedeutet. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten des Alaninscans des Proteinfragmentes $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$, bei dem im Falle der Substitution dieser vier Aminosäuren ebenfalls eine deutliche Verschlechterung der Bindungskonstanten beobachtet wurde (Abbildung 29). Des Weiteren ist die Bindungskonstante des Peptids **14**, in dem das C-terminal gelegene Tyr157 ersetzt wurde, mit einem K_D -Wert von 1031 μM ebenfalls deutlich niedriger als die des Vergleichspeptids. Die gefitteten Datenpunkte beschränken sich im Falle des Peptids **15** auf die Konzentration bis 100 μM , da bei höheren Konzentrationen ein linearer Anstieg der maximalen RU-Antworten zu beobachten ist, der auf unspezifische Wechselwirkung hinweist. Der so ermittelte K_D -Wert von 29 μM ist fast identisch mit dem des Ursprungspeptids (**1**), der 25 μM beträgt. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass vom Prolin nur das Peptidrückgrat und gegebenenfalls die β -Methyleneinheit zu der Bindung beitragen. Der letztgenannte Beitrag kann im Falle der Substitution gegen Alanin durch dessen β -Methylgruppe ausgeglichen werden.

Die Substitution des Asn159 (Peptid **16**) zeigt mit einem K_D -Wert von 1762 μM wiederum eine deutliche Verschlechterung der Bindung. Dies deutet auf eine direkte Interaktion der Säureamidgruppe mit dem Protein hin. Auch im Falle des Peptids **17** scheint eine direkte Interaktion der Seitenkette mit dem Protein zu erfolgen, da sich die Bindungskonstante des Peptids auf $K_D = 2864 \mu\text{M}$ verschlechtert. Allerdings ist der Fit auch in diesem Fall mit einem großen Fehler versehen, was erneut auf einen nicht ausreichend hohen Konzentrationsbereich der SPR-Experimente und eine starke Streuung der Datenpunkte zurückzuführen ist. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

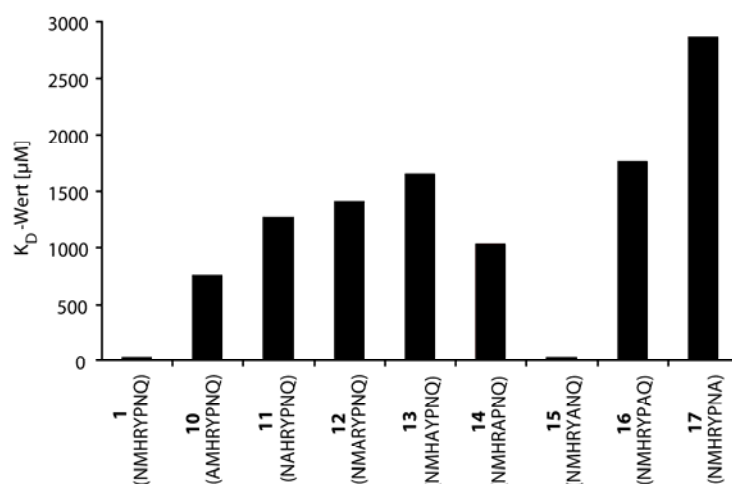


Abbildung 29: Auftragung der ermittelten K_D -Werte der Peptide 10-17. Die Bindungskonstanten des Peptids 1, das die Ursprungssequenz umfasst, liegt bei 25 µM. Die Peptide 10, 11, 12, 13 und 14 zeigen eine deutlich schlechtere Bindung an das Prionprotein. Ebenso verhält es sich mit den Peptiden 16 und 17. Einzig das Peptid 15 (NMHRYANQ) zeigt keine Verschlechterung der Bindungskonstante.

Die Daten aus den SPR-Experimenten können genutzt werden, um ein vorläufiges Bindungs epitop der Sequenz $^{149}\text{YYRENMHRYPNQ}^{160}$ an das humane Prionprotein zu postulieren (Abbildung 30).

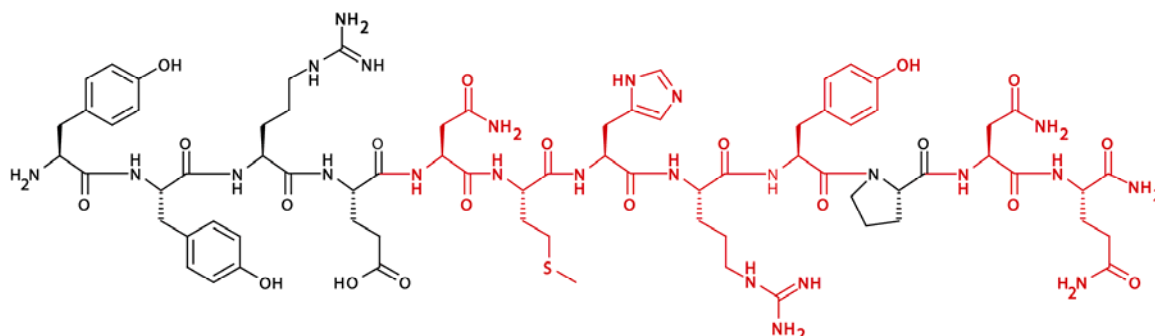


Abbildung 30: Proteinfragment von $^{149}\text{Tyr-Gln}^{160}$. Der rot markierte Bereich von $^{153}\text{Asn-Gln}^{160}$ ist für die Interaktion mit dem humanen Prionprotein wichtig. Der schwarz markierte Bereich hat keinen Einfluss auf die Bindung. Das Prolin an Position 158 zeigt keine seitenkettenspezifische Interaktion. Jedoch kann ein Bindungsbeitrag des Peptidrückgrats nicht ausgeschlossen werden.

Die N-terminalen Aminosäuren $^{149}\text{Tyr-Glu}^{152}$ haben keinen oder nur einen sehr geringen Beitrag an der Bindung. Das Arginin an Position 153 ist die erste Aminosäure, die einen wichtigen Beitrag an der Bindung leistet. Auch die C-terminal gelegenen Aminosäuren bis zum Gln160 sind wichtige Bestandteile der Bindungsinteraktion. Einzig das Prolin an Position 158 ist durch Alanin ersetzbar, was darauf hinweist, dass die Interaktion nicht speziell über das Prolin vermittelt wird, sondern dass entweder nur das Peptidrückgrat oder zusätzlich auch die β -Methyleinheit an der Bindung beteiligt ist.

Für eine weitere Aufklärung der Bindungsinteraktion auf atomarer Ebene, die auch den Bindungsanteil des Prolins aufdecken kann, mussten nun STD NMR-Experimente erfolgen.

3.4 *STD NMR-Experimente*

3.4.1 **Bestimmung der Proteinsättigung**

Durch die STD NMR-Experimente sollten die Bindungsinteraktionen auf atomarer Ebene aufgeklärt werden. Von besonderem Interesse war hierbei der Beitrag des Pro158, dessen Substitution im Alaninscan keine Auswirkung auf die Bindung hatte.

Zunächst musste das Prionprotein, das in einem Protonen-Acetatpuffer (pH 5.0) vorlag, gegen einen deuterierten Acetatpuffer (pH 4.5) dialysiert werden. Dies wurde unter Verwendung einer Ultrafiltration-Zentrifugationseinheit mit einer Ausschlussmasse von 10 kDa durchgeführt. Allerdings kam es auf Grund des hydrophoben Charakters des Proteins zu einer starken Bindung an die Filtermembran und so zu einem erheblichen Verlust an Protein. Dieser Effekt konnte jedoch durch mehrfaches Wiederverwenden der Filtereinheit beträchtlich minimiert werden.

Für einen optimalen Sättigungstransfer vom Protein auf den Liganden ist eine ausreichende Sättigung des Proteins nötig. Die Optimierung der Sättigung kann über verschiedene Parameter erfolgen. Dies kann über die Sättigungszeit und die Energie des Sättigungspulses gesteuert werden. Zum anderen kann die Sättigung durch die geeignete Wahl der Einstrahlfrequenz erhöht werden. Um die Parameter für eine optimale Sättigung des Proteins zu bestimmen, wurden daher verschiedene STD-Experimente durchgeführt, bei denen die Sättigungsleistung zwischen 33 dB und 39 dB und die Einstrahlfrequenz zwischen -700 Hz (-1.0 ppm) und -1400 Hz (-2.0 ppm) variiert wurden. Die Experimente wurden ohne $T_{1\rho}$ -Filter aufgenommen, so dass die Proteinsignale nicht unterdrückt wurden. Bei einer Sättigungsleistung von 33 dB wurde bei einer Einstrahlfrequenz von -700 Hz eine Sättigung von 19% erreicht. In diesem Bereich der Sättigungsfrequenz ist jedoch die Gefahr sehr hoch, dass auch Signale des Liganden mit gesättigt werden und so Artefakte entstehen. Aus diesem Grund wurden die STD NMR-Experimente bei einer Frequenz von -1400 Hz oder -1050 Hz durchgeführt, obwohl die Sättigung in diesem Fall nur 12 bzw. 15% betrug. In Abbildung 31 sind drei der erhaltenen Spektren der Sättigungsexperimente für verschiedene Parameter dargestellt.

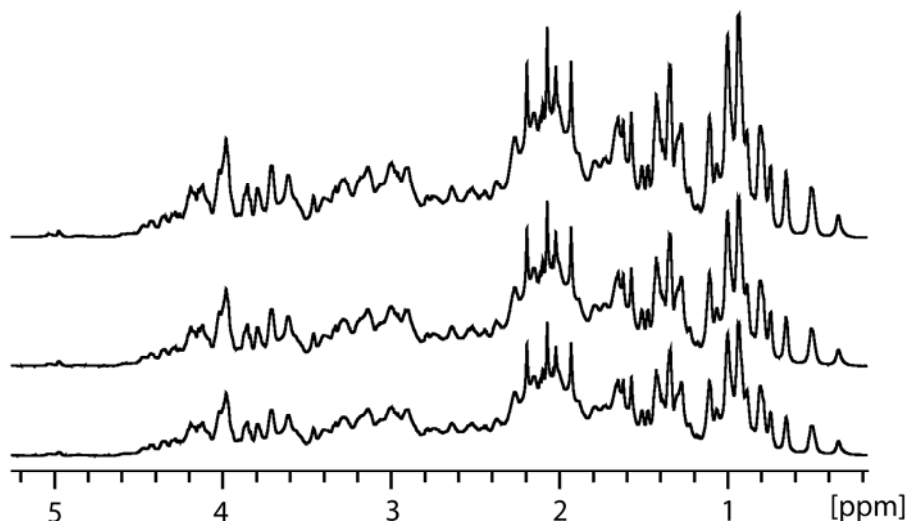


Abbildung 31: Differenz-Spektren des humanen Prionproteins (90-230) bei verschiedenen Sättigungsfrequenzen mit einer Sättigungszeit von 4 s. Aufgenommen auf einem 700 MHz Spektrometer, in 5 mM Na-Acetatpuffer-*d*4, pH 4.5. **Oben:** Bei einer Einstrahlfrequenz des Sättigungspulses von -700 Hz beträgt die Proteinsättigung 19%. **Mitte:** Bei einer Einstrahlfrequenz von -1050 Hz werden 15% Sättigung des Proteins erreicht. **Unten:** Im Falle einer Einstrahlfrequenz von -1400 Hz beträgt die Sättigung nur noch 12%.

Die relativ niedrige Sättigung des Proteins resultiert aus der geringen Masse des globulären Teils des Proteins, der mit 13.0 kDa an der Grenze des Spindiffusionslimits liegt. Zudem sind in den Spektren mehrere scharfe Signale erkennbar, die aus dem ungefalteten N-Terminus des Proteins stammen. Diese Signale würden auch in Experimenten mit $T_{1\rho}$ -Filter nicht unterdrückt werden, aber da die entsprechenden Molekülgruppen keine Bindung mit dem Protein eingehen und daher auch keine Sättigung erfahren sollten, würden sie in dem gebildeten Differenzspektrum nicht auftreten.

3.4.2 STD NMR-Experimente mit Peptiden aus dem Alaninscan

Die *off-rate* des Peptids **1** ($^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$) beträgt 0.01 s^{-1} , was einer mittleren Verweildauer des Liganden von 70 s entspricht. Die Kinetik der Bindung ist für NMR-Experimente in Zusammenhang mit der niedrigen Sättigung zu langsam, daher mussten die STD NMR-Experimente mit den entsprechenden Peptiden aus dem Alaninscan durchgeführt werden (Peptide **10-17**), die deutlich schlechtere Bindungskonstanten besitzen und somit eine bessere Bindungskinetik aufweisen sollten. Hierzu wurden zunächst die Peptide **13** ($^{153}\text{NMHAYPNQ}^{160}$), **14** ($^{153}\text{NMHRAPNQ}^{160}$) und **16** ($^{153}\text{NMHRYPAQ}^{160}$) untersucht, deren K_D -Werte im Bereich von $1030\text{ }\mu\text{M}$ bis $1762\text{ }\mu\text{M}$ lagen. Die Messungen wurden bei 285 K in Natriumacetat-Puffer-*d*4 (pH 4.5) mit einer Sättigungszeit von 2 s durchgeführt. Die Konzentration des Prionproteins (hPrP 90-230) betrug jeweils $4.8\text{ }\mu\text{M}$ und die Peptide wurden in einem 50fachen Überschuss zugegeben, was einer Peptidkonzentration von $240\text{ }\mu\text{M}$

entspricht. Eine Übersicht über die untersuchten Peptide und die angewandten Messparameter ist in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der unterschiedlichen Parameter der STD-Experimente mit den Peptiden **13**, **14**, **16** und **17**. Mit keinem der angegebenen Parameter konnten STD-Effekte der Peptide beobachtet werden.

Peptid	Temperatur [K]	<i>on-res</i> [Hz]
13	285	-1400
14	285	-1400
16	285	-1400
17	285	-1400
17	285	-1050
17	285	-700
17	310	-1400
17	310	-1050
17	310	-700

Die Auswertung der Spektren ergab, dass unter diesen Messbedingungen kein STD-Effekt zu beobachten war. Da zunächst vermutet wurde, dass die Dissoziationskonstante dieser Peptide nicht ausreichend schnell war, wurde das Peptid **17** ($^{153}\text{NMHRY PNA}^{160}$) ebenfalls getestet, obwohl wegen des großen Fehlers, der sich aus dem angelegten Fit bei der Auswertung der SPR-Experimente ergab, eine spezifische Bindung nicht zweifelsfrei angenommen werden konnte. Auch dieses Peptid zeigte unter den oben genannten Bedingungen keinen STD-Effekt. Daraufhin wurde zunächst die Einstrahlfrequenz des *on-resonance* Pulses variiert. Sowohl bei einer Einstrahlfrequenz von -700 Hz als auch von -1050 Hz konnten im Differenzspektrum im Bereich um 2 ppm STD-Signale detektiert werden, die sich jedoch vollständig auf Artefakte zurückführen ließen, welche durch eine teilweise Aggregation des Peptids und einer damit einhergehenden Linienverbreiterung hervorgerufen wurden. Um einerseits die Bindungskinetik weiter zu beschleunigen und andererseits die Aggregation des Peptids zu vermindern, wurde die Messtemperatur auf 310 K erhöht. Auch in diesem Fall konnten keine STD-Signale beobachtet werden. Die unterschiedlichen STD-Spektren, die mit den variierten Parametern erhalten wurden, sind in Abbildung 32 gezeigt.

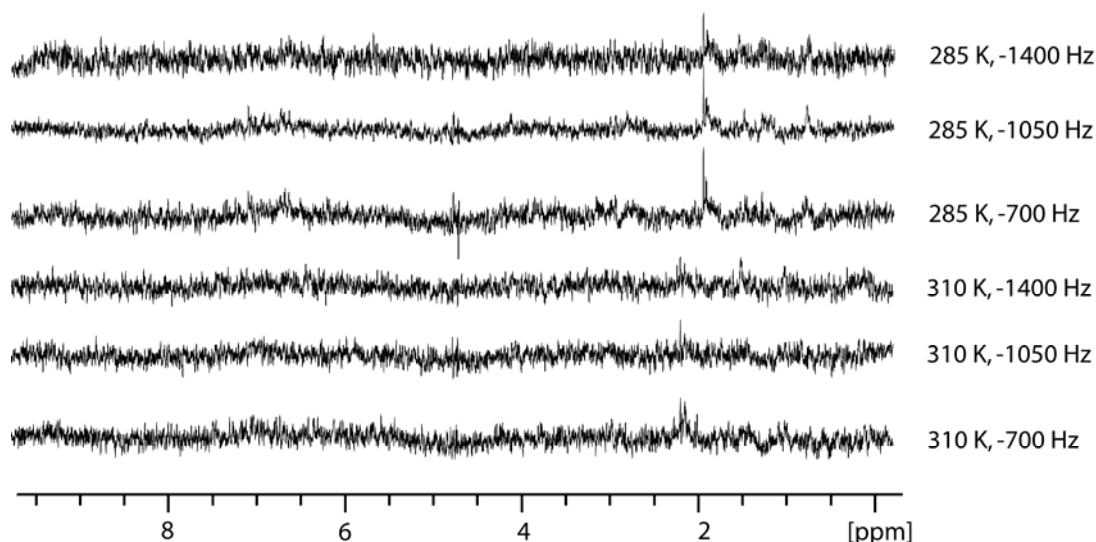


Abbildung 32: Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen STD-Spektren des Peptids **17**, die durch Variation der Parameter erhalten wurden. Alle Spektren wurden auf einem 700 MHz-Spektrometer mit *cryoprobe* und mit einer Sättigungszeit von 2 s und einer Sättigungsleistung von 33 dB in Natriumacetat-*d*3 Puffer (pH 4.7) aufgenommen. Die oberen drei Spektren wurden bei einer Temperatur von 285 K aufgenommen und die Einstrahlpunkte des Sättigungspulses variiert. Die Signale, die bei ca. 2 ppm zu erkennen sind, sind vollständig auf Artefakte zurückzuführen. Bei einer Temperatur von 310 K (untere drei Spektren) treten diese Effekte nicht mehr auf, es sind aber auch keine STD-Signale zu erkennen.

Da unter den getesteten Bedingungen keinerlei STD-Signale zu beobachten waren, sollten die Experimente nun mit dem Peptid **11** ($^{153}\text{NAHRYPNQ}^{160}$) durchgeführt werden.

3.4.3 STD NMR-Experimente mit Peptid 11

Das Peptid **11** ($^{153}\text{NAHRYPNQ}^{160}$) zeigte in den SPR-Studien eine Bindung mit einem K_D -Wert von 1269 μM und erschien daher ebenfalls für STD NMR-Experimente geeignet zu sein. Da jedoch in den vorangegangenen Experimenten mit den Peptiden **13**, **14**, **16** und **17** kein STD-Effekt zu beobachten war, wurde zunächst die *off-rate* des Peptids anhand der erhaltenen SPR-Sensorgramme bestimmt. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der Biaeval-Software 3.0 ein kinetischer Fit über die Sensorgramme der SPR-Experimente gelegt. Dieser zeigte, dass die Assoziationskonstante $k_{\text{on}} = 155 \text{ Ms}^{-1}$ betrug, während eine Dissoziationskonstante k_{off} von 0.0395 s^{-1} erhalten wurde (**Abbildung 33**). Somit beträgt die Verweildauer des Peptids in der Bindungstasche ca. 18 s, anstatt der 70 s Verweildauer des Peptids **1**. Aus der **Abbildung 33** ist ersichtlich, dass es sich hierbei nur um eine Abschätzung der Größenordnung handeln kann, da der Fit gerade im Bereich der Dissoziationsphase einen größeren Fehler aufweist.

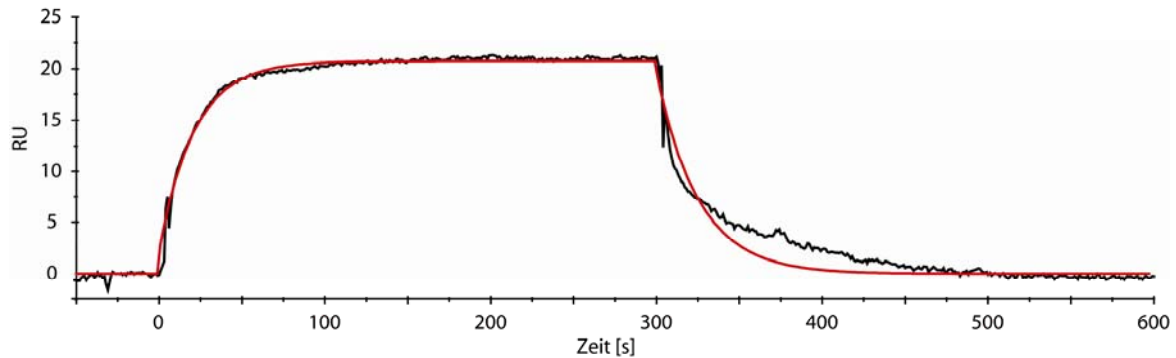


Abbildung 33: SPR-Sensorgramm (schwarz) und kinetischer Fit (rot) von Peptid **11**. Die Konzentration des Peptids betrug $50 \mu\text{M}$. Es wurde eine Assoziationskonstante k_{on} von 155 Ms^{-1} sowie eine Dissoziationskonstante k_{off} von 0.0395 s^{-1} ermittelt.

Da diese Verweildauer immer noch relativ lang ist, wurde die Sättigungszeit in den NMR-Experimenten auf 4 s erhöht. Hierdurch sollten mehr gesättigte Moleküle des Liganden in Lösung detektierbar sein. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration auf $58 \mu\text{M}$ erhöht, um mehr Umsatz pro Zeiteinheit zu gewährleisten. Die Peptide neigen allerdings in höheren Konzentrationen zur Aggregation, weshalb die Peptidkonzentration nur geringfügig auf $290 \mu\text{M}$ erhöht wurde, was einem fünffachen Überschuss des Liganden entspricht.

Die Verlängerung der Sättigungszeit führte jedoch zu einem weiteren Problem. Die in Abbildung 34 gezeigten NMR-Spektren des Peptids **11** zeigen das reine Peptidspektrum (**A**) und die STD-Spektren (**B**, **C**). In den Spektren **B** und **C** sind deutlich die zusätzlichen Signale erkennbar, die in dem reinen Peptidspektrum (**A**) nicht auftreten. Diese Signale stammen aus der ungefalteten N-terminalen Domäne und lassen sich mit dem $T_{1\rho}$ -Filter nicht unterdrücken. Durch die Differenzbildung des *on-resonance* und des *off-resonance* Spektrums sollten diese Signale eigentlich in dem so gebildeten Differenzspektrum nicht mehr auftreten. Da das Differenzspektrum diese Signale trotzdem beinhaltet, muss entweder eine Interaktion der N-terminalen Domäne mit dem Protein oder eine teilweise Sättigung dieser Proteindomäne vorliegen, die bei einem kürzeren Sättigungspuls nicht auftritt. Durch die starken Überlagerungen der Ligandsignale mit diesen zusätzlichen Signalen ist eine Quantifizierung der STD-Effekte des Liganden nicht möglich.

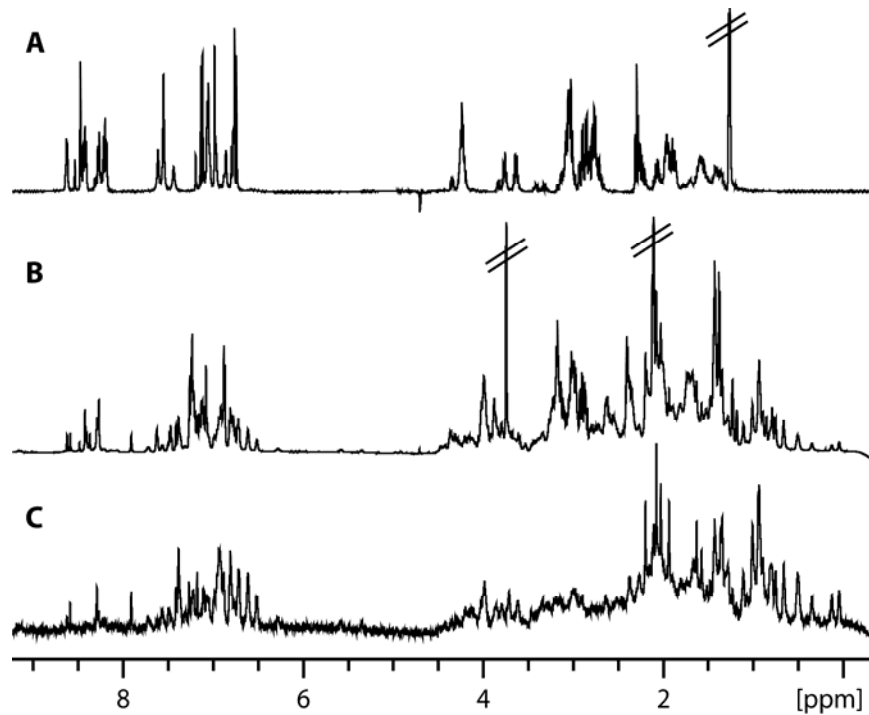


Abbildung 34: Die Abbildung zeigt NMR-Spektren des Peptids **11** ($^{153}\text{NAHRYPNQ}^{160}$). **A:** 500 MHz NMR-Spektrum in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 3.0. Im Amidbereich um 8.5 ppm sind deutlich die Protonen der Amidgruppen zu erkennen. **B:** *off-resonance* Spektrum des hPrP(90-230) und 5 eq des Peptids **11**, aufgenommen bei 310 K und 700 MHz in Natriumacetat- d_3 Puffer (pH 4.7). Zusätzlich zu den Signalen des Peptids sind scharfe Signale des Proteins sichtbar, die im entsprechenden Differenzspektrum (**C**) ebenfalls auftreten. Dies deutet auf eine Sättigung des ungefalteten N-Terminus oder auf eine Interaktion mit dem Protein hin.

Um dieses Problem zu umgehen, sollten die folgenden Messungen mit einem anderem Proteinkonstrukt, dem hPrP(121-230), durchgeführt werden, welches freundlicherweise von M. Elmallah aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. C. Betzel zur Verfügung gestellt wurde. Bei diesem Konstrukt ist nur noch der globuläre Teil des Proteins erhalten, so dass jegliche Interaktion oder Sättigung der N-terminalen Domäne unterbunden ist. Durch die in Kapitel 3.1 erläuterten Probleme bei der Abspaltung des *His-Tags* konnte das Protein jedoch nur mit *His-Tag* versehen erhalten werden. Durch den veränderten isoelektrischen Punkt ist dieses Proteinkonstrukt bei einem pH-Wert von 4.5 nicht stabil und neigt unter diesen Bedingungen vermehrt zur Aggregation. Dieses Konstrukt lag nach der Reinigung in einem PBS-Puffer (pH 7.4) vor, weshalb zunächst versucht wurde das Protein unter Verwendung einer Filter-Zentrifugationseinheit umzupuffern. Es konnten jedoch nur weniger als 5% des Proteins zurückgewonnen werden, da es, neben einem hohen Maße an ausgefallenem Protein, zu einer starken Bindung des verbliebenen Proteins an die Filtermembran kam. Um den Verlust an Protein während des Pufferaustausches zu verringern, wurde mit Dialysekappen dialysiert und das Puffersystem geändert, weshalb alle folgenden Messungen in deuteriertem PBS-Puffer (pH 7.4) durchgeführt wurden. So konnte nicht nur die Proteinstabilität erhöht, sondern auch die Rückgewinnungsrate des Proteins auf 90-100% gesteigert werden.

Für die Bestimmung der Bindungskonstante eines Liganden ist es nötig, die STD NMR-Experimente mit verschiedenen hohen Ligandüberschüssen durchzuführen. Hierzu wurde das humane Prionprotein (121-230) in einer Konzentration von 4.6 μM mit Konzentrationen des Peptids **11** ($^{153}\text{NAHRYPNQ}^{160}$) vermessen, die im Bereich von 125-659 μM lagen. Dies entspricht einem Überschuss des Liganden von 27.5-150 Äquivalenten. Wegen des schwachen STD-Effekts wurde die Messung mit der Ligandkonzentration von 125 μM mit 10k *scans* durchgeführt, um so das Signal zu Rauschverhältnis zu verbessern, während die Messungen der weiteren Konzentrationen mit 4k *scans* aufgenommen wurden.

Um unspezifische Signalbeiträge durch eine partielle Sättigung des Liganden bewerten zu können wurden Blindproben des Liganden bei einer Konzentration von 336.5 μM und 658.5 μM unter sonst identischen Bedingungen aufgenommen. Die aus diesen Spektren erhaltenen Artefakte mussten von den ermittelten STD-Prozenten abgezogen werden.

Sowohl bei den Artefaktspektren, als auch bei den STD-Spektren der proteinhaltigen Proben offenbarte sich bei der Auswertung, dass die Basislinie nicht einheitlich war, sondern stattdessen starke Schwankungen aufwies, die auf die Wasserunterdrückung mittels der WATERGATE-Pulssequenz zurückzuführen war.¹⁹³ Auch die manuelle Korrektur der Basislinie durch verschiedene Korrekturmodi führte zu keinem wesentlich besseren Ergebnis. Ein Beispielspektrum ist in Abbildung 35 gezeigt.

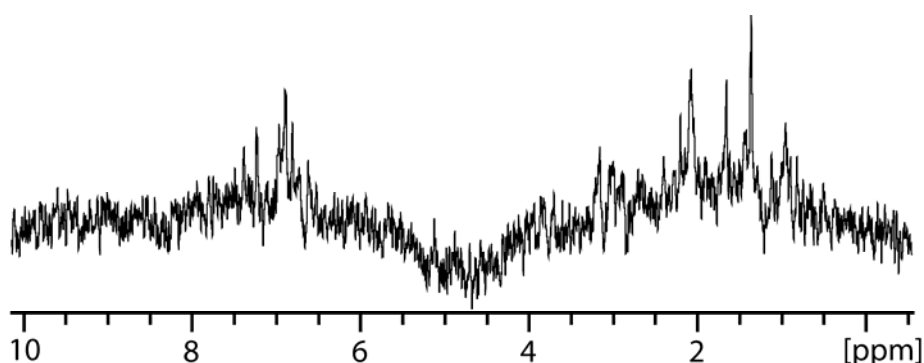


Abbildung 35: Die Abbildung zeigt das Differenzspektrum der STD-Probe mit einer Ligandkonzentration von 187 μM , aufgenommen mit 4k *scans* auf einem 700 MHz Spektrometer mit *cryoprobe* bei 310 K in PBS-Puffer (pH 7.4). Neben den STD-Signalen ist deutlich die uneinheitliche Basislinie zu erkennen.

Trotz der uneinheitlichen Basislinie wurden die Integrale der Signale bestimmt und von den so erhaltenen STD-Prozenten die zuvor bestimmten Artefakte abgezogen. Durch die sehr schwache Sättigung des Proteins lagen die absoluten Werte der STD-Prozente nach dem Abzug der Artefakte im Bereich von 1-3 Prozent. Da diese Prozente nicht den Ligandumsatz berücksichtigen, mussten für die Bestimmung der Bindungskonstante die STD-Amplifikationsfaktoren nach Gleichung 11 berechnet werden.

$$STD_{Ampl} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} * \frac{[L]_{total}}{[P]_{total}}$$

Gleichung 11: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors (STD_{Ampl}). Mit I_0 = Signalintensität des *off-resonance* Spektrums, I_{sat} = Signalintensität des *on-resonance* Spektrums, $[L]_{total}$ = Gesamtkonzentration des Liganden und $[P]_{total}$ = Gesamtkonzentration des Proteins.

Die höchste Konzentration von 658.5 μM konnte hierbei nicht mehr berücksichtigt werden, da die ermittelten Artefakte der Blindprobe größer waren als die STD-Prozente bei gleicher Konzentration. Die Gründe hierfür können unter anderem daran liegen, dass das Peptid in der Blindprobe leichter zu einer partiellen Aggregation neigt, die in der proteinhaltigen Probe nicht im gleichen Maße stattfindet. Dieser Effekt kann bereits bei den niedrigeren Ligandkonzentrationen aufgetreten sein, so dass die Quantifizierung der Signale mit Fehlern behaftet sein kann. Bei der beispielhaften Betrachtung der STD-Amplifikationsfaktoren für die β -Methylgruppe des Alanins, die in Tabelle 4 gezeigt sind, erkennt man, dass die Werte für die niedrigen Konzentrationen größer sind als die der höheren Konzentrationen.

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die berechneten STD-Amplifikationsfaktoren für das Signal der β -Methylgruppe des Alanins bei den unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids 11.

Konzentration [μM]	STD-Amplifikationsfaktor
125	0.47
187	0.39
337	0.28
441	0.33

Die Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren für dieses Signal gegen die Konzentration des Liganden konnte nur unter großen Umständen an das *one-site-binding* Modell gefittet werden. Der erhaltene Fit ist in Abbildung 36 gezeigt.

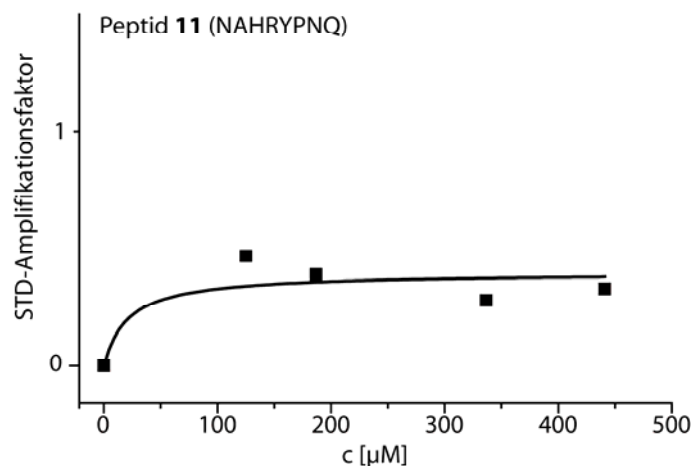


Abbildung 36: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren der β -Methylgruppe des Alanins vom Peptid **11** gegen die Ligandkonzentration. Die schwarze Linie zeigt die grobe Näherung eines Fits nach dem *one-site-binding* Modell. Aus diesem Fit wurde keine Bindungskonstante bestimmt, da die erhaltenen Werte nur als Annäherung an die reellen Werte betrachtet werden können.

Bei der Betrachtung des Fits ist zu erkennen, dass dies nur als sehr grobe Annäherung an die reellen Werte angesehen werden kann. Aus diesem Grund wurde keine Bindungskonstante aus diesem Fit bestimmt.

Da die Bildung der Peptidaggregate vor allem bei höheren Konzentrationen auftritt, wäre eine Möglichkeit, die Titration mit geringerer Proteinmenge durchzuführen, weil in diesem Fall die Ligandkonzentration bei gleichen Überschüssen niedriger wäre. Allerdings ist das Signal-Rausch-Verhältnis schon bei den hier besprochenen Spektren sehr schlecht, da die erreichten STD-Prozente zu klein sind. Eine Erhöhung der Anzahl der *scans* für jede der aufgenommenen Ligandkonzentrationen steht in keinem Verhältnis zu der benötigten Messzeit, da eine Verdoppelung der *scans* und damit Verdoppelung der Messzeit nur zu einem 1.4-fach besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt.

3.4.4 Bestimmung des Bindungssepitops des Peptids 11

Aus den STD NMR-Experimenten kann durch die quantitative Bewertung der STD-Prozente der einzelnen Protonen ein Bindungssepitop des Liganden auf atomarer Ebene erstellt werden.

Da es im Bereich der höchsten Peptidkonzentration, die bei den durchgeführten Experimenten $659 \mu\text{M}$ betrug, zu einer teilweisen Aggregation des Peptids und damit einhergehend zu vermehrten Artefakten in der Messung kam, wurden für die Bestimmung des Bindungssepitops die STD-Prozente bei einer Konzentration von $337 \mu\text{M}$ ausgewertet. Die Abbildung 37 zeigt das entsprechende *off-resonance* und Differenzspektrum.

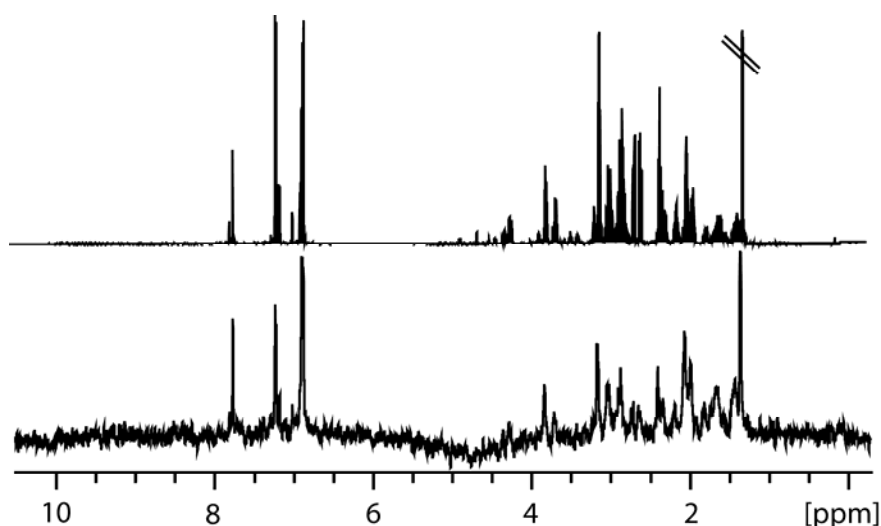


Abbildung 37: STD NMR-Spektren des hPrP (121-230) ($c = 4.6 \mu\text{M}$) und Peptid **11** ($c = 336.5 \mu\text{M}$), aufgenommen mit 4k scans auf einem 700 MHz Spektrometer mit cryoprobe bei 310 K in PBS-Puffer (pH 7.4). **Oben:** off-resonance Spektrum, es sind die Peptidsignale sowie einige nicht unterdrückte Proteinsignale deutlich sichtbar, die jedoch eine geringere Intensität aufweisen. **Unten:** Differenzspektrum (100fach vergrößert). Die Signale im aromatischen Bereich sind vollständig auf Artefakte zurückzuführen, während die Signale im aliphatischen Bereich auf der Protein-Peptid-Interaktion basieren.

Die STD-Effekte der Signale wurden entsprechend Kapitel 3.4.3 quantifiziert und die Artefakt-Prozente analog abgezogen. Die erhaltenen absoluten STD-Prozente wurden auf das Signal mit dem stärksten STD-Effekt normiert, so dass die relativen STD-Prozente erhalten wurden. Diese sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: In der Tabelle sind die absoluten STD-Prozente von denen die Artefakte abgezogen wurden und die hieraus erhaltenen relativen STD-Prozente zusammengefasst.

Aminosäure	δ [ppm]	abs. STD [%]	rel. STD [%]
Pro158- δ	3.71	0.13	13
Arg156- δ /Tyr157- β	3.15	0.07	7
His155- β	3.03	0.27	27
Asn153- β	2.87	0.15	15
Asn159- β	2.71	0.25	25
Pro158- β /Gln160- γ	2.38	0.45	46
Gln160- β	2.20	0.99	100
Pro158- γ	2.03	0.35	35
Arg156- β	1.65	0.80	80
Arg156- γ	1.45	0.67	67
Ala- β	1.35	0.37	37

Der stärkste STD-Effekt wird für die β -Protonen des Gln160 beobachtet, der nach Abzug der Artefakte noch knapp 1% beträgt, weshalb alle anderen STD-Prozente auf dieses Signal

normiert wurden. Die γ -Protonen des Gln160 zeigen ebenfalls einen deutlichen STD-Effekt, so dass eine starke Beteiligung des Glutamins an der Bindung angenommen werden muss. Das Arginin156 ist ebenfalls stark an der Bindung beteiligt, wie die starken relativen STD-Effekte von 80% auf den β - und 67% auf den γ -Protonen beweisen. Die δ -Protonen zeigen allerdings nur noch einen schwachen STD-Effekt, weshalb sich diese in einer größeren Entfernung zum Protein befinden müssen. Das Alanin zeigt einen relativen STD-Effekt von 37%, der durch eine schwächere Interaktion der β -Protonen mit dem Protein hervorgerufen wird. In der nativen Sequenz liegt an dieser Stelle das Met154, dessen Substitution einen starken Effekt auf die Bindung hat. Es ist daher wahrscheinlich, dass hier eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein auftritt, die von der Methylgruppe des Alanins nur geringfügig kompensiert werden kann.

Inwieweit die Seitenketten des His155 und des Asn159 an der Bindung beteiligt sind, kann aus den STD Experimenten nicht endgültig geklärt werden. Die Substitution dieser Aminosäuren durch Alanin führt zu einer starken Abschwächung der Bindung, aber die jeweiligen β -Protonen zeigen nur einen schwachen STD-Effekt von 27% für das Histidin bzw. 25% für das Asparagin. Eine Möglichkeit der Interaktion ist hierbei die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Imidazolring des Histidins bzw. der Säureamidgruppe des Asparagins und entsprechenden Gruppen des Proteins. Diese Interaktionen können jedoch nicht in den STD NMR-Experimenten detektiert werden, da die entsprechenden Protonen des Liganden gegen Deuterium ausgetauscht wurden. Die Substitution des Tyr157 führte ebenfalls zu einer starken Verschlechterung der Bindungseigenschaften. In den SPR-Studien konnte für dieses Peptid (Peptid **14**) ein K_D -Wert von 1030 μ M ermittelt werden. Die relativen STD-Prozente liegen für die β -Protonen jedoch nur im Bereich von 7% und überlagern sich zudem noch mit denen δ -Protonen des Arginins. Des Weiteren sind die Signale der aromatischen Protonen des Tyrosins im Differenzspektrum vollständig auf Artefakte zurückzuführen. Auch in diesem Fall ist daher die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe und einer entsprechenden Gruppe des Proteins wahrscheinlich. Dies steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen von B. Claasen, die das Tyr157 gegen 4-Fluor-Phenylalanin substituierte und für das so erhaltene Peptid eine Verschlechterung der Bindungskonstante um den Faktor 5 nachweisen konnte, da die Hydroxylgruppe als Wasserstoffbrückendonator fungiert.¹⁸⁵

Auffällig sind jedoch die starken STD-Effekte auf den Methylengruppen des Prolins. Die SPR-Ergebnisse des Alaninscans ließen darauf schließen, dass das Prolin für die Bindung nicht essentiell ist. Allerdings zeigen sich für die β -Protonen 46% relativer STD-Effekt und für die γ -Protonen 35% STD-Effekt, wobei der STD-Effekt der β -Protonen allerdings kritisch zu bewerten ist, da es zum einen zu Signalüberlagerungen mit den Signalen des γ -Protons des

Gln160 kommt, zum anderen bleibt diese Methyleinheit im Falle der Substitution gegen Alanin als β -Methylgruppe erhalten, so dass eine Interaktion dieser Molekülgruppe weder bestätigt noch ausgeschlossen werden kann. Für eine, zumindest anteilsweise, Beteiligung des Prolins an der Bindung spricht, dass auch die γ - und δ -Protonen des Prolins schwächere STD-Effekte zeigen.

Für eine bessere Übersicht ist das Bindungsepitop des Peptids **11** in Abbildung 38 noch einmal graphisch dargestellt.

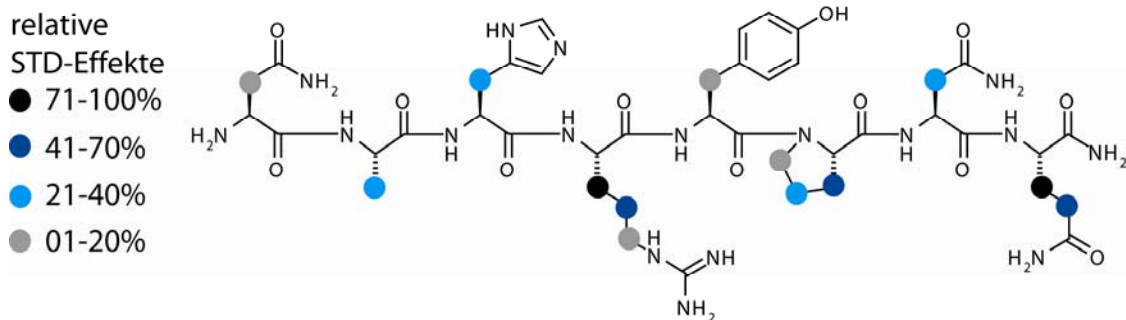


Abbildung 38: Bindungsepitop des Peptids **11** ($^{153}\text{NAHRYPNQ}^{160}$). Die unterschiedliche farbliche Abstufung zeigt die jeweiligen relativen STD-Prozente der entsprechenden Protonen, wobei die α -Protonen nicht ausgewertet werden konnten, da ihre Resonanzfrequenzen sich im Bereich der Lösungsmittelunterdrückung befinden. **Schwarz:** Relative STD-Prozente im Bereich von 71-100%, die **mittelblauen** Markierungen verweisen auf Molekülgruppen mit einem relativen STD-Effekt von 41-70%, die **hellblau** markierten Molekülgruppen haben noch einen relativen STD-Effekt von 21-40%, während die **grau** markierten Gruppen nur noch einen schwachen relativen STD-Effekt von 1-20% aufweisen. Das so erhaltene Bindungsepitop deckt sich sehr gut mit dem des Alaninscans.

Der Vergleich der aus dem Alaninscan und den STD NMR-Experimenten erhaltenen Bindungsepitope zeigt sehr gute Übereinstimmungen. Die Aminosäuren, die im Falle der Substitution gegen Alanin zu einem deutlichen Verlust der Bindungsstärke führten, zeigen in den STD NMR-Experimenten ebenfalls signifikante STD-Effekte. Besonders ausgeprägt ist dies bei Arg156 und Gln160. Die Substitution des Asn153 und des Tyr157 hatte einen vergleichsweise geringeren Einfluss auf die Bindungsstärke und auch in den STD-Experimenten sind für beide Aminosäuren nur geringe STD-Effekte zu beobachten. Die einzige Ausnahme stellt hierbei das Prolin dar, das, wie oben beschrieben, starke STD-Effekte aufweist, jedoch im Falle der Substitution zu keiner Abschwächung der Bindungskonstanten führt. Basierend auf diesen Daten wurden die Wechselwirkungen durch *molecular modeling* weiter analysiert, so dass die genaue Interaktion einzelner Molekülgruppen, die im STD NMR-Experiment nicht detektiert werden konnte, nun *in silico* untersucht werden.

3.5 *Molecular docking des Peptids 1 mit dem PrP^C*

Das Bindungsepitop, das aus den SPR-Experimenten des Alaninscans und den STD NMR-Experimenten erhalten wurde, kann als potentielle Leitstruktur für die weitere Entwicklung neuer Liganden des PrP^C dienen. Das *molecular docking* ist hierbei eine geeignete Methode, um die genauen Wechselwirkungen zwischen den Molekülgruppen von Protein und Ligand darzustellen.

In dieser Arbeit wurde mit der von Zahn *et al.* aufgeklärten NMR-Struktur des humanen Prionproteins 121-230 gearbeitet (PDB: 1qm2), die den gesamten globulären Teil des Proteins umfasst.⁶⁵ Diese Struktur wurde mit der Software Sybyl 7.5 zunächst auf Fehler überprüft, im Anschluss mit Ladungen des Typs Gasteiger-Hückel versehen und die Struktur über 300 Iterationen energetisch minimiert.^{194;195} Die so erhaltene Energie des Proteins betrug -114 kcal/mol.

Das Peptid ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ (**1**) wurde ebenfalls mit der Software aufgebaut, wobei eine *random* Konformation gewählt wurde. Der N-Terminus wurde als freies Amin und der C-Terminus als Säureamid erstellt. Um die Konfiguration des Peptids energetisch zu minimieren wurde zunächst die aufgebaute Struktur minimiert und anschließend eine molekulardynamische Simulation (MD) durchgeführt, da durch die Minimierung die Gefahr besteht in einem lokalen Minimum zu enden, das nicht zwangsläufig der wirklichen Konformation der niedrigsten Energie entspricht. Die aus der MD erhaltene Konformation für das Peptid besaß eine Energie von +42.8 kcal/mol und konnte für die nun folgenden *docking* Experimente zugrunde gelegt werden.

Das Peptid **1** wurde in dem Bereich der Bindungsregion, die aus den ¹H, ¹⁵N-HSQC und den MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimenten erhalten wurde, vorpositioniert und die räumliche Anordnung einiger Molekülgruppen des Liganden so verändert, dass sie gut mit den Ergebnissen aus den STD NMR-Experimenten übereinstimmten. Das eigentliche *docking* wurde mit der in Sybyl implementierten Software Flexi-DockTM unter der Verwendung von Ladungen des Typs Gasteiger-Hückel und einer maximalen Anzahl an Iterationsschritten von 300000 durchgeführt.

Da die Ausrichtung des Peptids innerhalb der Proteinbindung nicht genau bekannt ist, wurden die Positionen von N- und C-Terminus variiert. Die beiden besten Strukturen, die aus dem *docking* erhalten wurden, sollen hier kurz erläutert werden.

Zunächst wurde der C-Terminus des Peptids in den Bereich um das Arg220 platziert, während der N-Terminus in Richtung des Met166 orientiert war. Die beste Positionierung des Liganden, die aus dem *docking*-Experimenten erhalten wurden, ist in Abbildung 39 gezeigt. Die Bindungsenergie, die nach Gleichung 12 berechnet wurde, beträgt -31.0 kcal/mol.

$$E_{\text{Bindung}} = E_{\text{Komplex}} - (E_{\text{Ligand}} + E_{\text{Protein}})$$

Gleichung 12: Berechnung der Bindungsenergie des gedockten Liganden (E_{Bindung}). Mit E_{Komplex} = berechnete Energie des Proteinligandkomplexes, E_{Ligand} = ermittelte Energie des Liganden, E_{Protein} = ermittelte Energie des Proteins.

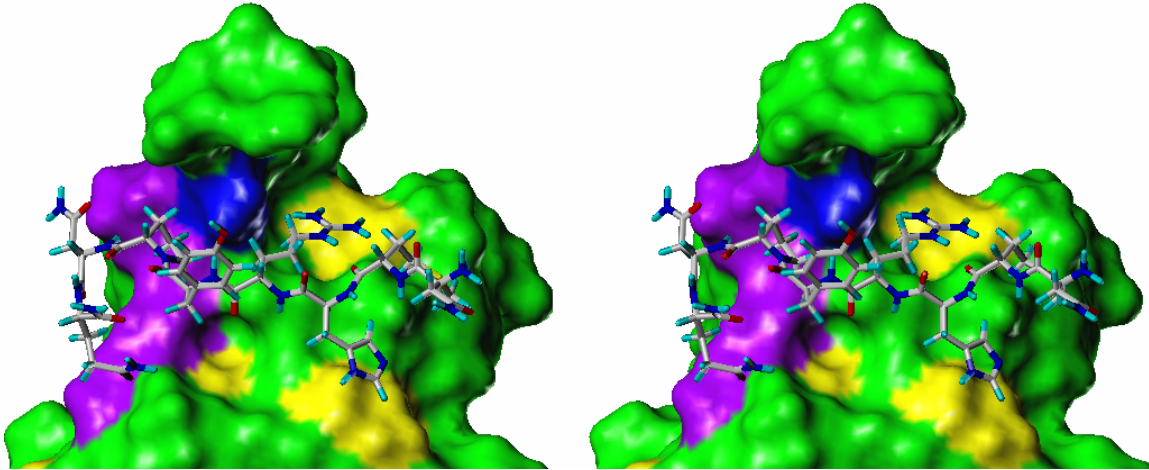


Abbildung 39: Darstellung des *docking* Ergebnisses für das Peptid 1 in der *crossed-eye* Darstellung mit der berechneten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Die Darstellung zeigt die Lage des Peptids relativ zu dem Prionprotein. Der Bereich, der aus dem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Experimenten als Bindungsbereich erhalten wurde, ist in **gelb** ($\Delta\delta = > 0.01$ ppm), **blau** ($\Delta\delta = > 0.015$ ppm) und **violett** ($\Delta\delta = > 0.02$ ppm) eingefärbt. Die Abbildung verdeutlicht, dass das Peptid relativ gut in dem vorgegebenen Bereich positioniert ist. Die Lage des Arg156 und des Gln160 des Peptids steht in guter Übereinstimmung mit dem STD-Bindungssepitop. Die Bindungsenergie des Komplexes beträgt -31.0 kcal/mol.

Die genaue Analyse der Lage des Peptids ergab, dass sich in diesem Fall eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Peptid und Protein ausgebildet, die zwischen der Säureamidgruppe des Glutamin und dem Ser132 des Proteins lokalisiert ist. Das Asn159 des Peptids zeigt in diesem Falle mit seiner Säureamidgruppe direkt zu der hydrophoben Seitenkette des Gln223 vom Protein, obwohl hier die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung durch geringfügige Konformationsänderungen durchaus möglich wäre. Das Prolin ist mit den γ - und δ -Methylengruppen in einer hydrophoben Tasche im Bereich des Ala224, was ebenfalls im Einklang mit den STD NMR-Ergebnissen steht. Auch die Tatsache, dass das Tyrosin und das Methionin des Peptids vom Protein weggedreht vorliegen, passt zu den Ergebnissen des Bindungssepitops, das aus den STD Experimenten erhalten wurde. Im Falle des Arginins liegen jedoch vor allem die δ -Protonen im Bereich einer hydrophoben Tasche. Dies stimmt nicht mit dem experimentellen Bindungssepitop überein. Zudem liegt die Guanidiniumgruppe des Arginins ebenfalls in einer hydrophoben Umgebung. Eine bessere Übereinstimmung zwischen den *docking*-Ergebnissen und den experimentellen Daten wird jedoch für den Fall erhalten, indem das Peptid mit seinem N-Terminus im Bereich des Arg220 vorpositioniert wird (Abbildung 40).

Die Bindungsenergie, die für diesen Komplex erhalten wurde, beträgt -36.2 kcal/mol und ist somit 5 kcal/mol niedriger als die der zuvor berechneten Struktur. Diese niedrigere Energie ist vor allem auf die beiden zusätzlichen H-Brückenbindungen zurückzuführen, so dass insgesamt drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Protein auftreten. Diese werden zwischen dem Ser135 vom Protein und dem Asn153 des Peptids gebildet.

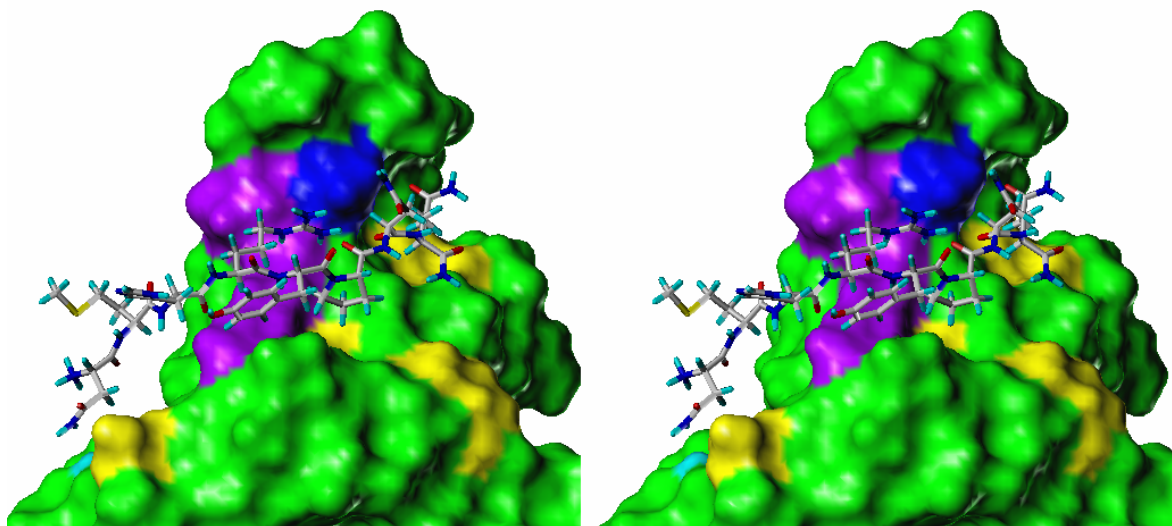


Abbildung 40: Darstellung des *docking*-Ergebnisses für das Peptid **1** in der *crossed-eye* Darstellung mit der berechneten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Der Bindungsbereich ist entsprechend der Veränderung ihrer chemischen Verschiebung in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Experimenten eingefärbt: **gelb** ($\Delta\delta = > 0.01$ ppm), **blau** ($\Delta\delta = > 0.015$ ppm) und **violett** ($\Delta\delta = > 0.02$ ppm). Das Peptid liegt gestreckt auf dem Protein und kann diverse konstruktive Wechselwirkungen eingehen. Unter anderem werden zwei zusätzliche H-Brückenbindungen ausgebildet, die in dem zuvor erfolgten *docking* nicht auftraten. Dies ist ein Grund für die mit -36.2 kcal/mol um 5 kcal/mol niedrigere Bindungsenergie des Komplexes.

In den STD Experimenten zeigte das Asn153 nur schwache STD-Prozente, im Alaninscan war jedoch eine Abnahme der Bindungsaktivität zu beobachten. Dies steht in guter Übereinstimmung zu den erhaltenen *docking*-Ergebnissen, in denen die β -Methylengruppe vom Protein etwas weggedreht vorliegt und dadurch nicht in direkten Kontakt mit dem Protein kommt. Das Arg156 des Peptids bildet mit seiner Guanidiniumgruppe eine H-Brückenbindung zu der Carbonylgruppe des Arg220 vom Protein aus. Zusätzlich liegen die Methylengruppen des Arg156 direkt auf den Methylengruppen des Arg220 vom Protein. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den STD NMR-Ergebnissen. Die Carbonylgruppe des Histidins bildet eine weitere H-Brückenbindung aus, die zu der Guanidiniumgruppe des Arg220 orientiert ist. Auch im Falle des Asn159, das keinen nennenswerten STD-Effekt für die β -Methylengruppe zeigt, stimmen die Ergebnisse gut überein, da auch im Dockingergebnis diese Gruppe vom Protein wegzeigt. Die STD-Effekte des Gln160 aus dem Peptid können gut durch die hydrophobe Wechselwirkung mit der Methylgruppe des Ala224 erklärt werden.

3.6 Untersuchung der Peptide im Aggregationsassay

Bisher konnte für das Peptid $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) in einem oxidativen metallkatalysierten *in vitro* Aggregationsassay ein aggregationsinhibitorisches Potential nachgewiesen werden. Für das Peptid $^{149}\text{YYRENMHR}^{153}$ (**18**) konnte dieser Effekt, ebenso wie für das kombinierte Peptid $^{149}\text{YYRENMHRYPNQ}^{160}$ (**19**), nicht nachgewiesen werden. Obgleich diese Peptide ebenfalls an das humane Prionprotein binden und die Bindungskonstante für das Peptid **18** mit $21\ \mu\text{M}$ sogar gleichstark ist, wie die des Peptids **1**, dessen Bindungskonstante auf $25\ \mu\text{M}$ bestimmt werden konnte. Das Peptid **19** bindet mit $K_D = 140\ \mu\text{M}$ nur unwesentlich schlechter.¹⁸⁵ Für eine weitere Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften, die für die weitere Entwicklung eines möglichen anti-TSE-Wirkstoffes notwendig ist, musste zum einen der Mechanismus der Aggregationsinhibition geklärt werden und zum anderen der Einfluss der einzelnen Aminosäuren dieser Sequenz geprüft werden.

3.6.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Der erste Schritt für die Aufklärung des Mechanismus der Aggregationsinhibition war die Untersuchung der Proteinstruktur nach dem erfolgten Aggregationsassay. Der von L. Redecke entwickelte Assay basiert auf der oxidativen Schädigung des Proteins, die durch elementares Kupfer katalysiert wird, wobei die *in situ* erzeugten oxidativen Spezies hauptsächlich die Seitenketten des Proteins oxidieren.¹⁰⁰ Betroffen sind hiervon vor allem Methionin und aromatische Seitenketten.¹⁹⁶ Diese Schädigung des Proteins führt zu einer Destabilisierung der Struktur und letztlich zu dem Konformationswechsel des Prionproteins in die PrP^{Sc} Konformation. Im Falle der Aggregation des Proteins in Abwesenheit jeglicher Peptide konnte für das aggregierte Protein eine eindeutige β -Faltblattstruktur nachgewiesen werden. Um den Einfluss der Peptide auf die Struktur des Proteins aufzuklären, sollten daher die Aggregationsassays mit den Peptiden **1**, **18** und **19** durchgeführt werden und die aus dem Assay erhaltenen Proteinproben mittels CD-Spektroskopie untersucht werden. Hierzu war zunächst die Synthese der Peptide **18** und **19** nötig.

Die Peptide **18** ($^{149}\text{YYRENMHR}^{153}$) und **19** ($^{149}\text{YYRENMHRYPNQ}^{160}$) wurden durch Festphasenpeptidsynthese mittels eines Syntheseroboters dargestellt. Die Ansatzgröße betrug für beide Peptide $30\ \mu\text{M}$ und wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Nach beendeter Synthese und anschließender Abspaltung vom Harz wurden die Peptide mittels *RP*-HPLC gereinigt. Die Ausbeute betrug 66% für das Peptid **18** und 28% für das Peptid **19**.

Für die Aggregationsassays wurde das hPrP(90-230) in einer Konzentration von $210\ \mu\text{M}$ in einem $10\ \text{mM}$ Natriumacetatpuffer (pH 5.0) eingesetzt. Die Peptidkonzentration betrug $1500\ \mu\text{M}$, was einem siebenfachen Überschuss an Peptid über Protein entspricht. Nach

erfolgter Durchmischung der Proben wurden Kupferplättchen mit einem Gewicht von 15-20 mg hinzugegeben und die Proben für drei Stunden bei 37 °C inkubiert.¹⁰⁰ Nach anschließender Zentrifugation wurde aus einem Teil des Überstands die Proteinkonzentration der Lösung mittels eines Bradford-Assays bestimmt.¹⁹⁷ Hierbei konnten die Ergebnisse von B. Claasen bestätigt werden. Die Aggregation des Prionproteins führt in Abwesenheit jeglicher Peptide zu einem 95%igen Verlust des Proteins. Wird das Peptid **1** hinzugegeben, beträgt der Verlust an Protein nur 20%, es verbleiben also 80% des Proteins in Lösung. In Anwesenheit des Peptids **18** beträgt der Verlust an Protein 84%, im Falle des Peptids **19** sogar 97%.

Der verbliebene Teil des Überstandes wurde für die CD-spektroskopische Untersuchung verwendet. Hierzu wurden die Proben um den Faktor 12.5 verdünnt, was einer Proteinkonzentration von 16.8 µM entspricht, sofern kein Protein durch Aggregation verloren geht. Die Messungen erfolgten an einem Jasco J-810 Spectropolarimeter bei einer Temperatur von 293 K. Es wurde über einen Bereich von 190-250 nm mit einem Intervall von 1 nm gemessen. Die Messungen der reinen Peptide, die für eine Bewertung der vorherigen Proben nötig waren, erfolgten unter identischen Bedingungen mit einer Konzentration der Peptide von 250 µM.

Die Vermessung der Proteinproben, die aus dem Aggregationsassay unter Zusatz von Peptid **1** erhalten wurden, zeigten ein CD-Spektrum, das fast identisch mit dem Spektrum des nativen hPrP ist. Der Vergleich mit dem CD-Spektrum des reinen Peptids zeigt, dass auf den ersten Blick kein Anteil des Peptids an dem CD-Spektrum zu erkennen ist (Abbildung 41).

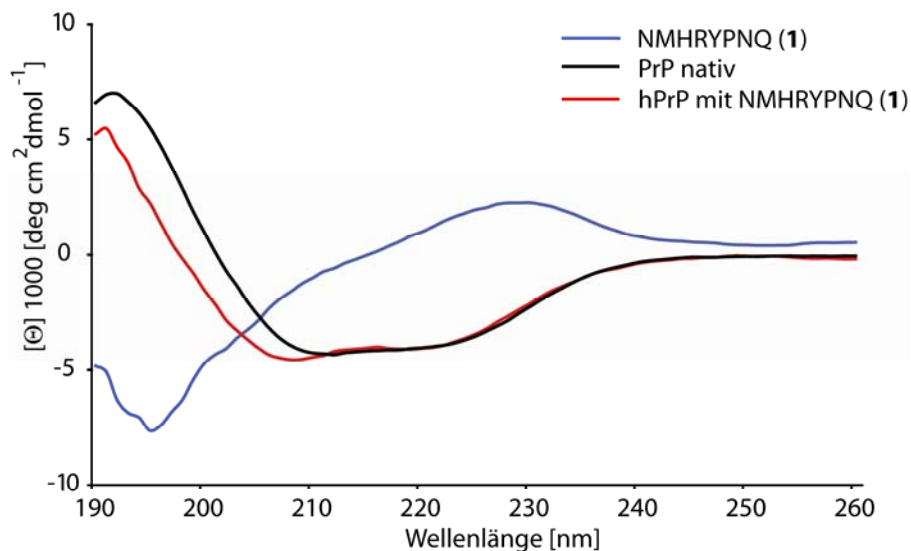


Abbildung 41: Blau: CD-Spektrum des Peptids **1** (¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰). Das Peptid zeigt eine *random coil* Struktur. **Schwarz:** CD-Spektrum des nativen Prionproteins (hPrP^C). Der starke α -helicale Anteil ist deutlich sichtbar. **Rot:** Das CD-Spektrum des hPrP^C und einem siebenfachen Überschuss an Peptid **1** nach dem Aggregationsassay. Die Kurve ist fast identisch mit der des nativen PrP.

Für eine genaue Analyse des Anteils der einzelnen Sekundärstrukturelemente war es nötig, die erhaltenen CD-Spektren mit Datenbankeinträgen zu vergleichen. Hierzu wurde die von Perez-Iratxeta *et al.* entwickelte online-Software *K2D2* und die von Lees *et al.* entwickelte Software *CDtool* verwendet.^{182;198} Die *K2D2* Software ist wesentlich einfacher programmiert und liefert daher nur Daten über den Anteil von α -Helix und β -Faltblattanteilen, wohingegen *CDtool* zusätzlich *random coil*- und *turn*-Anteile angibt.

Die Auswertung ergab für das hPrP^C einen α -Helixanteil von 74% bei Auswertung mithilfe der *K2D2*-Software und von 77% α -Helixanteil unter Verwendung der *CDtool*-Software. Die erhaltenen Ergebnisse weichen etwas voneinander ab, liegen jedoch in der gleichen Größenordnung. Auch der Anteil an β -Faltblattstrukturen stimmt mit 1.7% (*K2D2*) und 1% (*CDtool*) gut überein. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Sekundärstrukturelementanteile, die durch Datenbankabgleich der beiden verwendeten Programme erhalten wurden.

Probe	Software	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	<i>random coil/turn</i> [%]
PrP nativ	<i>K2D2</i>	74	2	-
PrP nativ	<i>CDtool</i>	77	1	22
Peptid 1	<i>K2D2</i>	(11)	(30)	-
Peptid 1	<i>CDtool</i>	1	8	90
PrP mit Peptid 1	<i>K2D2</i>	76	2	--
PrP mit Peptid 1	<i>CDtool</i>	20	11	65

Die CD-Kurven des Peptids 1 sind für die Software *K2D2* nicht mehr im Rahmen des maximalen Fehlers zu fitten, der in diesem Fall einen Wert von 40% überschreitet. Deshalb können die berechneten 30% β -Faltblatt sowie die 11% α -Helix nicht als konkretes Ergebnis angesehen werden. Die Software *CDtool* dagegen liefert einen wesentlich besseren Fit der Daten, wenngleich auch hier der Fehler um den Faktor 5 größer ist als im Falle der Analyse der Proteindaten. Die berechneten 90% *random coil*- und *turn*-Anteile sind daher als belastbarer anzusehen, als die Daten, die über *K2D2* erhalten wurden.

Bei der Auswertung der Proben, die einen siebenfachen Überschuss des Peptids 1 enthalten, konnte die Software *K2D2* wiederum nur einen Fit berechnen, der den maximalen Fehler von 40% übersteigt. Obgleich der Anteil an α -Helices von 76% auf den ersten Blick sehr gut mit dem α -Helixanteil des nativen hPrP übereinstimmt, wird anscheinend der Beitrag des Peptids an dem CD-Spektrum von der Software nicht richtig erfasst. Die *CDtool* Software berechnet dagegen einen Anteil von 65% *random coil*-Strukturen und einen α -Helixanteil von nur 20%. Dieses Ergebnis überrascht, da das CD-Spektrum des hPrP mit siebenfachen Überschuss des Peptids 1 dem CD-Spektrum des nativen Prionproteins stark ähnelt.

Allerdings sind die beiden Minima, die typisch für die α -Helix sind, bei der Protein/Peptid-1-Probe verschoben. Zudem ist der Beginn des Anstiegs der Kurven aus dem negativen Bereich in den positiven Bereich von 210 nm im Falle der hPrP^C-Probe und auf 205 nm im Falle der hPrP^C/Peptid 1-Probe verschoben. Dies könnte eine Erklärung für den vermeintlich niedrigen α -Helixanteil sein.

Um die Abweichung der beiden CD-Spektren zu erklären, musste der Anteil des Peptids und des Proteins an dem CD-Spektrum berechnet werden, da sich die Beiträge zum CD-Effekt beider Substanzen addieren. Die Sequenz des Prionproteins (90-230) beinhaltet 141 Aminosäuren, das Octapeptid ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ wird in siebenfachen Überschuss zugegeben, so dass sich ein Beitrag von 56 Aminosäuren ergibt. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:0.4. Allerdings wird hier vernachlässigt, dass der CD-Effekt sich verstärkt, wenn die chromophore Gruppe nicht nur mit dem chiralen Zentrum am α -C-Atom, sondern zusätzlich mit einer übergeordneten chiralen Umgebung, wie z. B. einer α -Helix, in Wechselwirkung tritt.

Für die Berechnung des tatsächlichen Verhältnisses der Anteile von Peptid und Protein an dem CD-Spektrum, wurde für das erhaltene Spektrum mithilfe der Software Origin[®] ein Fit berechnet, der in Abbildung 42 gezeigt ist. Aus den so erhaltenen Daten ergibt sich ein Verhältnis von Protein zu Peptid von 1:0.36, der recht gut mit dem theoretisch berechneten Wert von 1:0.4 übereinstimmt.

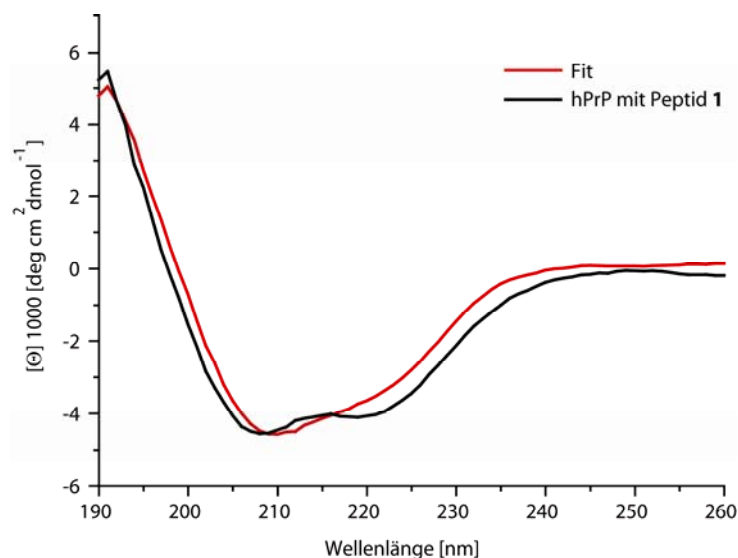


Abbildung 42: Schwarz: CD-Spektrum des hPrP(90-230) und einem zusätzlichen siebenfachen Überschuss des Peptids 1 nach dem oxidativen Aggregationsassay. **Rot:** Der Graph zeigt den Fit, der an das CD-Spektrum von hPrP mit siebenfachem Überschuss an Peptid 1 angelegt wurde. Das so erhaltene Verhältnis von amidischen Bindungen im Protein zu denen im Peptid beträgt 1:0.36 und steht in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von 1:0.4.

Dies ist der Beweis dafür, dass das Peptid **1** die Aggregation des Prionproteins nicht unspezifisch hemmt, sondern dass die α -helixreiche Struktur des zellulären Prionproteins PrP^C erhalten bleibt.

Die CD-Spektren, die für die Aggregationsassays unter Zusatz der Peptide **18** und **19** erhalten wurden, sind in Abbildung 43 gezeigt.

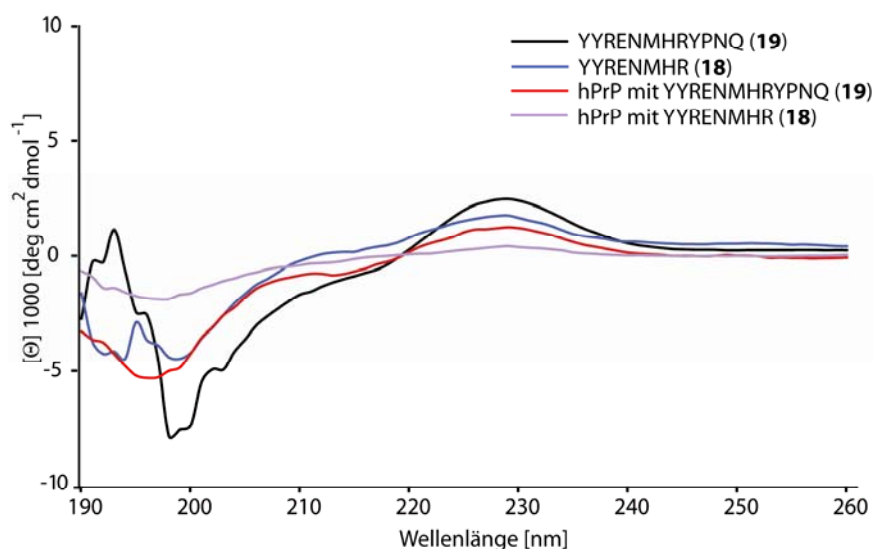


Abbildung 43: **Schwarz:** CD-Spektrum des Peptids **19** (¹⁴⁹YYRENMHRYPNQ¹⁶⁰). Das Peptid zeigt eine *random coil* Struktur. **Blau:** CD-Spektrum des Peptids **18** (¹⁴⁹YYRENMHR¹⁵³), das ebenfalls eine *random coil* Struktur hat. **Rot:** Das CD-Spektrum, das nach dem Aggregationsassay des PrP(90-230) mit siebenfachen Überschuss des Peptids **19** erhalten wurde. **Lila:** CD-Spektrum des PrP und sieben Äquivalenten des Peptids **18**. Die beiden CD-Spektren des Proteins nach dem Aggregationsassay haben Ähnlichkeit mit denen der reinen Peptide. Vermutlich ist der Proteinanteil in der Probe zu gering, so dass reine Peptidspektren erhalten werden.

Die Auswertung der Sekundärstrukturanteile erfolgte analog den vorangegangenen Experimenten. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Sekundärstrukturelementanteile der Experimente mit den Peptiden **18** und **19**, die durch Datenbankgleich der beiden verwendeten Programme erhalten wurden.

Probe	Software	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	<i>random coil/turn</i> [%]
PrP nativ	K2D2	74	1.7	-
PrP nativ	CDtool	77	1	22
Peptid 18	K2D2	6	32	-
Peptid 18	CDtool	2	7	90
PrP mit Peptid 18	K2D2	9	30	-
PrP mit Peptid 18	CDtool	10	31	55
Peptid 19	K2D2	8	21	-
Peptid 19	CDtool	4	19	77
PrP mit Peptid 19	K2D2	11	29	-
PrP mit Peptid 19	CDtool	4	21	75

Die Abweichung in der Berechnung der Sekundärstrukturen des Peptids **18** variieren auch in diesem Fall stark, jedoch zeigt sich bei der Bewertung der Proteinprobe mit siebenfachen Überschuss des Peptids **18** nach dem Aggregationsassay eine gute Übereinstimmung der beiden Programme. Die CD-Spektren ähneln den Spektren des reinen Peptids und die Analyse der Sekundärstrukturen zeigt ebenfalls, dass es bei den Sekundärstrukturanteilen Übereinstimmungen gibt. Da außerdem Anteile des Proteins nicht erkennbar sind, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den Spektren, die aus den Proben des Aggregationsassays erhalten wurden, um die CD-Spektren des Peptids handelt. Dies überrascht nicht, wenn man bedenkt, dass das Peptid in siebenfachen Überschuss zugesetzt wurde und 84% des Proteins als Aggregat ausgefallen sind. Da jedoch die Bewertung des reinen Peptidspektrums von **18** durch die Software *CDtool* stark von der Bewertung durch das Programm *K2D2* abweicht, wurde in diesem Fall ebenfalls ein Fit der gemessenen Kurve durchgeführt, um das Verhältnis der Beiträge von Protein und Peptid am Spektrum zu bestimmen (Abbildung 44).

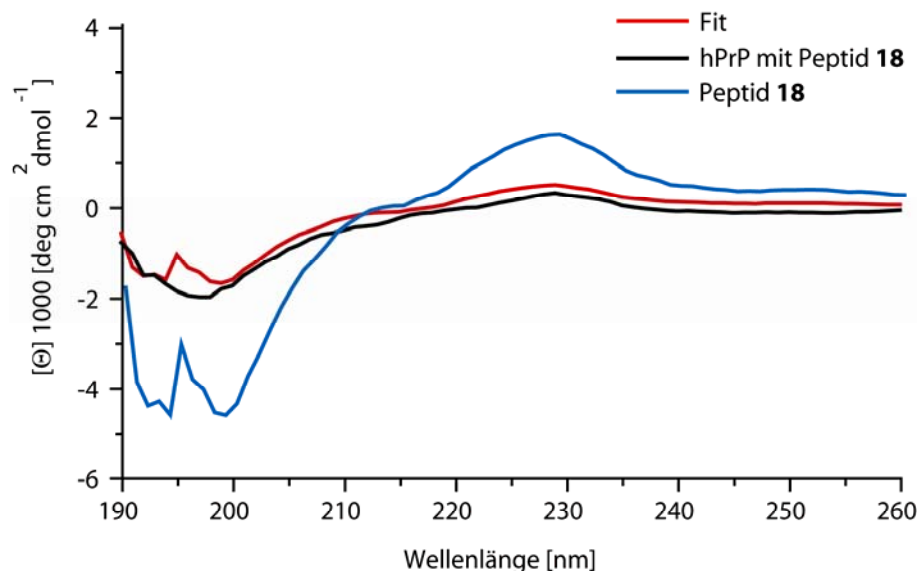


Abbildung 44: Schwarz: CD-Spektrum der Probe nach dem Aggregationsassay von hPrP(90-230) und einem siebenfachen Überschuss des Peptids **18**, sowie der Fit des genannten CD-Spektrums (Rot). Blau: Das gemessene CD-Spektrum des Peptids **18**. Der Vergleich der Kurven zeigt eindeutig die Ähnlichkeit zwischen der Peptidspektrum und dem Spektrum aus der Probe des Aggregationsassays. Die Kurve des Fits deckt sich ebenfalls sehr gut mit der des Peptids. Das so erhaltene Verhältnis von Protein zu Peptid beträgt 1:21.

Die gefitteten Daten ergaben ein Protein/Peptid Verhältnis von 1:21, was letztlich der Beleg dafür ist, dass das gemessene Spektrum der Probe nach dem Aggregationsassay weitestgehend das CD-Spektrum des Peptids **18** zeigt.

Im Falle des Peptids **19** zeigte die Auswertung der Sekundärstrukturen der Probe, die ebenfalls nach dem Aggregationsassay erhalten wurde, dass die Daten fast identisch mit denen des reinen Peptids sind. Ein Fit der gemessenen Kurve war nicht nötig, da schon aus diesen Daten deutlich wurde, dass der gesamte Beitrag des Spektrums von dem Peptid

stammen muss. Auch in diesem Fall ist entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen, da die Gesamtmenge des in Lösung verbliebenen Proteins nur 3% betrug und einen entsprechend kleinen Beitrag zum CD-Spektrum lieferte.

Durch diese Experimente konnte einwandfrei belegt werden, dass die zelluläre Struktur des Prionproteins durch das Peptid $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ in ihrer α -helixreichen Konformation erhalten bleibt, während die Peptide **18** und **19** keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des Proteins haben und daher das Protein in die β -faltblattreiche Konformation übergeht.

3.6.2 Konzentrationsabhängige Inhibition der Prionaggregation

Für die Ermittlung der Peptidkonzentration, bei der es zur halbmaximalen Inhibition der Aggregation (IC_{50}) kommt, ist eine konzentrationsabhängige Untersuchung der Aggregation nötig. Aus diesem Grund wurde der oxidative Aggregationsassay mit unterschiedlichen Überschüssen des Peptids **1** durchgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht über die unterschiedlichen vermessenen Konzentrationen des Peptids **1**, die für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes untersucht wurden.

Äquivalente an Peptid 1	Peptidkonzentration [μM]	lösliches Protein [%]
1	210	13 \pm 3
2	420	32 \pm 9
5	1050	58 \pm 9
7	1470	80 \pm 2
10	2100	99 \pm 3

Die Proteinkonzentrationen, die nach der Aufarbeitung der Proben und Quantifizierung mittels Bradford-Assay erhalten wurden, zeigen eine klare konzentrationsabhängige Inhibition der Aggregation. Die 13% an Restprotein, die im Falle eines Protein-Peptid-Verhältnis von 1:1 in der Lösung verbleiben, stellen in etwa den Wert da, der im Falle der Abwesenheit des Peptids erhalten wird. Aber schon mit einem zweifachen Überschuss des Peptids über Protein kann eine inhibitorische Wirkung beobachtet werden, die dann im Falle eines zehnfachen Überschusses sogar quantitativ ist. Die Datenpunkte zeigen allerdings keine klassische Dosisabhängigkeit, die einen sigmoiden Kurvenverlauf beschreiben würde (Abbildung 45).

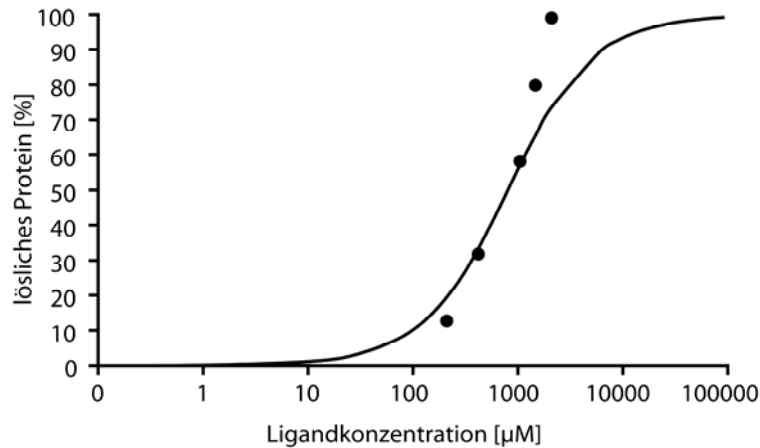


Abbildung 45: Auftragung der prozentualen Proteinkonzentration gegen die Ligandkonzentration. Die Punkte stellen die Messwerte dar, die aus der Bestimmung des löslichen Proteinanteils in den Proben des oxidativen Aggregationsassays erhalten wurden. Die Kurve zeigt den angelegten Fit. Der so erhaltene IC₅₀-Wert beträgt in etwa 655 μM .

Der Fit der Datenpunkte ergab einen IC₅₀-Wert von 655 μM , wobei die Abweichung des Fits zu den gemessenen Datenpunkten sehr groß ist, da die Datenpunkte, die höher als die halbmaximale Konzentration sind, einen steileren Anstieg der Kurve erwarten lassen. Dies steht allerdings in Übereinstimmung mit dem Nukleations-Polymerisationsmodell, nachdem ein exponentieller Anstieg der Aggregation zu erwarten ist und daher auch keine klassische Dosisabhängigkeit erwartet werden kann.

3.6.3 Aggregationsverhalten in einem nichtoxidativen Konversionsassay

Da bei der durch oxidativen Stress ausgelösten Konformationsänderung des Prionprotein zwar die typische β -faltblattreiche Konformation gebildet wird, bisher jedoch nicht die krankheitstypischen amyloiden Fibrillen nachgewiesen werden konnten, sollte die Wirkung der Peptide in einem nichtoxidativen Assay getestet werden. Ein derartiger Assay wurde beispielsweise von Bocharova *et al.* entwickelt, in dem der Konformationswechsel des Prionproteins durch eine Destabilisierung der Struktur durch Zugabe denaturierender Reagenzien erreicht wird.

Das Protein liegt zunächst in einem Puffer vor, welcher 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) enthält. Aus dieser Lösung wird das Protein auf eine Proteinkonzentration von 50 μM in PBS-Puffer verdünnt, der zusätzlich 1 M GuHCl sowie 2.4 M Harnstoff beinhaltet. Das Protein liegt dadurch teilweise entfaltet vor, so dass die Energiebarriere des Konformationswechsels deutlich erniedrigt wird. Amyloide Fibrillen werden nach fünftägiger Inkubation bei 37°C und 600 rpm erhalten.⁹¹

Auf diese Art und Weise wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt, in denen zum einen eine Kontrollprobe und zum anderen je eine Probe, die mit einem siebenfachen

Überschuss an Peptid **1** bzw. Peptid **18** versetzt war. Nach der fünftägigen Inkubation zeigten die so erhaltenen Proben eine deutliche Trübung. Für den Nachweis der Fibrillen wurde eine fluoreszenzspektroskopische Analyse unter Verwendung des Farbstoffes Thioflavin T durchgeführt, der im Falle einer Extinktion bei $\lambda = 450$ nm durch die Interkalation des Farbstoffes in die amyloiden Fibrillen eine Verschiebung des Emissionsmaximums von $\lambda = 438$ nm zu $\lambda = 482$ nm aufweist.¹⁹⁹ In Abbildung 46 sind die erhaltenen Emissionsspektren gezeigt.

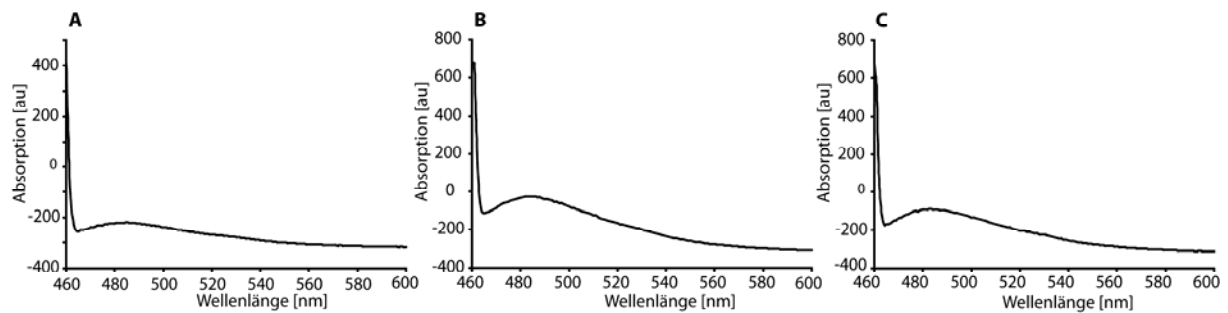


Abbildung 46: Emissionsspektren von Thioflavin-T (ThT) mit einer Anregung bei $\lambda = 450$ nm. **A:** Emissionsspektrum der Kontrollprobe von hPrP(90-230). Die Lage des Emissionsmaximums bei 482 nm beweist die Bildung von amyloiden Fibrillen. **B:** Emissionsspektrum der Probe von hPrP(90-230) mit siebenfachem Überschuss des Peptids **1**. Die Probe zeigt ebenfalls ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 482$ nm. Auch in dieser Probe haben sich folglich amyloide Fibrillen gebildet. **C:** Emissionsspektrum der Probe von hPrP(90-230) mit siebenfachen Überschuss des Peptids **18**. Das Spektrum ist nahezu identisch mit dem Spektrum **B**, so dass sich auch in dieser Probe amyloide Fibrillen gebildet haben.

Die erhaltenen Emissionsspektren zeigen übereinstimmend im Bereich von 482 nm ein deutliches Maximum der Emission, was als eindeutiger Nachweis für amyloide Fibrillen gilt. Es zeigt sich also, dass weder Peptid **1** noch Peptid **18** in diesem Assay einen Einfluss auf die Bildung der amyloiden Fibrillen hat. Dieses Ergebnis lässt sich vor allem durch die Bedingungen des Assays erklären. Durch den hohen Gehalt an denaturierenden Agenzien wird zum einen die vollständige native Faltung des Proteins gehemmt, zum anderen wird auch die Bindungsinteraktion des Proteins mit dem Peptid abgeschwächt oder komplett verhindert. Das Ergebnis des Assays zeigt jedoch auch, dass die protektive Wirkung des Peptids **1** im oxidativen Aggregationsassay direkt mit der Stabilisierung der PrP^C Konformation zusammenhängt und nicht mit einer etwaigen Auflösung von intermediär gebildeten Aggregaten erklärt werden kann. Zudem wird deutlich, dass die Bindung des Peptids an das Protein für diese Wirkung unabdingbar ist, da unter denaturierenden Bedingungen die Umfaltung des PrP unbeeinflusst verläuft.

3.6.4 Aggregationsassay der Peptide aus dem Alaninscan

Da die aggregationsinhibitorische Wirkung nur für das Peptid **1** auftrat und nicht für das Peptid **18** oder das kombinierte Peptid **19**, musste untersucht werden, inwieweit es eine

Korrelation zwischen der Peptidsequenz und der Bindungsstärke in Bezug auf das inhibitorische Potential gibt.

Zunächst wurden die Peptide **2-10** untersucht, die den Alaninscan der Sequenz $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ umfassen. Hierzu wurden die Peptide analog zu den vorangegangenen Aggregationsassays in einem siebenfachen Überschuss relativ zum Protein zugegeben. Die Konzentration des humanen Prionproteins (90-230) betrug bei diesen Experimenten, ebenfalls analog zu den vorherigen, $210\ \mu\text{M}$. Allerdings kam es während dieser Zeit zu den im Abschnitt 3.1 erläuterten Problemen in der Expression im Hinblick auf die Abspaltung des *His-Tag*. Da sich dieses Proteinkonstrukt, das von nun an als hPrP (90-230)-*His-Tag* bezeichnet wird, in den Aggregationsassays absolut identisch verhalten hat wie das hPrP (90-230), konnten alle Experimente mit dem Konstrukt hPrP (90-230)-*His-Tag* durchgeführt werden. Als Vergleichssubstanzen dienten das Peptid **1**, das die Aggregation auf 20% verringert und das Peptid **18**, das keinen Einfluss auf die Aggregation zeigt. Zudem wurde eine Kontrollprobe vermessen, in der kein zusätzliches Peptid enthalten war. Diese diente dazu, die erhaltenen Werte in Verhältnis zu der maximal möglichen Aggregation zu setzen, da jede Proteincharge auch bei identischen Assaybedingungen und identischer Proteinkonzentration geringe Abweichungen in der aggregierten Proteinmenge zeigen kann, wodurch die Vergleichbarkeit der Daten erschwert wird.

Die Kontrollprobe zeigte in dieser Messreihe eine Proteinrestmenge von $22 \pm 7\%$, was mit den gemittelten Werten aller Zeitreihen gut übereinstimmt. Die Peptide **2-4**, die in den SPR-Experimenten keine deutliche Verschlechterung der Bindung zeigten, haben in dem Aggregationsassay einen leichten Einfluss auf die Menge an aggregiertem Protein. Für die Peptide **2**, **4** und **5** ist der inhibitorische Effekt unter Berücksichtigung des Fehlers sehr gering, während das Peptid **3** einen schwachen, aber dennoch deutlichen inhibitorischen Effekt, aufweist (Abbildung 47).

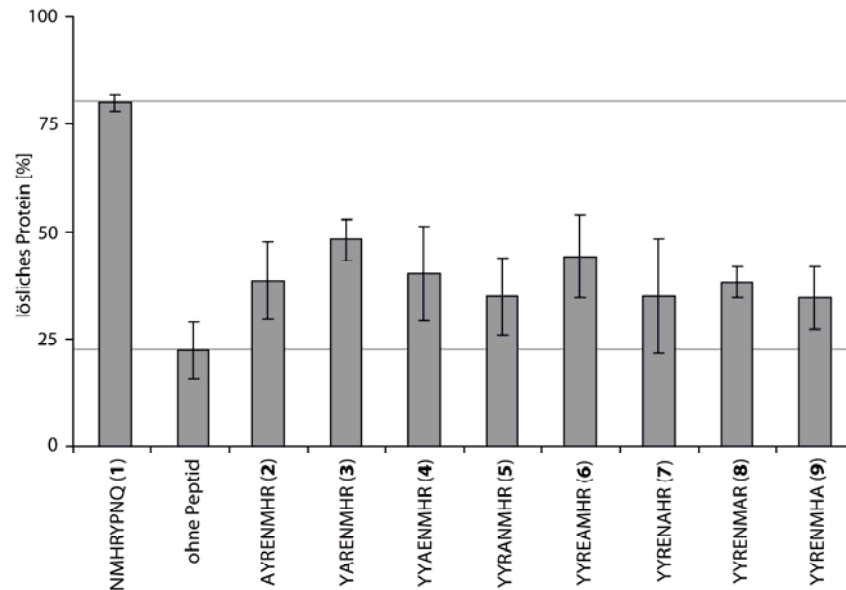


Abbildung 47: Das Diagramm zeigt die Auftragung der in Lösung verbliebenen Proteinmenge nach dem Aggregationsassay. Als Vergleich ist zum einen das Peptid **1**, welches die Aggregation inhibiert, mit abgebildet, zum anderen die Kontrollprobe, in der kein Peptid enthalten ist. Die Peptide **2-9** zeigen nur geringe protektive Eigenschaften. Für das Peptid **3** ist ein schwacher, aber deutlicher Effekt erkennbar, der jedoch im Vergleich zu dem des Peptids **1** gering ausfällt. Für die Peptide **5**, **7** und **9** ist der inhibitorische Effekt unter Berücksichtigung des Fehlers zu vernachlässigen.

Auch die Peptide **6-9**, die in den SPR-Studien eine deutlich schwächere Bindung an das Prionprotein haben, zeigen einen schwachen protektiven Effekt, der für die Peptide **7** und **9** wegen des großen Fehlers zu vernachlässigen ist, während die Peptide **6** und **8** einen deutlichen inhibitorischen Effekt aufweisen, der jedoch im Vergleich mit dem des Peptids **1** gering ausfällt. Diese Ergebnisse bestätigen zunächst einmal, dass das Peptid $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ (**18**) wahrscheinlich nicht die gesamte Bindungsregion abdeckt, da die Bindung des Peptids **18** hauptsächlich auf den Aminosäuren $^{153}\text{NMHR}^{156}$ beruht.

Die Analyse des Alaninscans der Sequenz $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$, der die Peptide **10-17** umfasst, wurde mit der selben Proteincharge und unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der SPR-Bindungsstudien hatten deutliche Effekte für die Substitution der einzelnen Aminosäuren gezeigt. Die K_D -Werte der Peptide variierten zwischen $29 \mu\text{M}$ für das Peptid **15** und $2864 \mu\text{M}$ für das Peptid **17**. Aus diesen Gründen sollte eigentlich ein deutlicher Unterschied für das aggregationsinhibitorische Potential der einzelnen Peptide erwartet werden.

Die Bindung des Peptids **10**, das mit einer Bindungskonstante von $755 \mu\text{M}$ an das Prionprotein bindet, ist um den Faktor 30 schlechter, als die des Peptids **1**. Trotz dieser großen Abweichung wurde nur ein geringer Effekt auf das inhibitorische Potential beobachtet, da nach der Aggregation noch $63 \pm 5\%$ des Proteins in Lösung verblieben. Gleiches gilt für das Peptid **11**, bei dem die Menge des in Lösung verbliebenen Proteins $59 \pm 11\%$ betrug. Wie

jedoch aus Abbildung 48 ersichtlich wird, ist für das Peptid **12** ($^{153}\text{NMARYPNQ}^{160}$) ein sehr deutlicher Effekt zu beobachten. Dieses Peptid bindet mit einer Bindungskonstante von $K_D = 1403 \mu\text{M}$ und somit im Vergleich zu dem Peptid **1** um den Faktor 56 schlechter, an das Prionprotein. Unter Zugabe dieses Peptids verringerte sich die Menge des in Lösung verbliebenen Proteins jedoch auf $38 \pm 6\%$ und liegt somit in dem selben Bereich wie die Peptide aus dem Alaninscan der Sequenz $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$.

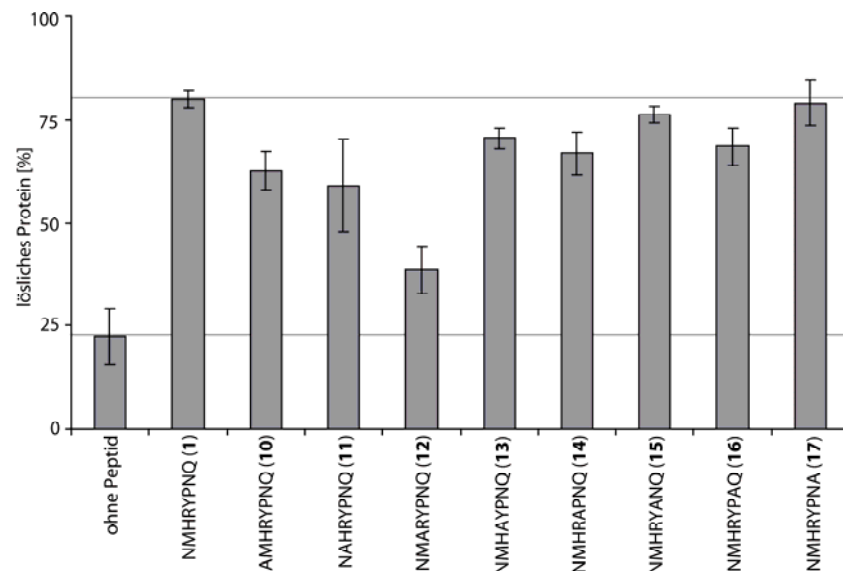


Abbildung 48: Das Diagramm zeigt die Auftragung der in Lösung verbliebenen Proteinmenge nach dem Aggregationsassay. Als Vergleich ist das Peptid **1** mit abgebildet, bei dessen Anwesenheit 80% des Proteins in Lösung verbleibt sowie die Kontrollprobe, die kein zusätzliches Peptid beinhaltet. Die einzige deutliche Abschwächung des protektiven Effekts wird für das Peptid **12** beobachtet, bei der das Histidin substituiert wurde. Leichte Effekte werden zudem für die Peptide **10** und **11** beobachtet. Das Peptid **17**, welches die schwächste Bindungskonstante besitzt, zeigt nahezu identische inhibitorische Effekt, wie das Peptid **1**. Eine Korrelation zu der Bindungskonstante ist daher nicht zu beobachten.

Für diesen Fall scheint es eine Korrelation zwischen der Bindungsstärke und dem protektiven Potential zu geben, was bei der Betrachtung des Peptids **15**, dessen K_D -Wert $29 \mu\text{M}$ beträgt, gut in Übereinstimmung zu bringen ist. Die Menge des gelösten Proteins wurde in diesem Fall auf $76 \pm 2\%$ bestimmt, so dass dieses Peptid die Aggregation fast in dem selben Umfang verhindert wie das Peptid **1**. Betrachtet man nun aber die Peptide **13** und **14** sowie die Peptide **16** und **17**, wird diese Übereinstimmung wiederum nicht gefunden. Diese vier Peptide binden mit K_D -Werten von $1030 \mu\text{M}$ (**14**) bis $2864 \mu\text{M}$ (**17**), besitzen aber das gleiche inhibitorische potential wie das Peptid **1**. Gerade im Fall des Peptids **17**, das die schwächste Bindungskonstante dieser Peptide aufweist, wird die Aggregation im gleichen Maße inhibiert wie im Fall des Peptids **1**, so dass $79\% \pm 6\%$ des Prionproteins in Lösung verbleiben.

Es schien zunächst keinen klaren Zusammenhang zwischen der Bindungsstärke des jeweiligen Peptids und seinem inhibitorischen Potential zu geben. Die erste Vermutung, dass die inhibitorische Wirkung allein auf dem Histidin beruht, indem dieses vorrangig oxidiert wird oder die entstehenden Kupferionen bindet, ist widerlegt, da dieses Histidin sowohl in der Sequenz des Peptids $^{149}\text{YYRENMHR}^{156}$ (**18**) als auch in der Sequenz des Peptids $^{149}\text{YYRENMHRYPNQ}^{160}$ (**19**) vorkommt. Gleiches gilt auch für das Methionin, für das im Falle einer Substitution zwar kein Effekt beobachtet wurde, aber dessen Seitenkette sehr oxidationsempfindlich ist.¹⁹⁶ Auch die Bildung eines Kupfer-Chelatkomplexes durch den positiv geladenen N-Terminus und der Histidinseitenkette in Form eines $\text{NH}_3^+\text{-X-X-His}$ -Motivs, für das in Form des Peptids GGH eine hohe Kupferaffinität nachgewiesen wurde, kann ausgeschlossen werden, da ansonsten das Peptid **22** ($^{153}\text{NMHR}^{156}$) ebenfalls eine starke protektive Wirkung zeigen müsste (s. Abschnitt 3.7.3).²⁰⁰

Eine mögliche Erklärung dieses Effekts könnte sein, dass nur das Peptid **1** in der Lage ist, den Ort, an dem die Umfaltung des Proteins initialisiert wird, optimal durch die Bindung zu schützen. Das Peptid **19** wäre in diesem Falle durch seine Größe nicht in der Lage die Bindungsregion optimal auszunutzen, was auch durch die schlechtere Bindungskonstante von $K_D = 140 \mu\text{M}$ bestätigt würde. Im Falle des Peptids **18** wäre dieser Effekt dadurch zu erklären, dass die N-terminal gelegenen Aminosäuren nicht in dem Bereich der Umfaltungsregion platziert sind, was sich mit den Ergebnissen des Alanin-scans dieses Peptids deckt und nur die Aminosäuren der C-terminalen Hälfte ($^{153}\text{NMHR}^{156}$) im Bereich der Bindungsregion liegen, jedoch nicht die komplette Umfaltungsdomäne vor oxidativen Einflüssen schützt, weshalb die Umfaltung in diesem Fall nicht inhibiert wird.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass die Bindung der aggregationsinhibitorisch wirksamen Peptide auf einer teilweisen Umfaltung des Proteins beruht, die keine größeren strukturellen Änderungen nach sich zieht, jedoch den Ort der Aggregationsinitialisierung von den reaktiven Sauerstoffspezies abschirmt, die während des Assays gebildet werden. Dies könnte auch eine Erklärung für die Ergebnisse des *chemical shift mappings* sein, die eine Änderung der chemischen Verschiebung in zwei Regionen des Proteins zeigten. Diese strukturellen Änderungen des Proteins wären demnach jedoch sehr gering, da ansonsten stärkere Änderungen in den CD-Spektren zu erwarten wären.

3.7 Analyse des flankierenden Sequenzbereiches des Peptids 1

3.7.1 Synthese der Peptide

Für die Überprüfung der These, dass sowohl die Länge als auch die Sequenz des Peptids **1** für die inhibitorische Wirkung nötig ist, sollten nun Peptide synthetisiert werden, die zum

einen den N-terminal gelegenen Bereich des Peptids $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ als auch den C-terminal gelegenen Bereich dieses Peptids berücksichtigen.

Der N-terminal vom Asn153 gelegene Bereich sollte bis zu dem Arg151 untersucht werden, wobei auch verkürzte Varianten synthetisiert werden mussten, um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren zu untersuchen. Im Bereich des Peptids **1** sollten verkürzte Peptide synthetisiert werden, die einzelne Sequenzbereiche getrennt umfassten.

Der C-terminale Bereich wurde von B. Claasen in ihrer Dissertation schon durch das Peptid $^{157}\text{YPNQVYYR}^{164}$ untersucht, für das sie eine Bindungskonstante von 161 μM ermitteln konnte. Im Aggregationsassay konnte kein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden.¹⁸⁵ Nichtsdestotrotz sollte der Einfluss der Aminosäuren bis zum Tyr163 und auch das kombinierte Peptid der Sequenz $^{153}\text{NMHRYPNQVYYR}^{164}$ untersucht werden, um auch hier die Einflüsse der Sequenz zu untersuchen. Die Synthese der Peptide erfolgte nach der Fmoc-Strategie an einem Rink-Amid-Harz bei einer Ansatzgröße von 50 μmol . Diese Synthese wurde manuell durchgeführt, weshalb die 30 minütigen Kupplungsschritte der Aminosäure nur einmal wiederholt wurden. Die Menge an verwendeten TBTU und DIPEA entsprach wiederum einem fünffachen Überschuss im Bezug auf die Bindungsstellen des Harzes. Die Aminosäure wurde mit einem vierfachen Überschuss verwendet. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte nach beendeter Synthese simultan zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen unter Verwendung von TFA/TIPS/ H_2O (95/3/2 v/v). Die Peptide wurden so mit einem freien N-Terminus und einer C-terminalen Säureamidgruppe erhalten. Das Rohprodukt der Peptide wurde durch Fällung mit *tert*-Butylmethylether vorgereinigt und darauf folgend über RP-HPLC mittels C_{18} -Säule und einem Wasser/Acetonitril-Gradienten, mit zusätzlichen 0.1% TFA gereinigt. Eine Übersicht der synthetisierten Peptide und der Ausbeute nach HPLC-Reinigung ist in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9: Übersicht über die synthetisierten Peptide und deren prozentuale Ausbeute. Alle Peptide wurden über RP-HPLC gereinigt.

Peptid	Sequenz	Ausbeute [%]
	$^{149}\text{YYRENMHRYPNQVYYR}^{164}$	
20	$^{151}\text{RENMHRYP}^{158}$	37
21	$^{152}\text{ENMHRY}^{157}$	31
22	$^{153}\text{NMHR}^{156}$	61
23	$^{153}\text{NMHRYPNQVYYR}^{164}$	12
24	$^{155}\text{HRYPNQ}^{160}$	24
25	$^{156}\text{RYPNQ}^{160}$	31
26	$^{157}\text{YPNQ}^{160}$	45
27	$^{158}\text{PNQVYY}^{163}$	20
28	$^{159}\text{NQVY}^{162}$	26

Alle synthetisierten Peptide wurden mittels MALDI-TOF-MS und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Daten der Charakterisierung sind im Abschnitt 6 zusammengefasst. Zu erwähnen sind hierbei jedoch die Peptide **25** ($^{156}\text{RYPNQ}^{160}$) und **26** ($^{157}\text{YPNQ}^{160}$), die im NMR-Spektrum einen doppelten Signalsatz zeigten, obwohl im MALDI-TOF-MS Spektrum nur eine Peptidmasse zu finden ist und das HPLC-Chromatogramm ebenfalls nur einen Peak zeigt. Die Gründe hierfür liegen in einer *cis/trans*-Isomerie des Prolins, die für das Peptid **25** im Verhältnis von 2:1 bzw. für das Peptid **26** im Verhältnis 4:1 vorliegt. Welche der beiden Spezies in welchem Anteil vorliegt, konnte nicht bestimmt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die thermodynamisch stabilere *trans*-Form überwiegt.

3.7.2 Bestimmung der Bindungskonstanten mittels SPR

Um die erhaltenen Peptide vollständig zu charakterisieren, mussten ihre Bindungsaffinitäten gegen das humane Prionprotein durch SPR-Experimente bestimmt werden. Die Messungen wurden analog zu den Messungen der Peptide **2-17** an einem Biacore 3000 Gerät durchgeführt und als Messchip wurde erneut der kommerziell erhältliche CM5 Chip der Firma Biacore genutzt.

Wegen der zuvor erwähnten Probleme der Proteinexpression wurde in diesem Fall das hPrP(90-230)-*His-Tag* für die Messungen verwendet. Die Immobilisierung erfolgte mit EDC/NHS in Acetatpuffer (pH 4.5) und die nicht umgesetzten Bindungsstellen wurden mit Ethanolamin blockiert. Insgesamt wurden die Messungen in drei verschiedenen Messreihen durchgeführt, so dass die Belegung der Chips für die einzelnen Experimente variierte. Die Belegung der Messchips und die erwartete RU_{max} -Antwort für die einzelnen Peptide sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Messchipbelegung und der erwarteten RU_{max} -Werte für die Peptide **20-28**.

Peptid	Belegung [fmol]	RU_{max} Antwort
20	198	217
21	198	168
22	198	109
23	244	400
24	244	198
25	244	165
26	244	127
27	366	286
28	366	191

Die Immobilisierung wurde wiederum mit dem Peptid **1** als Referenzsubstanz überprüft und zeigte für alle drei Belegungen erneut niedrigere RU_{max} -Werte, als für das Peptid erwartet

wurden. Dies ist wie zuvor beschrieben unter anderem auf das Lys219 zurückzuführen, welches in der Nähe der Bindungsregion liegt und über seine Aminogruppe der Seitenkette an die Dextranmatrix gebunden werden kann.

Je nach Peptid wurden Konzentrationen von 5-800 μM vermessen. Das Peptid **27** konnte nicht vermessen werden, da es in dem verwendeten Puffer (HBS-N, pH 7.4) nicht vollständig löslich war. Auch durch die Zugabe von 5% (v/v) bzw. 10% (v/v) DMSO konnte das Peptid nicht gelöst werden.

Die Assoziationszeit betrug ebenfalls wie die Dissoziationszeit 300 s. Die erhaltenen RU_{max} -Werte der Sensorgramme wurden gegen die Konzentration aufgetragen und nach dem *one-site-binding* Modell angefitet. Die Affinitätsplots für die Peptide **20-24** sind in Abbildung 49 gezeigt.

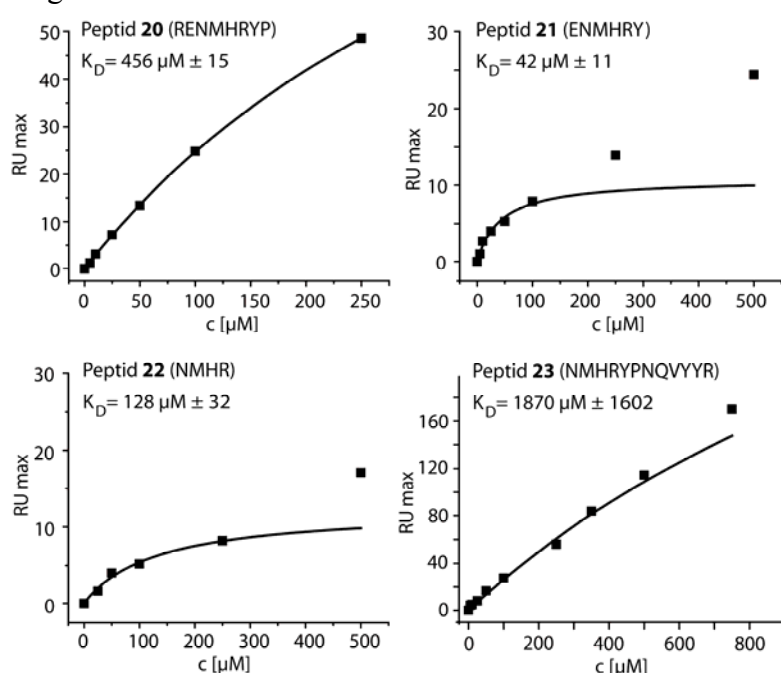


Abbildung 49: Affinitätsplots der Peptide **20-23**. Der Fit des Peptids **21** umfasst wegen unspezifischer Wechselwirkungen nur die Konzentrationen bis 100 μM . Aus dem selben Grund wurden für den Fit des Peptids **22** nur die Datenpunkte bis zu einer Konzentration von 250 μM berücksichtigt. Die Bindungskonstanten der Peptide **20-22** unterscheiden sich zwar, zeigen jedoch keine signifikante Abweichung wie sie im Fall des Peptids **23** auftritt. Die Bindungskonstante verschlechtert sich auch im Vergleich zu den Ursprungspeptiden $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ und $^{157}\text{YPNQVYYR}^{164}$ auf $K_D = 1870 \mu\text{M}$. Hierfür können vor allem entropische Effekte verantwortlich sein.

Die Peptide **20-22** sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich, da es sich bei den Peptiden **21** und **22** jeweils nur um die am N- und C-Terminus verkürzten Peptide der Sequenz von **20** handelt. Trotzdem zeigen die Peptide sehr unterschiedliche Bindungskonstanten. Für das Peptid **20** wurde ein K_D -Wert von 456 μM ermittelt, der ungefähr im erwarteten Rahmen liegt. Die Peptide des Alaninscans hatten bereits gezeigt, dass die Aminosäuren ab dem Asn153 den Hauptteil der Bindung beisteuern und eine N-terminale Verlängerung keine negativen Auswirkungen haben muss. Dies wird nun auch durch das Peptid **20** bestätigt. Das Peptid **21**

bindet im Vergleich dazu um den Faktor 10 besser und der K_D -Wert von $42 \mu\text{M}$ liegt in dem selben Bereich wie der K_D -Wert der Ursprungspeptide **1** und **18**. Dies kann unter anderem auf einen strukturellen Einfluss des Prolins zurückzuführen sein, der in Peptid **20** auftritt, jedoch durch die C-terminale Verkürzung beim Peptid **21** nicht mehr auftreten kann und somit zu einer für die Bindung günstigeren Konformation des Liganden führt. Die um den Faktor 3 schlechtere Bindung des Peptids **22** ($K_D = 128 \mu\text{M}$) lässt sich sehr gut durch die stark verkürzte Sequenz erklären, da in diesem Fall nicht ausreichend viele konstruktive Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand gebildet werden können.

Der K_D -Wert von $1870 \mu\text{M}$, der für das Peptid **23** bestimmt wurde, ist wesentlich schlechter als die K_D -Wert der Ursprungspeptide $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) und $^{157}\text{YPNQVYYR}^{164, 185}$, die beide im niedrigen mikromolaren Bereich binden. In diesem Fall sind mit hoher Wahrscheinlichkeit entropische Effekte, die aus der höheren Flexibilität des Moleküls resultieren, für die schlechtere Bindung verantwortlich. Es wäre jedoch auch möglich, dass sich die Konformation dieses Peptids stark von den beiden Octapeptiden unterscheidet und so destruktive Wechselwirkungen überwiegen oder dass die C-terminalen Aminosäuren einen negativen Effekt auf die Bindung haben.

Das Peptid **24** ($^{155}\text{HRYPNQ}^{160}$) bindet mit einem K_D -Wert von $1007 \mu\text{M}$ an das Prionprotein (Abbildung 50). Auch dieser Effekt kann nur mit strukturellen Veränderungen der Peptidkonformation erklärt werden, da die erwartete Bindungskonstante im Hinblick auf die Ursprungspeptide niedriger sein müsste.

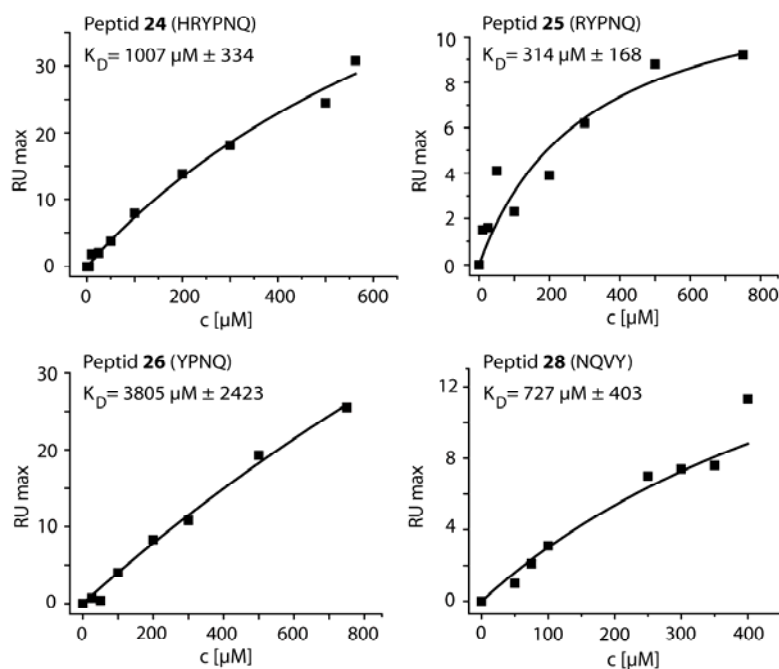


Abbildung 50: Affinitätsplots der Peptide **24-26** und **28**. Die Bindungskonstante des Peptids **24** liegt mit einem K_D -Wert von $1007 \mu\text{M}$ höher als erwartet. Die Bindungskonstanten der Peptide **25** und **26** sind wegen der *cis/trans*-Isomerie des Prolins niedriger als hier angegeben. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten des Peptids **28** wurden nur die Konzentrationen bis $350 \mu\text{M}$ berücksichtigt.

Die ermittelten K_D -Werte der Peptide **25** und **26** werden mit hoher Wahrscheinlichkeit niedriger liegen, als sie hier bestimmt wurden, da beide Peptide in einem Gemisch der *cis/trans*- Isomere des Prolins vorlagen. Welche der beiden Spezies an der Bindung beteiligt ist, konnte nicht bestimmt werden. Die Bindung des Peptids **28** ($^{159}\text{NQVY}^{162}$) ist mit $K_D = 727 \mu\text{M}$ schwächer als erwartet. Auch hier mögen destruktive Wechselwirkungen oder eine schnellere *off-rate* des Peptids, die aus der kleineren Größe resultiert, die Gründe sein. Insgesamt lässt sich aus den SPR-Ergebnissen keine allgemeingültige Aussage treffen, da die Ergebnisse zu heterogen sind. Jedoch bestätigen sich zum Teil die Ergebnisse des Alaninscans, da zum Beispiel das Peptid **22** ($^{153}\text{NMHR}^{156}$) eine sehr starke Bindung an das Prionprotein zeigt und die beteiligten Aminosäuren auch im Alaninscan als essentiell für die Bindung identifiziert wurden. Zudem scheint der vom Gln160 C-terminal gelegene Bereich nicht wichtig für die Bindung zu sein. Um hier jedoch eine verlässliche Aussage treffen zu können müsste auch von der Sequenz $^{157}\text{YPNQVYYR}^{164}$ ein Alaninscan durchgeführt werden. Da dieses Peptid jedoch in den Aggregationsassays keinen Effekt zeigte, wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet.

3.7.3 Untersuchung der Peptide im oxidativen Aggregationsassay

Aus der Untersuchung der Peptide **20-28** in dem oxidativen Aggregationsassay sollten Informationen über die Auswirkungen der N- und C-terminal gelegenen Aminosäuren der Sequenz des Peptids **1** erhalten werden, die aus den Peptiden des Alaninscans nicht erhalten werden konnten. Die Daten, die aus den Aggregationsassays erhalten wurden, sind in Abbildung 51 gezeigt. Zusätzlich sind auch hier wieder die Daten für die Probe des Peptids **1** und die Daten für die Probe ohne Peptid gezeigt, die als Vergleich dient.

Es zeigt sich, dass das inhibitorische Potential der Peptide **20-22** mit abnehmender Länge des N-terminalen Bereiches ansteigt. Wird in dem Assays das Peptid **20** ($^{151}\text{RENMHRYP}^{158}$) hinzugegeben, so verbleiben 40% des Proteins in Lösung. Es besteht also ein geringer protektiver Effekt. Für das Peptid **21** wurde ein Wert von 45% des in Lösung verbliebenen Proteins erreicht und für das Peptid **22**, das nur noch die Sequenz $^{153}\text{NMHR}^{156}$ umfasst, konnten 50% des Proteins in Lösung nachgewiesen werden. In diesem Fall ist der Fehler auch fast doppelt so groß wie im Falle der beiden zuvor besprochenen Peptide. Es ist jedoch wieder keine klare Korrelation zwischen inhibitorischem Potential und Bindungsstärke zu beobachten, da das Peptid **22**, das die stärkste Inhibitionswirkung zeigte, nur mit einem K_D -Wert von $128 \mu\text{M}$ an das Protein bindet. Das Peptid **21** mit einem K_D -Wert von $42 \mu\text{M}$ bindet hingegen sehr stark an das Protein, verhindert jedoch die Aggregation nur zu 45%. Die einzige Korrelation, die zwischen Bindungsstärke und Aggregationsinhibition erkennbar ist, ist für das Peptid **20** zu beobachten, das die Aggregation kaum inhibiert und auch schwächer an das Prionprotein bindet.

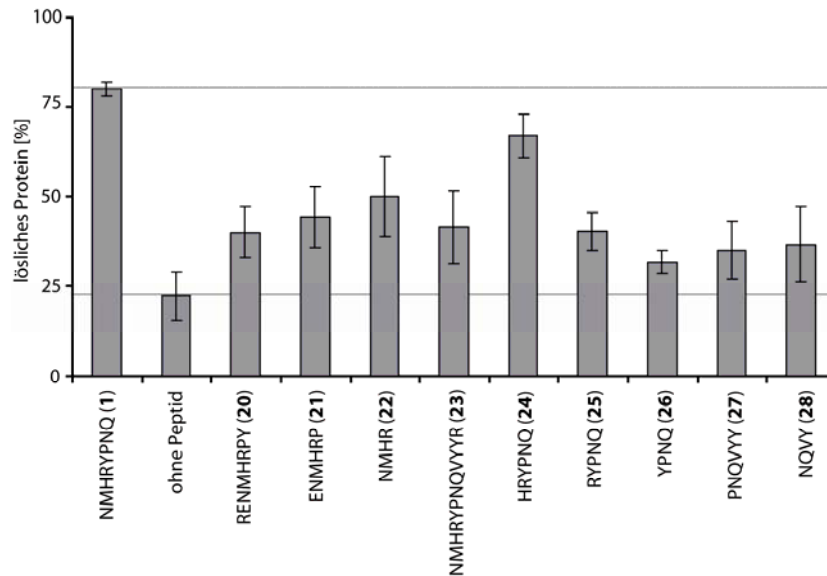


Abbildung 51: Gezeigt ist die Auftragung der restlichen gelösten Proteinmenge nach dem Aggregationsassay. Die Vergleichsprobe ohne Peptid und mit dem bekannten Aggregationsinhibitor **1**, sind als Vergleichssubstanzen gezeigt. Deutlich zu erkennen, ist der protektive Effekt des Peptids **24**, in dessen das His155 enthalten ist, welches schon durch die Peptide des Alaninscans als notwendig identifiziert wurde. Die Peptide **21** und **22** zeigen ebenfalls schwache inhibitorische Eigenschaften. Alle anderen Peptide haben keinen erkennbaren Effekt auf die Aggregation des Prionproteins.

Für das Peptid **23**, das sehr schwach an das Protein bindet, geht der inhibitorische Effekt auf $42 \pm 10\%$ zurück. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da B. Claasen für das N-terminale Fusionspeptid $^{149}\text{YYRENMHRYPNQ}^{160}$ ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt nachweisen konnte.¹⁸⁵

Das Peptid **24** ($^{155}\text{HRYPNQ}^{160}$) bestätigte die Ergebnisse aus dem Alaninscan, die für den Fall der Substitution des Histidins einen starken Einbruch des protektiven Effekts ergaben. Da dieses Peptid die Aggregation zu $67 \pm 6\%$ inhibieren konnte, besitzt es fast die gleiche protektive Wirkung des Peptids **1**. Im Vergleich der inhibitorischen Wirkung des Peptids **24** mit der des Peptids **22** ($^{153}\text{NMHR}^{156}$) und der des Peptids **25** ($^{156}\text{RYPNQ}^{160}$), welches nur noch 40% inhibitorische Wirkung zeigte, ist erkennbar, dass das Histidin ebenso zwingend notwendig für die Inhibition der Aggregation ist, wie die Länge der C-terminal gelegenen Aminosäuresequenz. Das Peptid **22** zeigte eine schwächere protektive Wirkung als das Peptid **24**, aber trotzdem noch eine stärkere Wirkung als das Peptid **25**. Wird die Sequenz weiter verkürzt (Peptid **26**), so verblieben nur noch $32 \pm 3\%$ des Proteins in Lösung. Allerdings gilt es auch in diesem Fall zu bedenken, dass die Peptide **25** und **26** als Isomergemisch vorliegen und davon ausgegangen werden muss, dass nur eines der Isomeren an das Protein bindet und so seine inhibitorische Wirkung entfalten kann.

Eine weitere Verschiebung der Peptidsequenz zum C-Terminus hat keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des Proteins, da die Peptide **27** und **28** keinen Effekt hierauf haben.

Zusammenfassend betrachtet, scheint die inhibitorische Wirkung des Peptids direkt mit der Länge der C-terminalen Sequenz zusammenzuhängen, da die Wirkung erst bei einer deutlichen Verlängerung des Peptids über das His155 hinaus eine protektive Wirkung zeigt. Zudem ist genau dieses Histidin ein entscheidender Faktor des inhibitorischen Potentials, da in Abwesenheit die protektive Wirkung der Sequenz zusammenbricht. Eine mögliche Erklärung könnte hierbei sein, dass das Histidin direkt in der Region, in welcher die Umfaltung initialisiert wird, bindet und dass der C-terminal gelegene Teil zur weiteren Stabilisierung der Proteinstruktur beiträgt. Da es zunehmende Beweise für einen direkten Einfluss der Methionine des Prionproteins auf die Umfaltung gibt, könnte es sein, dass das Peptid eben diese Länge vorweisen muss, um z. B. das Met213, das am Rande der Bindungsregion des Peptids **1** liegt, vor dem oxidativen Agens zu schützen und so die Umfaltung zu verhindern.^{191,201} Jedoch sind auch partielle Umfaltungsprozesse, durch die die Initiationsregion der Umfaltung vor den reaktiven Spezies geschützt wird, nicht völlig auszuschließen.

3.8 Bindung der Chitobiose an das humane Prionprotein

Das Prionprotein ist ein Glycoprotein mit zwei Glycosylierungsstellen, die am Asn181 und am Asn197 lokalisiert sind. Die Glycostrukturen des Proteins zeigen ein hohes Maß an Diversität und sind für die Stabilität des Proteins von großer Wichtigkeit.

Für das Peptid ¹⁹²TTKGENFTET²⁰¹, das den Bereich um eine Glycosylierungsstelle darstellt, wurde nachgewiesen, dass das nicht glycosylierte Peptid nicht an das Prionprotein bindet. Wird jedoch Chitobiose als Modellsaccharid über die γ -Amidgruppe des Asn197 gebunden, so bindet das Peptid mit $K_D = 455 \mu\text{M}$ an das Prionprotein.¹⁸⁵ Die Chitobiose wurde hierbei als Modellsaccharid eingesetzt, da alle *N*-Typ Glycane, vom Protein aus betrachtet, dieses Motiv als erste Einheit tragen.

Die Bindungseffekte sind jedoch nicht allein auf die Chitobiose zurückzuführen, da sich die Struktur des Peptids durch die Glycosylierung ändert, was ebenfalls zu einer bindenden Konformation des Peptids führen kann.¹⁸⁵

Wegen des stabilisierenden Einflusses der Glycostrukturen des nativen Prionproteins und der hohen Wahrscheinlichkeit einer Bindungsinteraktion zwischen Protein und Kohlenhydrat musste diese Interaktion näher untersucht werden. Zum einen musste geklärt werden, ob die Chitobiose auch im isolierten Zustand an das Prionprotein bindet, oder ob die Bindung nur auf der geänderten Konformation des Peptids basierte. Im Falle der Bindung sollte das Bindungsepitop der Chitobiose und die Region der Chitobiosebindung auf dem Prionprotein aufgeklärt werden.

3.8.1 SPR-Experimente mit Chitobiose

Zunächst galt es, die Bindung der Chitobiose (**29**) an das Prionprotein zu untersuchen und die Bindungsstärke zu bestimmen. Hierzu wurden SPR-Messungen an einem Biacore 3000 Gerät analog den vorherigen Messungen mit den Peptiden durchgeführt. Bei der Belegung des Chips mit EDC/NHS wurden 4930 RU (244 fmol) des hPrP(90-230) *His-Tag* immobilisiert. Somit ergibt sich eine theoretischen RU_{\max} -Antwort für die Chitobiose von 103 RU.

Da in der Regel die Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung, mit Bindungskonstanten von K_D ca. 2 mM schwächer ist als die Interaktion von Peptiden, wurden Ligandkonzentrationen zwischen 500 bis 4000 μM vermessen. Die Konzentration von 5 μM diente dazu, das unspezifische Messsignal des verwendeten Puffers zu quantifizieren. Die Assoziationszeit betrug wie bei den Messungen der Peptide 300 s, während die Dissoziationszeit wegen der erwarteten schnelleren Kinetik auf 200 s reduziert wurde.

Bei der Betrachtung der erhaltenen Sensorgramme, welche in Abbildung 52 dargestellt sind, erkennt man, dass die Messkurven für die niedrigen Konzentrationen positiv sind, während die Kurven bei Konzentrationen höher 500 μM negative Amplituden aufwiesen.

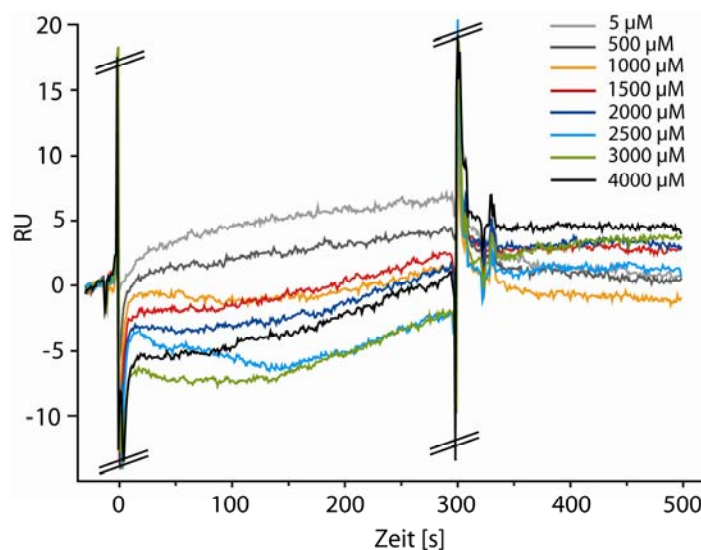


Abbildung 52: Die Abbildung zeigt die Sensorgramme, die durch die Interaktion von Chitobiose (**29**) mit dem humanen Prionprotein (90-230)-*His-Tag* erhalten wurden. Die Sensorgramme sind der jeweiligen Ligandkonzentration entsprechend farblich markiert. Auffällig ist, dass die niedrigen Konzentrationen zu Sensorgrammen mit positiver Amplitude führen, während beim Vermessen von Konzentrationen größer 500 μM Sensorgramme mit negativer Amplitude erhalten werden.

Das Auftreten von Sensorgrammen mit negativer Amplitude kann mehrere Ursachen haben. Zunächst besteht die Möglichkeit, dass der Ligand unspezifisch mit der Referenzzelle wechselwirkt, so dass die Differenz der beiden Zellen negativ ist. In diesem Fall wäre jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit der RU-Antworten der Sensorgramme zu erwarten. Die Auftragung der RU_{\max} -Werte gegen die Konzentration würde in diesem Fall einen linearen

Verlauf zeigen. Eine weitere Möglichkeit, die zu den negativen Amplituden der Sensorgramme führen kann, besteht darin, dass sich der Brechungsindex durch die Massenzunahme an der Grenzfläche in Verbindung mit den Eigenschaften der Ligandlösung in die entgegengesetzte Richtung ändert als im Regelfall. Dies würde bedeuten, dass die Winkeländerung an der Messzelle kleiner wäre als die der Referenzzelle. Durch die Subtraktion der beiden Sensorgramme entsteht also die Resonanzkurve mit der negativen Amplitude. In diesem Fall wäre die Konzentrationsabhängigkeit der maximalen RU-Signale gegeben und es wäre möglich die Kurve nach dem *one-site-binding* Modell anzufitten. Für den letztgenannten Effekt spricht, dass der Betrag der maximalen RU-Antworten der Sensorgramme konzentrationsabhängig zunimmt und dass bei niedrigen Ligandkonzentrationen (5 μM und 500 μM) die Amplitude der Sensorgramme positiv ist und erst bei steigender Ligandkonzentration in den negativen Bereich übergeht. Die Konzentration von 5 μM entspricht hierbei der Änderung des Brechungsindex, der durch den Puffer hervorgerufen wird. Bei einer Konzentration von 500 μM wird dieser Puffereffekt durch die Ligandbindung und die damit verbundene Änderung des Brechungsindex zu einem Teil verringert, so dass der gemessene RU_{max} -Wert kleiner ist, als jener, der bei einer Konzentration von 5 μM erreicht wird. Für die Auswertung der Kurven musste dieser Effekt berücksichtigt werden.

In allen bisherigen Experimenten wurde die RU-Antwort der Puffersensorgramme von den Sensorgrammen der Ligandlösungen durch Subtraktion berücksichtigt. Dies geschah auch bei dieser Messung, wobei in diesem Fall die positive Pufferantwort von den negativen RU_{max} -Werten abgezogen wurde. Die RU_{max} -Werte mussten zu Beginn der Injektion bestimmt werden, weil es zu einem Anstieg der Sensorgrammamplitude mit zunehmendem Zeitverlauf der Injektion kam. Um die erhaltenen Werte vergleichen zu können, wurden die RU_{max} -Werte der einzelnen Ligandkonzentrationen nach einer Assoziationszeit von 30 s bestimmt. Von dem so erhaltenen Wert wurde die Pufferantwort abgezogen und der Betrag dieser Werte gegen die Ligandkonzentration aufgetragen (Abbildung 53).

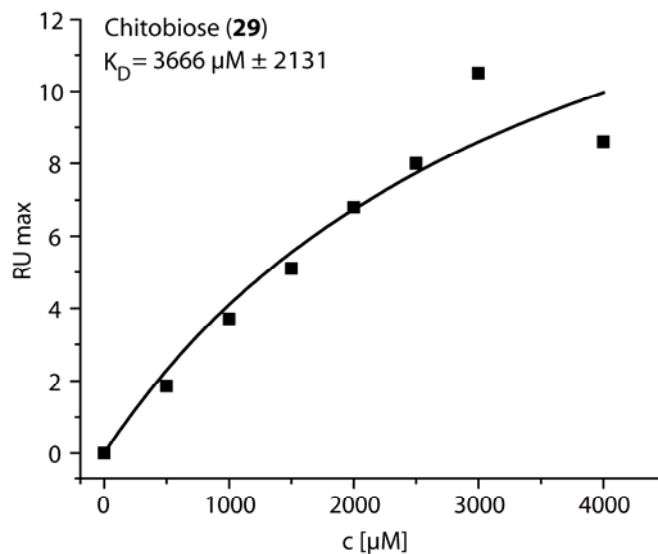


Abbildung 53: Affinitätsplot der Chitobiose (29) gegen das hPrP(90-230)-His-Tag. Die ermittelte Bindungskonstante von $K_D = 3666 \mu\text{M} \pm 2131$ liegt in einem Bereich, der für die Protein-Kohlenhydrat-Bindung erwartet wird.

Der Fit der Datenpunkte an das *one-site-binding* Modell ergab einen K_D -Wert von $3666 \mu\text{M}$. Dieser Wert liegt in einem realistischen Bereich für eine Protein-Kohlenhydrat-Bindung.

3.8.2 STD NMR-Experimente mit Chitobiose

Zur Aufklärung des Bindungssepitops der Chitobiose wurden STD NMR-Experimente mit dem hPrP(121-230)-His-Tag durchgeführt. Hierzu wurde zu einer $9.9 \mu\text{M}$ Lösung des hPrP(121-230)-His-Tag ein 75facher Überschuss an Chitobiose zugegeben, so dass die Endkonzentration des Liganden $718.8 \mu\text{M}$ betrug. Die Messungen erfolgten auf einem 700 MHz-Spektrometer mit *cryoprobe* mit einer Sättigungsleistung von 33 dB und einer Sättigungszeit von 4.5 s. Die Einstrahlfrequenz des Sättigungspulses betrug -1050 Hz (-1.5 ppm) und die Messtemperatur betrug 310 K. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde eine Ligandblindprobe aufgenommen, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde.

Die Auswertung des erhaltenen Spektrum und der Vergleich mit dem Spektrum der Ligandblindprobe ergab, dass die Intensität der Signale des Differenzspektrums identisch mit der Intensität der Signale der Ligandblindprobe sind. Die quantitative Auswertung ergab, dass sowohl die STD-Prozente, als auch die Artefakte für die beiden NH-Acetyl-Singulettts bei 2.07 ppm und 2.10 ppm jeweils 0.4% beziehungsweise 0.3% betragen. Das Signal, das im Bereich von 1.2 ppm in allen abgebildeten Spektren zu erkennen ist, konnte nicht der Chitobiose zugeordnet werden und ist daher auf eine Verunreinigung zurückzuführen. Die Signale der Chitobiose, die im Bereich zwischen ca. 3 bis 4 ppm liegen, sind im STD-Spektrum kaum zu erkennen, obwohl sie im Artefaktspektrum deutlich hervortreten. Dies ist vermutlich auf die Überlagerung der Signale mit den schlecht unterdrückten Proteinsignalen

zurückzuführen. Für das anomere Proton bei 5.22 ppm ist weder im Artefakt noch im STD-Spektrum ein Signal zu erkennen (Abbildung 54).

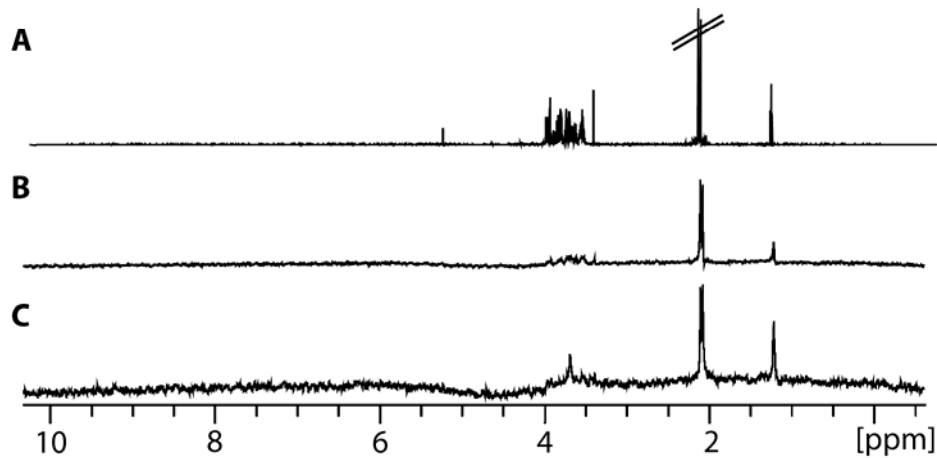


Abbildung 54: Die Abbildung zeigt drei NMR-Spektren der Chitobiose, aufgenommen auf einem 700 MHz Spektrometer bei 310 K in Natriumacetatpuffer-*d*3 (pH 4.7). **A:** Spektrum der Chitobiose in Abwesenheit des Prionproteins. Das Signal bei 1.2 ppm ist auf eine Verunreinigung zurückzuführen. **B:** Differenzspektrum der Ligandblindprobe mit der Chitobiose. Aufgenommen mit einer Sättigungszeit von 4.5 s und einer Sättigungsleistung von 33 dB. Die Sättigungsfrequenz betrug -1050 Hz. Deutlich sind die Artefaktsignale in dem Spektrum zu erkennen. **C:** Differenzspektrum des STD-Experiments mit einem 75fachen Überschuss der Chitobiose über hPrP(121-230)-His-Tag, das unter identischen Bedingungen aufgenommen wurde wie **B**. Auch in diesem Spektrum sind die Signale zu erkennen, die jedoch vollständig auf Artefakte zurückzuführen sind.

Da durch die SPR-Experimente eine Bindung der Chitobiose an das Prionprotein nachgewiesen werden konnte, überrascht es, dass kein STD-Effekt zu beobachten war. Durch die schwache Bindung ist dies nicht auf eine zu langsame *off-rate* zurückzuführen. Ein Grund könnte jedoch sein, dass die Bindungsstärke mit $K_D = 3.66$ mM in Verbindung mit der schlechten Proteinsättigung zu schwach ist und daher die Ligandprotonen nicht ausreichend gesättigt werden und so nach der Dissoziation vom Protein keine Sättigung detektiert werden kann.

3.8.3 $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC *chemical shift mapping* Experimente mit der Chitobiose

Die Bindungsregion der Chitobiose auf dem Prionprotein wurde mit Hilfe des *chemical shift mapping* Verfahrens untersucht.¹⁵²

Die Messungen erfolgten an einem 700 MHz NMR-Spektrometer mit *cryoprobe* bei einer Temperatur von 293 K in 5 mM Natriumacetatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 4.5). Die Konzentration des ^{15}N -markierten hPrP(90-230) betrug 278 μM und die Konzentration der Chitobiose wurde auf 33.3 mM eingestellt. Bei einer Bindungskonstanten für die Chitobiose-hPrP-Interaktion von $K_D = 3.66$ mM liegen bei dieser Ligandkonzentration 90% des Rezeptors in gebundenem Zustand vor. Analog zu den Messungen mit dem Peptid **1** wurden

auch in diesem Fall zwei Spektren aufgenommen, von denen das eine das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum in Abwesenheit und das andere das entsprechende Spektrum in Anwesenheit des Liganden darstellt. Die Zuordnung der erhaltenen Signale erfolgte anhand der von Zahn *et al.* veröffentlichten Daten.⁶⁵

Durch die schwache Bindung der Chitobiose an das Prionprotein ist auch in diesen Spektren auf den ersten Blick keine deutliche Verschiebung einzelner Signale zu erkennen. Jedoch wird durch die Vergrößerung eine Veränderung der chemischen Verschiebung einzelner Signale sichtbar. Die Überlagerung von den erhaltenen Spektren ohne zusätzlichen und mit hinzugegebenen Liganden sind in Abbildung 55 gezeigt.

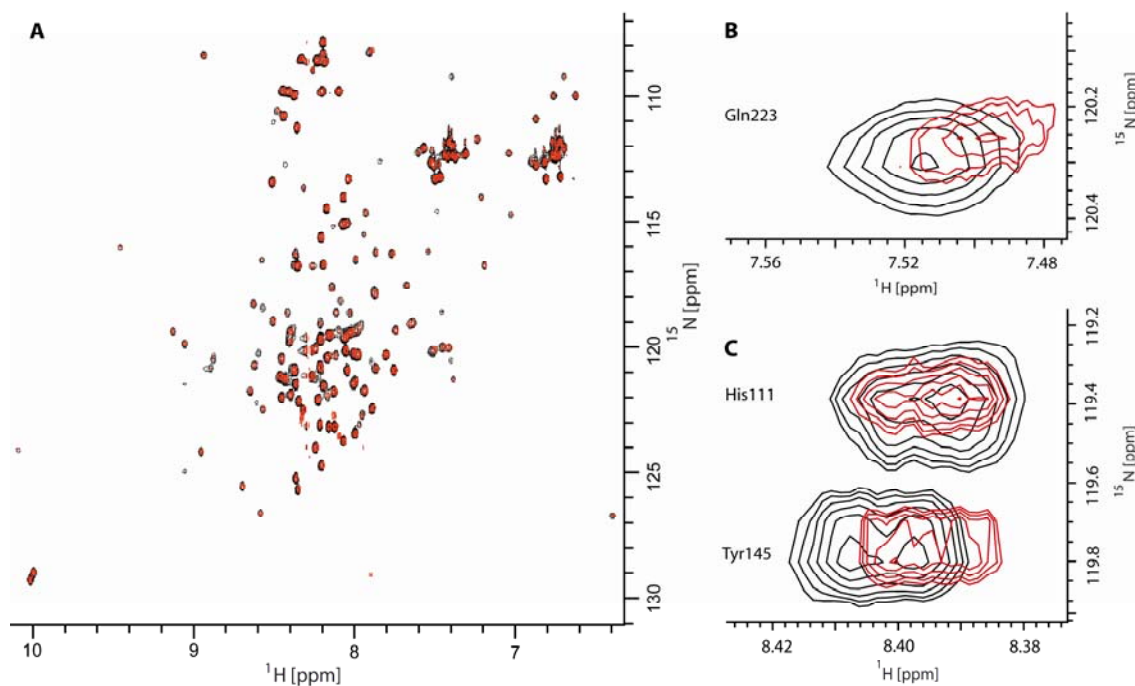


Abbildung 55: Überlagerung der $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren ohne (schwarz) und mit zusätzlicher Chitobiose (29) (rot) aufgenommen bei $T = 293\text{ K}$. **A:** Es ist der gesamte Bereich der NH-Protonen abgebildet, die keine deutliche Signalverschiebung erkennen lassen. **B:** Ausschnitt des Spektrums von 7.56-7.48 ppm bzw. 120.4-120.1 ppm. Das Signal des Gln223 zeigt eine deutliche Verschiebung im Falle der Ligandbindung. **C:** Ausschnitt des Spektrums von 8.42-8.38 ppm bzw. 119.8-119.2 ppm. Im Ausschnitt sind die Signale von His111 und Tyr145 gezeigt. Das Signal des His111 zeigt im Falle der Ligandbindung keine Verschiebung, während das Signal des Tyr145 im Fall der Ligandbindung eine deutliche Änderung der chemischen Verschiebung vorweist.

Die Quantifizierung und Bewertung der Veränderung der chemischen Verschiebung erfolgte anhand von Gleichung 13.¹⁵²

$$\Delta\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) [\text{ppm}] = \Delta\delta(^1\text{H}) [\text{ppm}] + 0.2 * (\Delta\delta(^{15}\text{N}) [\text{ppm}])$$

Gleichung 13: Berechnung der gemittelten Veränderung der chemischen Verschiebung der NH-Resonanzsignale. Mit $\Delta\delta$ = Veränderung der chemischen Verschiebung.

In Tabelle 11 sind die Signale, die eine Veränderung der chemischen Verschiebung zeigen, zusammengefasst. Als Schwellenwert für eine signifikante Bindung wurde ein $\Delta\delta$ -Wert von 0.01 ppm angenommen.

Tabelle 11: Zusammenfassung der beobachteten Veränderungen der chemischen Verschiebung der NH-Resonanzsignale der Amidprotonen bei Zugabe von Chitobiose als Liganden. Ein $\Delta\delta$ -Wert von 0.01 ppm wurde als Schwellenwert für eine signifikante Veränderung angesehen.

$\Delta\delta$ [ppm]	Aminosäure
0.0236	133A
0.0272	145Y
0.0221	149Y
0.0262	153N-NH- δ 1
0.0116	153N-NH- δ 2
0.0259	156R
0.0198	160Q-NH- ϵ 2
0.0099	193T und 201T
0.0112	202D
0.0370	223Q

Aus den erhaltenen Daten wurde mithilfe der *molecular modeling* Software Sybyl[®] die Bindungsregion bestimmt deren graphische Darstellung in Abbildung 56 gezeigt ist.

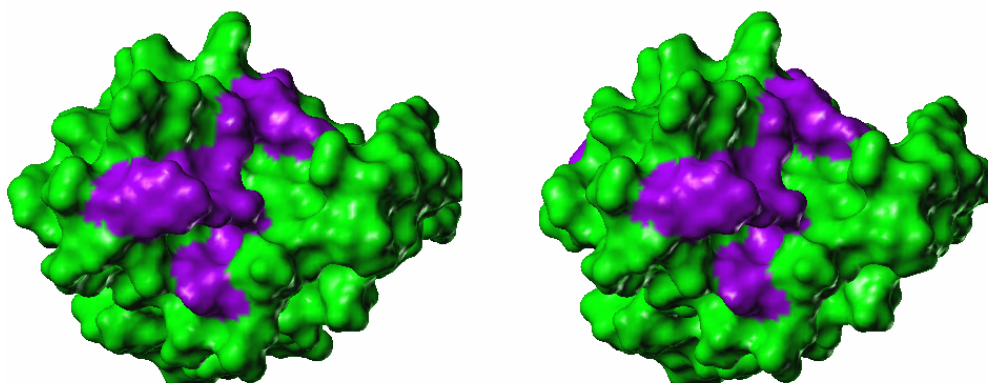


Abbildung 56: Darstellung der Bindungsregion der Chitobiose (**29**) auf dem Prionprotein als *crossed-eye* Projektion der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. In **violett** sind die Bereiche mit einer Änderung der chemischen Verschiebung von $\Delta\delta > 0.01$ ppm dargestellt, in **grün** die Bereiche, für die keine Änderung der chemischen Verschiebung erhalten wurde. Die Bindungsregion wird von der Helix-1 und dem Beginn der Helix-3 gebildet und unterscheidet sich somit deutlich von der Bindungsregion, die für das Peptid **1** bestimmt wurde.

Die Bindungsregion auf dem Prionprotein umfasst den Bereich der Helix-1, wo das Tyr145, das Tyr149 mit dem Asn153 und dem Arg156 die Bindungsregion bilden, sowie den Beginn der Helix-3, aus der das Thr201 an der Bindung beteiligt ist. Die Beteiligung des Thr193 an der Bindungsregion, dessen Signal mit dem des Thr201 überlagert, ist sehr unwahrscheinlich, da das Thr201 genau gegenüber dem bindenden Bereich der Helix-1 liegt und so mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine Veränderung der chemischen Verschiebung

erfährt. Zudem zeigt auch die C-terminal gelegene Aminosäure, das Asp202, eine deutliche Veränderung in der chemischen Verschiebung.

3.8.4 Dockingstudien der Chitobiose

Für eine abschließende Bewertung dieser Bindungsregion wurden *molecular docking* Studien mit der Chitobiose (**29**) durchgeführt, die mögliche Interaktionen einzelner Molekülgruppen zwischen dem Protein und der Chitobiose (**29**) verdeutlichen sollten.

Als Grundlage für das *docking* wurde mit der von Zahn *et al.* aufgeklärte NMR-Struktur des humanen Prionproteins 121-230 gearbeitet (PDB: 1qm2), das mit Ladungen des Typs Gasteiger-Hückel versehen wurde und nach einer energetischen Minimierung eine Energie von -114 kcal/mol aufwies. Die Struktur von **29** wurde mittels der Software Sybyl 7.5 aufgebaut und die Konformation der *N*-Acetylgruppen manuell eingestellt, so dass diese äquatorial zu dem Sechsring der Grundstruktur standen. Die so erhaltene Struktur wurde ebenfalls energetisch minimiert und wies eine Energie von 12.8 kcal/mol auf.

Für das *docking* war es besonders wichtig, die Lage der Chitobiose (**29**) in der Bindungstasche richtig zu bewerten. Da in dem natürlichen Prionprotein die Chitobiose (**29**) nur der Beginn einer Oligosaccharidstruktur ist, müssen die Hydroxylgruppen am C1-Atom, über welches die Bindung an das Asparagin des Proteins stattfindet und am C4'-Atom, an dem die weitere Saccharidstruktur gebunden ist, frei zugänglich sein und dürfen nicht in einer Mulde der Proteinoberfläche liegen oder gar als H-Donor an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sein. Auch wenn die nachgewiesene Bindung nur für die reine Chitobiose gültig ist, so muss davon ausgegangen werden, dass auch die gesamte Oligosaccharidstruktur der *N*-Typ Glycane an das Prionprotein bindet.

Die *docking*-Experimente wurden unter Verwendung der in *Sybyl* implementierten Software *FlexiDock*TM durchgeführt. Bei dieser Software wird der Ligand manuell in den Bereich der Bindungstasche vorpositioniert, wobei hier schon auf die freie Zugänglichkeit der C1 und C4'-Position geachtet wurde. Die für das *docking* verwendeten Ladungen entsprachen denen nach Gasteiger-Hückel und die maximale Anzahl der Iterationen betrug 300000.^{194;195} Die Bindungsenergien der erhaltenen Protein-Ligand-Komplexe wurden mit Hilfe der Gleichung 14 berechnet.

$$E_{\text{Bindung}} = E_{\text{Komplex}} - (E_{\text{Ligand}} + E_{\text{Protein}})$$

Gleichung 14: Berechnung der Bindungsenergie des gedockten Liganden (E_{Bindung}). Mit E_{Komplex} = berechnete Energie des Proteinligandkomplexes, E_{Ligand} = ermittelte Energie des Liganden, E_{Protein} = ermittelte Energie des Proteins.

Die Lage der Chitobiose in der Bindungsregion konnte nicht genauer spezifiziert werden, da keine Aussagen über das Bindungsepitop gemacht werden können, weshalb verschiedene Möglichkeiten der Orientierung des Liganden für das *docking* berücksichtigt werden mussten.

Für das erste *docking* wurde der Ligand im Bereich der Helix-1 vorpositioniert. Das Ergebnis des *dockings* lieferte eine Bindungsenergie von -18.4 kcal/mol. Bei diesem Ergebnis kommt es unter anderem zu einer hydrophoben Wechselwirkung des C5- und C6-Atoms mit der β - und γ -Methylengruppe des Glu152. Für die Bewertung des Ergebnisses wesentlich wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass die Hydroxylgruppe am C4'-Atom nicht frei zugänglich ist, sondern an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, die zwischen der Hydroxylgruppe und dem Sauerstoffatom der Säureamidgruppe des Asn153 gebildet wird. Für eine bessere Veranschaulichung ist das Ergebnis in Abbildung 57 gezeigt.

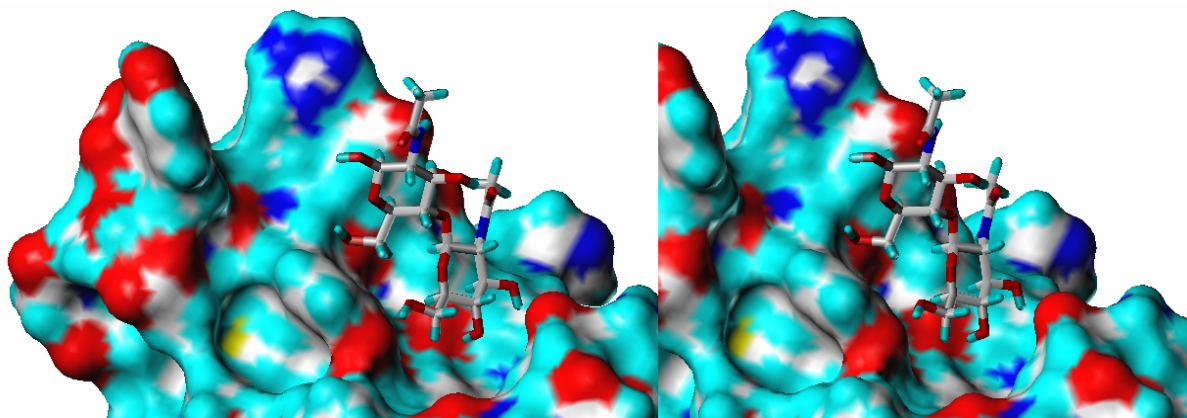


Abbildung 57: Darstellung des *docking* Ergebnisses für die Chitobiose (**29**) in der *crossed-eye* Darstellung unter Verwendung der berechneten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Die Bindungsenergie beträgt -18.4 kcal/mol, jedoch liegt die Hydroxylgruppe des C4'-Atoms nicht frei vor, sondern ist an einer H-Brückenbindung beteiligt. Dieses Ergebnis entspricht somit nicht den Vorgaben, die von einer Oligosaccharidstruktur ausgehen, welche über jenes C4'-Atom gebunden ist.

Für das weitere *docking* wurde die Vorpositionierung des Liganden geändert, damit diese H-Brückenbindung der Hydroxylgruppe am C4' nicht mehr auftreten kann. Das so erhaltenen Ergebnis führte zu einer Bindungsenergie von -19.5 kcal/mol, so dass im Vergleich zu dem vorherigen Ergebnis eine Verbesserung der Bindungsenergie um 1.1 kcal/mol erreicht wurde. Zudem sind bei diesem Dockingergebnis die wichtigen Positionen an dem C1 und dem C4'-Atom frei, so dass diese Positionierung auch im Falle eines Oligosaccharids möglich wäre.

An der Bindung beteiligt sind zum einen die *N*-Acetylgruppe am C2'-Atom, die zum einen über den Stickstoff des Amids eine H-Brückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff der Seitenkette des Asn153 vermittelt und die zudem mit der Methylgruppe des Acetats in einer hydrophoben Tasche liegt. Die zweite *N*-Acetylgruppe, welche am C2-Atom des anderen GlcNAc-Restes gebunden ist, vermittelt ebenfalls eine hydrophobe Wechselwirkung mit den β - und γ -Methylengruppen des Glu152. Eine weitere hydrophobe Wechselwirkung besteht zwischen der Methylengruppe des C6 und dem aromatischen Ring des Tyr149. Das Ergebnis ist in Abbildung 58 noch einmal graphisch dargestellt.

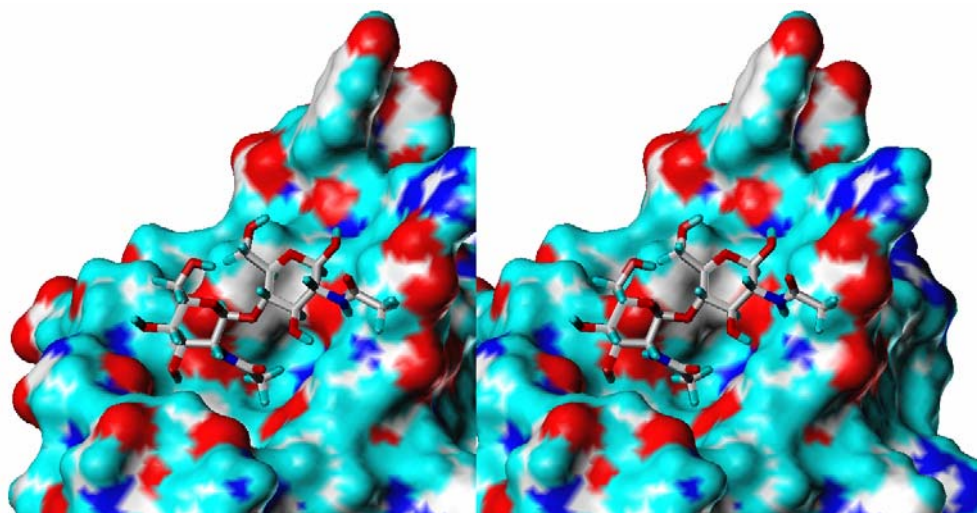


Abbildung 58: Darstellung des *docking* Ergebnisses für die Chitobiose (**29**) in der *crossed-eye* Darstellung unter Verwendung der berechneten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Die Bindungsenergie beträgt -19.5 kcal/mol, was einer Verbesserung der Bindungsenergie im Vergleich zu dem vorherigen Ergebnis um 1.1 kcal/mol bedeutet. Sowohl die C1-, als auch die C4'-Position liegen frei vor. Allerdings ist die Nähe zu Aminosäuren, die in den ^1H , ^{15}N -HSQC Experimenten keine Veränderung der chemischen Verschiebung zeigten, sehr groß.

Bei diesem Ergebnis besteht jedoch eine große Nähe zu dem Glu196 und dem Asn197, die in den ^1H , ^{15}N -HSQC Experimenten jedoch keine deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung zeigten. In Abbildung 59 ist das Ergebnis gezeigt, das nach erneuter Variation der Vorpositionierung erhalten wurde.

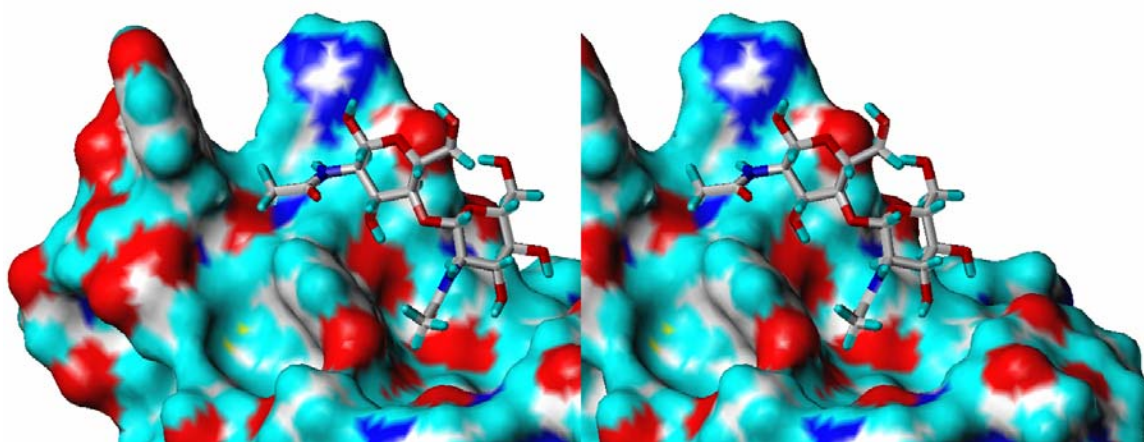


Abbildung 59: Darstellung des *docking* Ergebnisses für die Chitobiose (**29**) in der *crossed-eye* Darstellung unter Verwendung der berechneten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Die Bindungsenergie beträgt -23.3 kcal/mol und entspricht somit der niedrigsten erhaltenen Bindungsenergie. Sowohl die C1-, als auch die C4'-Position liegen frei vor und die Chitobiose liegt sehr gut in dem Bereich, der durch die ^1H , ^{15}N -HSQC Experimente als Bindungsregion postuliert wurde.

Die Bindungsenergie für diesen Komplex liegt bei -23.3 kcal/mol und stellt somit die niedrigste Bindungsenergie aller bisherigen Komplexe dar. Der Ligand geht unter anderem eine H-Brückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff der Seitenkette des Asn153 ein, welche

auch in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Experimenten eine deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung aufwies. Zudem werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Methylgruppe des N-Acetyls an der C2-Position mit der Seitenkette des Tyr149 eingegangen. Auch diese Aminosäure war als Teil der Bindungsregion identifiziert worden. Weitere hydrophobe Wechselwirkungen werden zwischen dem C2-Atom und β - und γ -Methylengruppen des Glu152 gebildet.

Dieses letzte Ergebnis der *docking* Studien steht in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten und kommt dem wahren Bindungsmodus sehr nahe.

3.9 Kombination der Bindungsepitope von Peptid 1 und Chitobiose

Für das Peptid $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) konnte eine Bindung an das humane Prionprotein mit einer Bindungskonstanten $K_D = 25 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden und es wurde des Weiteren für dieses Peptid ein aggregationsinhibitorisches Potential nachgewiesen. Für die Bindung von Chitobiose an das Prionprotein wurde eine Bindungskonstante von $K_D = 3666 \mu\text{M}$ nachgewiesen. Da die beiden Bindungsregionen sich unterscheiden, kann für die Bindungseigenschaft eines Liganden, der beide Bindungsmotive in sich vereint eine wesentlich bessere Bindung erhalten werden. Bei einer perfekt aufeinander abgestimmten Kombination beider Motive könnte durch die Multiplikation der beiden einzelnen Bindungskonstanten die Bindungskonstante des kombinierten Liganden auf $K_D = 92 \text{ nM}$ verbessert werden. Um diesen Effekt nutzen zu können, sollte die Chitobiose (**29**) über einen geeigneten Linker an das Peptid **1** gebunden werden.

3.9.1 Synthese des Chitobiosylasparaginbausteins

Die optimale Länge des Linkers ist im Regelfall abhängig von dem Abstand der beiden beteiligten Bindungsregionen. Da jedoch in diesem Fall von einer Protein-Protein-Interaktion ausgegangen wurde, musste nun der Abstand der beiden beteiligten Bereiche innerhalb des Proteins bestimmt werden. Es wurde daher unter Zuhilfenahme der von Zahn *et al.* aufgeklärten NMR-Struktur des Prionproteins der Abstand zwischen der Glycosylierungsstelle Asn197 und dem Bereich der Sequenz $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ bestimmt. Da die Substitution des Pro158 in dem Alaninscan keine negative Auswirkung auf die Bindungsaffinität hatte, wurde zunächst diese Aminosäure als möglicher Ort für den Aminosäure-Chitobiose-Bausteins gewählt. Die Bestimmung des Abstandes zwischen der β -Methylengruppe des Pro158 und der Amidgruppe des Asn197 ergab einen Abstand von 15.8 Å. Im Falle eines Linkers, der aus zwei Molekülen 5-Aminopentansäure zusammengesetzt und an das γ -C-Atom eines Asparagins gebunden ist, beträgt die Linkerlänge 16.0 Å (Abbildung 60).

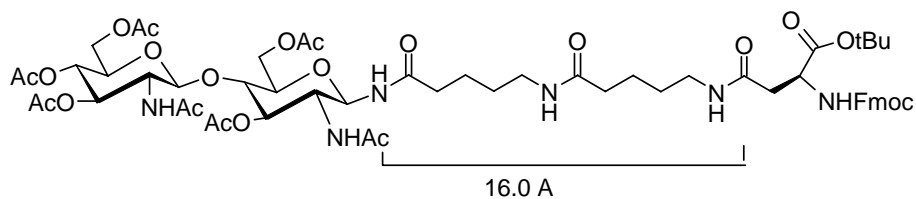


Abbildung 60: Die Abbildung zeigt die Strukturformel der peracetylierten Chitobiose, die über einen *Bis-5*-Aminopentansäure-Linker an Asparagin gebunden ist, das an der Aminogruppe Fmoc-geschützt und an der Carboxylatgruppe *t*-Butyl-geschützt vorliegt. Die Länge des Linkers beträgt 16,0 Å.

Die Synthese eines solchen Bausteins kann ausgehend von der Chitobiose auf einfache Art und Weise durch Amidkupplungen erfolgen. Abbildung 61 zeigt das Syntheschema für den Aufbau des *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'*N*-(asparaginylo-*t*-butyl)-*N*-(9*H*-9-fluorenylmethoxycarbonyl))aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosidbausteins.

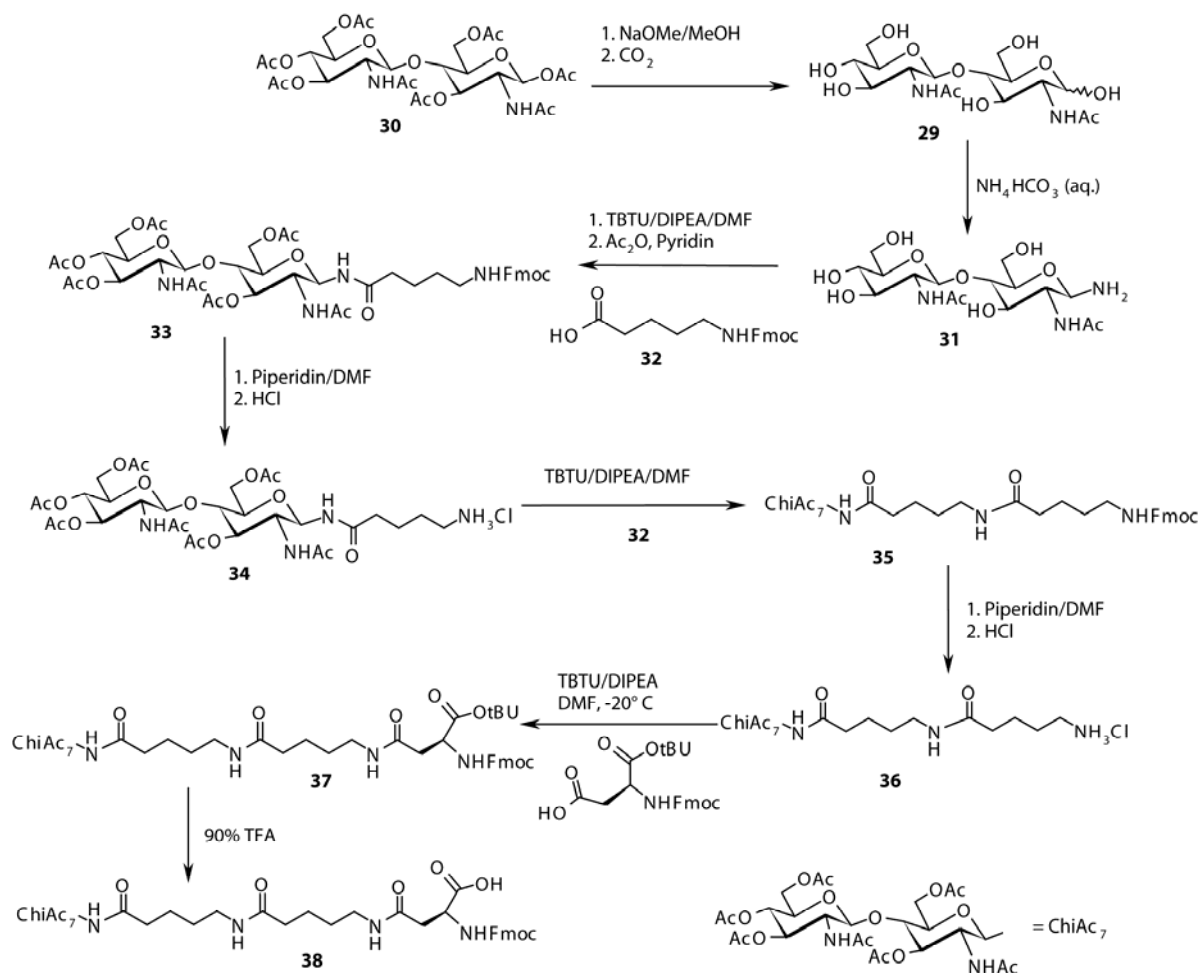


Abbildung 61: Schema der Synthese des *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'*N*-(asparaginylo-*t*-butyl)-*N*-(9*H*-9-fluorenylmethoxycarbonyl))aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosidbausteins **38**. Ausgehend von Chitobioseoctaacetat (**30**) wird durch Abspaltung der Acetatgruppen die Chitobiose (**29**) erhalten. Nach Aminierung am C-1 Atom (**31**) wird in zwei Schritten durch Amidkupplung der *Bis-5*-Aminopentansäure-Linker aufgebaut (**35**). Abschließend erfolgt die Amidbindung an das γ -C-Atom des Aspartats zu **37**, der nach Abspaltung der *t*-Butyl-Gruppe mit TFA (90%) den Baustein **38** ergibt.

Ausgehend von Chitobioseoctaacetat (**30**), das durch saure Hydrolyse aus Chitin gewonnen werden kann, erfolgt nach Abspaltung der Acetatgruppen nach Zemplen die quantitative Aminierung der Chitobiose (**29**) mit Ammoniumhydrogencarbonat zur 1-Aminochitobiose (**31**).^{202;203} Die nachfolgende Knüpfung der Amidbindung mit Fmoc-5-aminopentansäure (**32**) und die anschließende Acetylierung der Hydroxylgruppen lieferte **33** mit einer Ausbeute von 49%.²⁰⁴ Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Ethanol. Die Fmoc-Gruppe von **33** wurde durch Piperidin in DMF entfernt und lieferte das Hydrochlorid **34**. Hierbei musste die Konzentration des Piperidin auf 2% (v/v) gesenkt werden und die Reaktion bei einer Temperatur von -15°C erfolgen, um eine Umamidierung zu verhindern, in deren Rahmen sich ein polymeres Derivat der 5-Aminopentansäure bildete. Da diese Nebenreaktion auch bei der Aufarbeitung, besonders beim Entfernen des Lösungsmittels, auftreten konnte, musste die Reaktionslösung zunächst mit konzentrierter Salzsäure angesäuert werden, die äquimolar zu der Menge des entstehenden Amins und dem eingesetzten Piperidin hinzugegeben wurde. Die dabei entstehenden Mengen des Piperidiniumhydrochlorids konnten zu einem großen Teil durch Verminderung des Lösungsmittelvolumens ausgefällt werden. Die weitere Reinigung erfolgte wegen der hohen Polarität von **34** mittels *RP*-HPLC und lieferte das Produkt in hoher Reinheit mit 57%iger Ausbeute. Die darauf folgende erneute Kupplung der zweiten Einheit Fmoc-5-aminopentansäure (**32**) zu **35** erfolgte analog der ersten Kupplung und lieferte eine Ausbeute von 67%. Ebenso wurde die Abspaltung der Fmoc-Gruppe und die Reinigung analog zu der vorangegangenen durchgeführt und lieferte **36** mit 24% Ausbeute. Für den Einbau des Bausteins war nun noch die Kupplung von **36** an die Carboxylgruppe der Seitenkette des Aspartats nötig. Diese Reaktion wurde ebenfalls analog zu den oben genannten Kupplungen durchgeführt, allerdings wurde die Reaktionstemperatur auf -20°C gesenkt, um die Bildung eines fünfgliedrigen Lactams zu minimieren. Nach Umkristallisation aus Ethanol und anschließender säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel wurde **37** mit 72% Ausbeute erhalten. Die anschließende Abspaltung der ⁴Butyl-Gruppe mit 90% TFA verlief quantitativ und ergab den Baustein **38** der nun in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden konnte.

3.9.2 Synthese des Glycopeptids **39**

Die Synthese des Glycopeptids **39** (¹⁵³NMHRYN(Link-Chi)NQ¹⁶⁰) (Abbildung 62) erfolgte manuell in einem 50 µmol Ansatz in welchem die natürlichen Aminosäuren mit einem vierfachen Überschuss und TBTU sowie DIPEA mit einem fünffachen Überschuss eingesetzt wurden. Wegen der aufwendigen Synthese des Bausteins **38**, wurde dieser nur in einem 1.2 fachen Überschuss eingesetzt. Da die Chitobiose im peracetylierten Zustand an den Baustein gebunden ist, erfolgte nach der Peptidsynthese die Abspaltung der Acetatgruppen. Hierzu wurde das Peptid noch am Harz mit Hydrazinhydrat in Methanol (1:5 v/v) behandelt.

Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte unter Standardbedingung mit TFA/TIPS/H₂O (95/3/2 v/v) für zweimal drei Stunden.

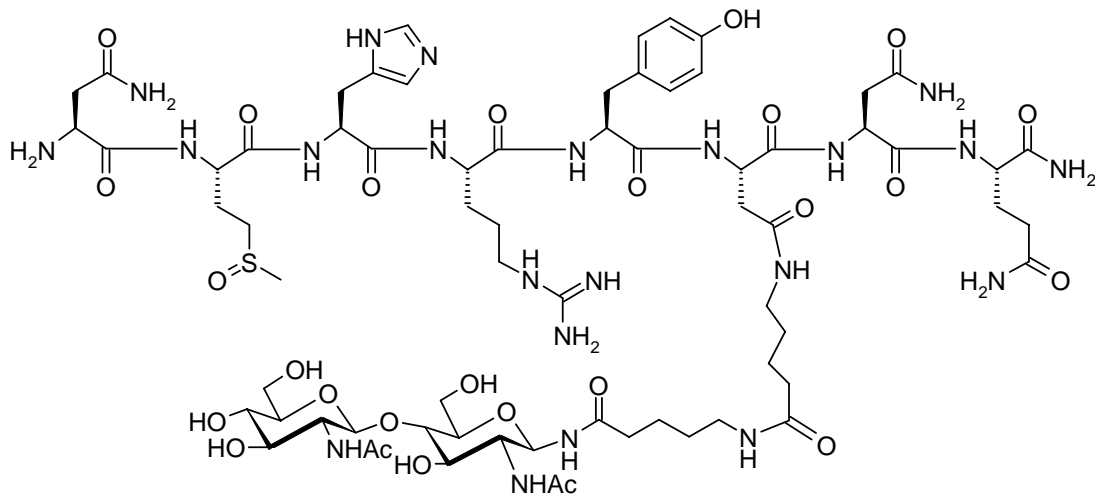


Abbildung 62: Graphische Darstellung des Peptids **39**, welches nur als Sulfoxid des Methionins erhalten werden konnte. Das Peptid beinhaltet anstelle des Pro158 ein Asparagin, an dessen γ -C-Atom über einen Bis-5-Aminopentansäure-Linker Chitobiose gebunden ist. Der Linker, mit einer Länge von 16,0 Å überbrückt den Abstand zwischen Peptid und Chitobiose, der 15,8 Å beträgt, sehr gut.

Bei dieser Synthese verlief die Kupplung der ersten beiden Aminosäuren nur mit schlechten Ausbeuten. Die Bestimmung des abgespaltenen Methylenfluorens nach der Kupplung der zweiten Aminosäure ergab einen Wert von 30 μmol , was einer prozentualen Ausbeute von 60% entspricht. Die darauf folgende Kupplung des Bausteins **38**, konnte dann nur mit einer Ausbeute von 3,6 μmol erfolgen, so dass die Ausbeute auf 7% vermindert wurde. Nach beendeter Synthese und nach Abspaltung der Acetatgruppen der Chitobiose konnte die Menge des abgespaltenen Methylenfluorens auf 1,55 μmol bestimmt werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 3%. Nach der anschließenden Reinigung des Peptids über RP-HPLC konnten 830 μg (0,48 μmol) erhalten werden, was einer Ausbeute von 1% entspricht. Zudem wurde entweder während der Synthese oder unter den Abspaltungsbedingungen der Thioether des Methionins vollständig zum Sulfoxid oxidiert. Wegen der aufwendigen Synthese des Bausteins **38** wurde das erhaltene Peptid **39** trotzdem für die nun folgenden SPR-Studien verwendet.

3.9.3 SPR-Bindungsstudien mit dem Peptid **39**

Die Bindungsaffinität des Peptids **39** wurde über SPR-Experimente an einem Biacore 3000 Gerät durchgeführt. Die Kupplung des hPrP(90-230)-His-Tag erfolgte mittels EDC/NHS-Kupplung in Natriumacetatpuffer (pH 4,5) an einen CM5-Chip, an die im Anschluss die Blockierung nicht umgesetzter Bindungsstellen mittels Ethanolamin durchgeführt wurde.

Es wurden 6798 RU des Proteins immobilisiert, was einer Chipbelegung von 331 fmol entspricht. Für das Peptid **39**, dessen Molmasse 1696 g/mol beträgt, wird somit ein RU_{\max} -Wert von 561 RU erwartet.

Für die Bestimmung der Bindungskonstante des Peptids **39** wurden Ligandkonzentrationen zwischen 5 und 400 μM über den Messchip geleitet. Die erhaltenen Sensorgramme sind in Abbildung 63 gezeigt.

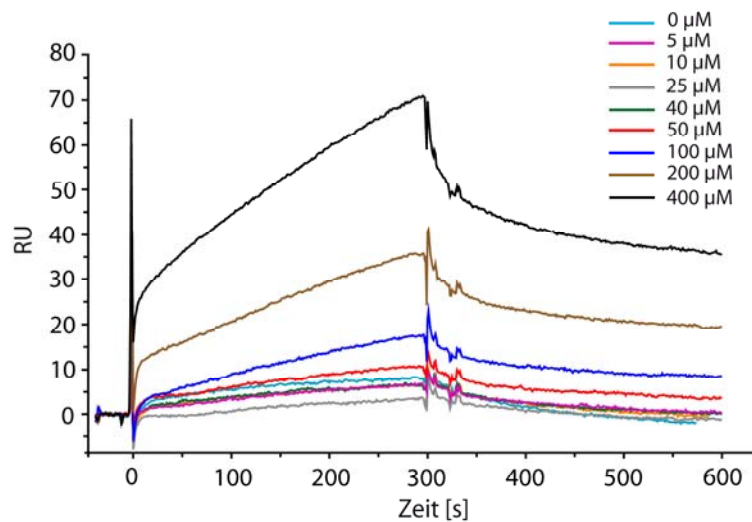


Abbildung 63: Sensorgramme der SPR-Studien des Peptids (**39**) gegen das humane Prionprotein (90-230)-His-Tag. Die Sensorgramme sind der jeweiligen Ligandkonzentration entsprechend farblich markiert. Es ist klar erkennbar, dass die Sensorgramme aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen keinen Sättigungswert erreichen und dass nach beendeter Injektion die Basislinie nicht wieder erreicht wird.

Bei der Betrachtung der Sensorgramme erkennt man, dass ab einer Konzentration von 50 μM die Basislinie nicht mehr erreicht wird und die Bindungskurve keinem Sättigungswert zustrebt. Dies ist auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Ligand und dem Protein zurückzuführen. Diese können zum einen durch das oxidierte Methionin oder zum anderen durch den Linker hervorgerufen werden. Da eine Regeneration der Bindungsstellen mit hohen Salzkonzentrationen oder mit verdünnter Phosphorsäure wegen der Konformationsinstabilität des Prionproteins nicht durchgeführt werden konnte, ist davon auszugehen, dass es zu einer dauerhaften Bindung des Liganden gekommen ist. Aus diesem Grund ist die Auswertung der Kurven nicht trivial. Werden nur die RU_{\max} -Werte am Ende der Bindungskurve betrachtet, so werden auch die unspezifischen Anteile an der Bindung mit berücksichtigt, was im Affinitätsplot zu einem linearen Verlauf der Bindungskurve führt. Werden die RU_{\max} -Werte am Beginn der Sensorgramme ermittelt, kann der erhaltene Wert zu klein sein, da der Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht wurde, was zu einer schwächeren Bindungskonstante führt. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der RU_{\max} -Werte zwischen der Kurve am Ende der Assoziationszeit und nach Erreichen des Dissoziationsgleichgewichts am Ende der Dissoziationszeit. Da die unspezifischen

Wechselwirkungen eine stärkere Bindung aufweisen, als die spezifischen, was daran zu erkennen ist, dass die Basislinie nicht wieder erreicht wird, wird auf diese Weise nur der spezifische Anteil der Bindung bewertet. Werden die so ermittelten RU_{\max} -Werte gegen die Ligandkonzentration aufgetragen, so ergibt sich der in Abbildung 64 gezeigte Affinitätsplot.

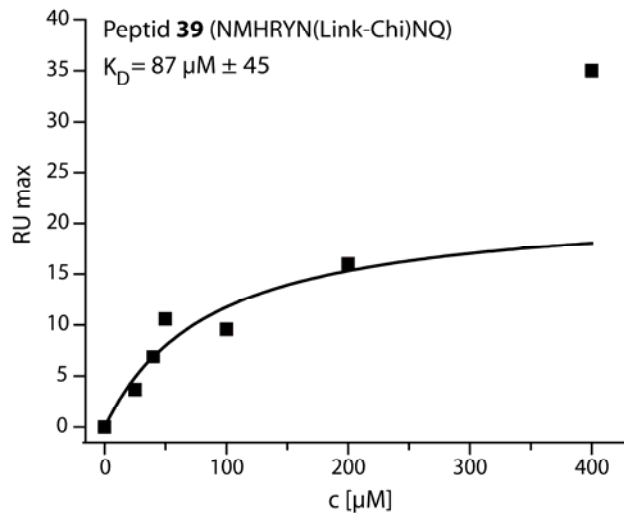


Abbildung 64: Affinitätsplot des Peptids **39** gegen das hPrP(90-230)-His-Tag. Die ermittelte Bindungskonstante von $K_D = 87 \mu\text{M}$ ist in der selben Größenordnung, wie die Bindungskonstante der Peptide **1** und **15**. Die gewünschte Verbesserung der Bindungskonstante konnte nicht erreicht werden, jedoch kommt es auch zu keiner gravierenden Verschlechterung der Bindungseigenschaften.

Die RU_{\max} -Werte wurden nach dem *one-site-binding* Modell angefitet, wobei der Wert bei einer Ligandkonzentration von $400 \mu\text{M}$ nicht berücksichtigt wurde. Hieraus ergab sich eine Bindungskonstante von $K_D = 87 \mu\text{M}$.

Unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass im Falle der Substitution des Pro158 die Bindungskonstante $29 \mu\text{M}$ betrug und das Peptid **1** einen K_D -Wert von $25 \mu\text{M}$ aufwies, konnte das Ziel die Bindungskonstante durch die Verknüpfung der beiden Bindungsepitope zu verbessern, nicht erreicht werden. Jedoch ist die Bindungskonstante für das Peptid **39** immer noch in der gleichen Größenordnung, so dass es zu keiner gravierenden Verschlechterung der Bindung kam. Es ist wahrscheinlich, dass der Abstand zwischen Peptid und Kohlenhydrat nicht exakt die Anforderungen erfüllt, so dass die Bindung erhalten bleibt jedoch nicht die gewünschte Verbesserung erreicht wird.

Die Menge des erhaltenen Peptids **39** reichte nicht für den Test im Aggregationsassay aus, weshalb auch im Hinblick auf die schlechtere Bindung hierauf verzichtet wurde.

3.9.4 Synthese des Glycopeptids 40

Für das Peptid **39**, in dem das Pro158 gegen Asparagin substituiert wurde und über einen 16 \AA -Linker Chitobiose gebunden ist, konnte keine Verbesserung der Bindungseigenschaften nachgewiesen werden. Da davon auszugehen ist, dass der Abstand zwischen den beiden

beteiligten Bindungsregionen durch den Linker nicht genau überbrückt wird, wurde als Alternative der Abstand zwischen der β -Methylengruppe des Arg156 und der Amidgruppe des Asn197 bestimmt, da das Arg156 eine ähnliche räumliche Ausrichtung hat wie das Pro158. Der gemessene Abstand beträgt 15.3 Å und liegt somit in einem Bereich, der noch durch den Linker überbrückt werden kann, ohne dass der Linker zu lang ist. Es wurde daher das Glycopeptid **40** synthetisiert, in dem das Arg156 gegen den Baustein **38** substituiert wurde. Das Peptid ist in Abbildung 65 gezeigt.

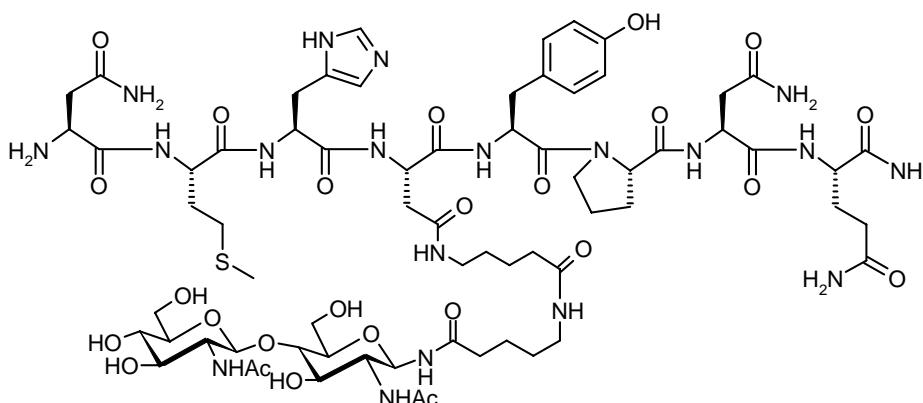


Abbildung 65: Graphische Darstellung des Peptids **40**. Das Peptid beinhaltet anstelle des Arginins an Position 156 ein Asparagin, an dessen γ -C-Atom über einen *Bis*-5-Aminopentansäure-Linker Chitobiose gebunden ist.

Die Synthese des Peptids **40** erfolgte in einem 50 μ mol Ansatz und wurde analog der Synthese von **39** durchgeführt. In diesem Fall ist der Baustein **38** weiter von der Harzbindungsstelle entfernt, so dass die Ausbeuten der Kupplungen wesentlich besser verlaufen. Die Menge des abgespaltenen Methylfluorens wurde photometrisch auf 9.5 μ mol bestimmt, was einer Ausbeute von 19% entspricht.

Nach Deacetylierung der Kohlenhydrateinheit und anschließend erfolgter Abspaltung des Peptids vom Harz mit TFA/TIPS/H₂O (95/3/2 v/v) wurde zunächst eine Vorreinigung mit ¹Butyl-Methylether durchgeführt und das so erhaltene Rohprodukt über *RP*-HPLC gereinigt. Es wurden 7.6 mg des Glycopeptids **40** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 9% bezogen auf die Bindungsstellen am Harz und ist deutlich besser, als die für die Synthese des Peptids **39** erhaltene Ausbeute.

3.9.5 SPR-Bindungsstudien und Aggregationsassay des Peptids **40**

Die Bindungsstudien mit dem Glycopeptid **40** ¹⁵³NMHN(Link-Chi)YPNQ¹⁶⁰ wurden analog denen des Peptids **39** durchgeführt. Es wurden 7393 RU des Proteins immobilisiert, was einer Chipbelegung von 366 fmol entspricht. Die erwartete RU_{max}-Antwort für das Peptid **40** betrug somit 593 RU. Die Proteinaktivität wurde mit Peptid **1** getestet, wobei sich abzeichnete, dass wie bei den vorherigen Messungen ein großer Teil des Proteins nicht aktiv

war. Die Sensorgramme, die erhalten wurden, zeigten nicht die unspezifischen Wechselwirkungen, die beim Peptid **39** aufgetreten waren (Abbildung 66). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht der Linker zu diesen Wechselwirkungen führte, sondern dass es an der Positionierung innerhalb des Peptids liegt.

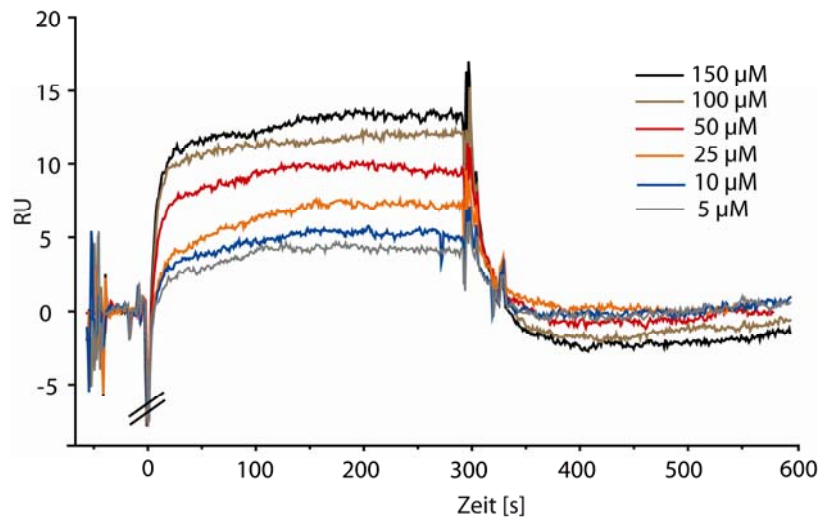


Abbildung 66: Sensorgramme der SPR-Studien des Peptids (**40**) gegen das humane Prionprotein (90-230)-His-Tag. Die Sensorgramme sind der jeweiligen Ligandkonzentration entsprechend farblich markiert. Die Sensorgramme zeigen nach beendeter Assoziation eine vollständige Dissoziation des Liganden.

Die Auftragung der RU_{max} -Werte gegen die Konzentration und der anschließende Fit nach dem *one-site-binding* Modell lieferte eine Bindungskonstante von $K_D = 52 \mu M$ (Abbildung 67).

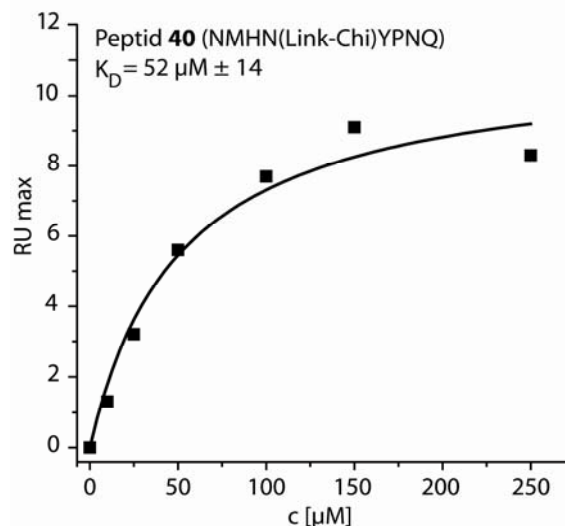


Abbildung 67: Affinitätsplot des Peptids **40** gegen das hPrP(90-230)-His-Tag. Die ermittelte Bindungskonstante von $K_D = 52 \mu M$ ist in der selben Größenordnung wie die Bindungskonstante des Peptids **1**, jedoch deutlich besser, als die des Peptids **13**, das für den Fall der Substitution des Arg156 gegen Alanin eine deutliche Verschlechterung der Bindungseigenschaften aufwies. Durch die Kombination beider Bindungssepitope konnte also ein deutliche Steigerung der Bindungsstärke erreicht werden.

Auch wenn der K_D -Wert ungefähr in der Größenordnung des Peptids **1** liegt, so ist dieser deutlich besser, als der des Peptids **13**, in dem das Arg156 gegen Alanin substituiert wurde und das mit einem K_D -Wert von 1646 μM bindet. Es konnte also die Bindungseigenschaft des Peptids wieder in den ursprünglichen Bereich der Bindungsstärke zurückerhalten werden. Dies spricht dafür, dass beide Bindungsregionen durch dieses Peptid belegt werden können. Es war nun interessant, inwieweit dieses Peptid ein inhibitorisches Potential in dem *in vitro* Aggregationsassay aufweist.

Der Aggregationsassay wurde mit dem hPRP(90-230)-His-Tag analog zu den vorherigen durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug auch in diesem Fall 210 μM und das Peptid **40** wurde in einem siebenfachen Überschuss eingesetzt, was einer Peptidkonzentration von 1500 μM entspricht. Es zeigte sich, dass das Peptid **40** keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten hat. Die Aggregation wurde kaum inhibiert, so dass nach beendeter Aggregation $43 \pm 10\%$ des Proteins in gelöster Form vorlag. Vergleicht man dies mit dem inhibitorischen Potential des Peptids **1**, das die Aggregation zu 80% inhibiert und des Peptids **13**, welches trotz der Substitution des Arginins die Aggregation zu 70% inhibiert, so ist dies eine deutliche Verschlechterung der protektiven Eigenschaften (Abbildung 68).

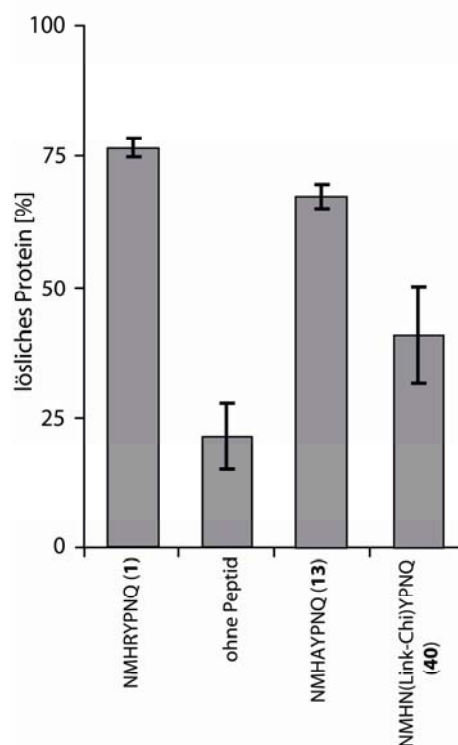


Abbildung 68: Zusammenfassung der Ergebnisse des Aggregationsassays mit dem Peptid **40**. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Peptide **1** und **13** ebenfalls dargestellt. Die Kontrollprobe ohne Peptid führt zu einer Aggregation von 80% des Proteins. Im Falle des Peptids **1** beträgt der Verlust nur 20%, das Peptid **13** verhindert die Aggregation um 70%. Das Peptid **40** dagegen führt nur zu einer Verringerung der Aggregation auf 43%.

Die verschlechterten protektiven Eigenschaften des Peptids **40** im Vergleich mit den Peptiden **1** und **13** können auf eine mögliche Veränderung der Konformation des Peptids in der Bindungsregion zurückgeführt werden, die dazu führt, dass die Abschirmung und Stabilisierung der Domäne, die für die Konformationsänderung des Proteins nötig ist nicht mehr ausreichend gewährleistet werden kann. Ein negativer Einfluss durch die Substitution des Arginins kann ausgeschlossen werden, da das Peptid **13** keinen Verlust des protektiven Potentials aufweist.

3.10 Ausblick

Das Peptid $^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$ (**1**) ist in einem *in vitro* Aggregationsassay als Inhibitor der Prionprotein-Aggregation identifiziert worden. Mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, die sowohl die Bindungsregion auf dem Prionprotein, als auch das Bindungsepitop des Peptids umfassen, können die aggregationsinhibitorischen Eigenschaften des Peptids für die Entwicklung einer Leitstruktur verwendet werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, wäre es sinnvoll, eine Kokristallisation des Peptids **1** mit dem Prionprotein zu erreichen. Mit dem so erhaltenen Kristall ist eine weiterführende Charakterisierung der Interaktion von Peptid und Protein möglich, die durch die NMR-Daten nicht erhalten werden konnte.

Gerade im Hinblick auf den Mechanismus der Aggregationsinhibition könnten die so gewonnenen Daten wichtige Informationen enthalten, wie das Peptid den Konformationswechsel des Proteins verhindert. Des Weiteren werden zusätzliche Informationen über die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, wie zum Beispiel die Ausbildung von Salzbrücken oder Wasserstoffbrückenbindungen, erhalten, die für die Weiterentwicklung des Liganden zu einer Leitstruktur nötig sind.

Da das Histidin bei allen inhibitorisch wirksamen Peptiden in der Sequenz vorkommen muss, jedoch das Vorkommen dieses Histidins nicht zwangsläufig zu einer inhibitorischen Wirkung führt, ist eine Untersuchung dieses Einflusses für die Aggregationsinhibition ebenfalls dringend nötig. Obwohl erste Hinweise, die durch das Peptid **23** erhalten wurden, darauf hinweisen, dass die Sequenz keinen Einfluss auf die Kupferionenkonzentration hat, müsste der Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Möglichkeit des Histidins Kupferionen zu binden und so die Konzentration der oxidationsvermittelnden Spezies zu erniedrigen, untersucht werden.

Doch auch mit den bis jetzt erhaltenen Daten der Bindungsregion und der Aggregationsassays ist die Weiterentwicklung des Liganden möglich. Als nächster Schritt bietet es sich zunächst an, durch *molecular docking* peptidomimetische Strukturen zu entwickeln, die zum einen eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen und zum anderen verbesserte Bindungseigenschaften bei Erhalt der inhibitorischen Wirkung aufweisen.

Die konformationsstabilisierenden Eigenschaften des Peptids **1** müssen auch in weiteren Assays untersucht werden. Hierbei sind vor allem *in vivo* Tests in Zellkulturen nötig, zum Beispiel ScN2a Zellen (*scrapie infected neuroblastoma cells*), in denen das Prionprotein überexprimiert wird.²⁰⁵

Sollten diese Tests positiv verlaufen, bieten sich für die Zukunft auch *in vivo* Studien an Tieren an. Ein erster Schritt in diese Richtung wird zur Zeit unternommen, da die *in vivo* Infektiosität der Aggregate die aus dem *in vitro* Assay von Redecke *et al.* erhalten werden, in einem Maus-Modell untersucht werden. Sollte sich zeigen, dass diese Aggregate infektiös sind, wären *in vivo* Test mit dem Peptid **1** oder weiterentwickelten Liganden möglich.

4 Zusammenfassung

Der Erreger der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien ist das Prionprotein, das in zwei verschiedenen Konformationen vorkommt. Für die Konformationsänderung des zellulären Prionproteins PrP^C in das pathogene PrP^{Sc} wird die direkte Interaktion der beiden Proteinkonformere angenommen. Die Inhibition dieser Wechselwirkung oder die Stabilisierung des zellulären Prionproteins ist ein möglicher Ansatzpunkt für Therapeutika. Für das Peptid ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ (**1**) konnte in einem *in vitro* Assay eine solche Stabilisierung der PrP^C Konformation nachgewiesen werden.¹⁸⁵

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Bindungsinteraktion zwischen dem Peptid **1** und dem humanen Prionprotein genauer zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden ¹H,¹⁵N-HSQC NMR-Experimente mit dem ¹⁵N-markierten hPrP(90-230) durchgeführt. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der Amidsignale bei An- und Abwesenheit des Peptids **1** lieferte zwei mögliche Bindungsregionen des Peptids auf dem Protein. Die erste Bindungsregion befindet sich demnach am Ende der Helix-1, während die zweite Region im Bereich der Helix-3 lokalisiert ist. Eine Bestätigung wurde durch MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente, in denen die Deuteriumeinbaurate einzelner Proteinfragmente in An- und Abwesenheit des Peptids **1** verglichen wurde, erreicht. Die Anwesenheit des Peptids **1** führte zu einer deutlichen Verringerung der Einbaurate für Fragmente aus dem Bereich der Helix-3, wodurch diese als Bindungsregion bestätigt werden konnte.

Für die Bestimmung des Bindungsseptops seitens des Liganden wurde zunächst ein Alaninscan der Sequenzen ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ (**1**) und ¹⁴⁹YYRENMHR¹⁵⁶ (**18**) durchgeführt und die Bindungseigenschaften mittels SPR-Experimenten bestimmt. Die Bindungskonstanten dieser Peptide variierten zwischen K_D = 29 μM für das Peptid ¹⁵³NMHRYANQ¹⁶⁰ (**15**) und 4880 μM für das Peptid ¹⁴⁹YYREAMHR¹⁵⁶ (**6**). Der Vergleich aller erhaltenen Bindungskonstanten lieferte ein erstes Bindungsseptop, welches, mit Ausnahme des Pro158, die gesamte Sequenz des Peptids ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ umfasste. Für die Erstellung des Bindungsseptops auf atomarer Ebene wurden STD NMR-Experimente mit dem Peptid ¹⁵³NAHRYPNQ¹⁶⁰ (**11**) durchgeführt. Das Asn153 und das Tyr157 tragen hiernach nur in geringen Umfang zur Bindung bei, während für das Arg156 und das Glu160 starke STD-Prozente bestimmt werden konnten und somit einen großen Beitrag zu der Bindung aufweisen müssen. Obwohl bei der Substitution des Pro158 gegen Alanin kein Effekt auf die Bindungsstärke beobachtet werden konnte, wird vergleichsmäßig viel Sättigung auf die Protonen dieses Prolins übertragen, so dass von einem beträchtlichen Bindungsbeitrag ausgegangen werden muss, die jedoch von der Methylgruppe des Alanins vollständig kompensiert werden kann.

Mit den Daten der Bindungsregion und des Bindungsepitops wurden *molecular docking* Studien durchgeführt, deren Ergebnisse in guter Übereinstimmung zu den experimentellen Daten stehen und die für die weitere Entwicklung der Leitstruktur verwendet werden können.

Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf das aggregationsinhibitorische Potential zu untersuchen, wurden neben den Peptiden des Alaninscans noch verschiedene, zum Teil verkürzte, Peptide synthetisiert und in einem *in vitro* Aggregationsassay untersucht. Obwohl kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Bindungsstärke und dem protektiven Potential erhalten werden konnte, wurde nachgewiesen, dass besonders das His155 für die inhibitorische Wirkung notwendig ist. Eine Verlängerung der Peptide über das C-terminale Gln160 oder das N-terminale Asn153 hatte keine Verbesserung dieser protektiven Wirkung zur Folge.

Durch CD-spektroskopische Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die Konformation des PrP^C während des Aggregationsassays durch die Anwesenheit des Peptids ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ (**1**) stabilisiert wird, während die Peptide **18** und **19** diesen stabilisierenden Effekt nicht aufweisen. In einem weiteren Assay, welcher auf der teilweisen Entfaltung des Prionproteins basiert, konnte keine stabilisierende Wirkung des Peptids nachgewiesen werden, was auf die stark denaturierenden Bedingungen des Assays zurückzuführen ist.

Für die Chitobiose konnte anhand von SPR-Messungen eine Bindung an das Prionprotein mit einem K_D-Wert von 3666 μM nachgewiesen werden. Durch ¹H,¹⁵N-HSQC NMR-Experimente mit dem ¹⁵N-markierten hPrP(90-230) konnte die Bindungsregion in einem Bereich zwischen der Helix-1 und dem Beginn der Helix-3 lokalisiert werden. Obwohl kein Bindungsepitop Chitobiose per STD NMR bestimmt werden konnte, war es möglich *molecular docking* Studien mit der Chitobiose durchzuführen, die in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten und den theoretischen Erwartungen waren.

Die Verbesserung der Bindungseigenschaften des Peptids **1** sollte durch die Kombination der Bindungsbeiträge des Peptids und der Chitobiose erfolgen, indem die Kohlenhydratstruktur mittels eines 16 Å Linkers mit dem Peptid verbunden wurde. Die Synthese dieses Linkers erfolgte über die zweifache Kupplung von 5-Aminopentansäure an 1-Aminochitobiose und anschließender Verknüpfung an die Seitenkette eines Aspartats. Dieser Baustein wurde in Peptid **39** anstelle des Pro158 und in Peptid **40** anstelle des Arg156 eingebaut. Die Bindungskonstanten für die beiden Peptide betragen K_D = 87 μM für das Peptid **39** und K_D = 52 μM für das Peptid **40** und konnten somit für das Peptid **39** nicht verbessert werden, während für das Peptid **40** eine 32fach bessere Bindungsaffinität im Vergleich zu dem Peptid **13** (¹⁵³NMHAYPNQ¹⁶⁰) erhalten wurde, indem das Arginin gegen Alanin substituiert wurde.

5 Summary

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are fatal neurodegenerative diseases caused by the prion protein. Pathogenesis of the prion protein is correlated with the conformational change from cellular prion protein (PrP^C) to the pathogenic isoform PrP^{Sc} which is believed to be mediated by contact from PrP^C with PrP^{Sc}. Thus, inhibition of this contact or stabilization of the cellular isoform is a potential route to drugs against TSE. The peptide ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ (**1**) was identified for binding to prion protein by screening of an octapeptide library.¹⁸⁵

For further investigation of binding interaction between prion protein and peptide **1**, the binding region on the protein had to be identified. Therefore ¹H,¹⁵N-HSQC NMR experiments were performed using the ¹⁵N-labelled hPrP(90-230). By observing changes in chemical shifts of amide resonances obtained from spectra recorded in absence and in presence of peptide **1** two different putative binding regions were assigned. The first region is located at the end of helix-1 while the second region is located at helix-3 of the prion protein. In order to obtain independent data MALDI-TOF-MS H/D exchange experiments of protein fragments in presence and in absence of peptide **1** were carried out. Addition of peptide **1** led to a decrease of deuterium incorporation rate for fragments from helix-3. Therefore, NMR and MS data led to the conclusion that the binding region of peptide **1** is located at helix-3 of the prion protein.

For identification of the binding epitope of peptide **1** an alanine scan of protein sequences ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ (**1**) und ¹⁴⁹YYRENMHR¹⁵⁶ (**18**) were done and the resulting peptides were screened via SPR for their binding affinities. By comparison of these binding affinities a binding epitope could be established covering the whole sequence from peptide ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ excepted Pro158. STD NMR experiments with peptide ¹⁵³NAHRYPNQ¹⁶⁰ (**11**) gave a binding epitope at atomic resolution. The resulting binding epitope contains small contributions of Asn153 and Tyr157 and very strong STD effects for Arg156 and Glu160. Even for Pro158 strong STD effects were observed although substitution of this amino acid against alanine had no effect indicating that binding contributions of Pro158 can be compensated by the β-methylgroup of alanine.

Results obtained by molecular docking experiments using the combined data from binding region on the protein and binding epitope on the peptide are in good agreement with experimental data and can be used for further development of the lead structure peptide **1**.

The influences of individual amino acids on aggregation of the prion protein several shortened and elongated peptides as well as peptides from alanine scan were tested in an *in vitro* aggregation assay. Although no well defined correlation between binding affinity and protective potential were observable, His155 had a strong effect on inhibition of aggregation.

Elongation of the peptide sequence at C-terminal part of Gln160 or N-terminal of Asn153 had no positive effect on the inhibitory potential.

Circular Dichroism experiments revealed a stabilization of the PrP^C structure in presence of peptide **1** which did not occur in presence of peptides **18** and **19**. Stabilisation of PrP^C conformation was not observable in another assay using prion protein under denaturing condition. This can be explained by the assay conditions which also break down specific protein peptide interactions.

SPR experiments for chitobiose revealed a binding affinity to the prion protein of 3666 μ M. The binding region was identified using ¹H,¹⁵N-HSQC NMR experiments in a region of helix-1 and the beginning of helix-3. Although no specific binding epitope of chitobiose was observable by STD NMR experiments molecular docking experiments were accomplished.

To improve binding affinities of peptide **1** a combination of both binding epitopes of chitobiose and peptide **1** had been synthesized using a 16 Å linker between peptide and carbohydrate structure. Synthesis of this linker was carried out by coupling two monomers of 5-aminopentanoic acid to 1-aminochitobiose and final coupling to carboxylate in the side chain of aspartic acid. This building block was used in solid phase peptide synthesis of peptide **39** in which Pro158 was substituted against the asparagine-linked chitobiose building block and of peptide **40** in which Arg156 is substituted against this building block.

Binding affinities of these peptides were 87 μ M for peptide **39** and 52 μ M for peptide **40** as determined by SPR. While binding affinities of peptide **39** could not be improved peptide **40** has a 32 fold higher affinity relative to peptide **13** (¹⁵³NMHAYPNQ¹⁶⁰) in which Arg156 was substituted against alanine.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

6.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
CD-Spektroskopie	Jasco J-810	Jasco Corp.
ELISA-Platten	Mikrolon 96ft	Greiner bio-one
ELISA-Reader	Genios	Tecan
Fluoreszenzspektrometer	Cary Eclipse	Varian
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4,	Christ
HPLC	Biocad 700E Perfusion Merck/Hitachi LaChrom L-7000-Serie	BioCAD VWR International
MALDI-TOF-MS Hamburg	Biflex III	Bruker Daltonics
MALDI-TOF-MS Leipzig	Ultraflex III TOF-TOF	Bruker Daltonics
NanoDrop	ND-1000, Photometer	Peqlab
NMR 500 MHz	DRX500, $\nu_L(^1\text{H}) = 499.87$ MHz), inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf	Bruker Biospin
NMR 700 MHz	Avance 700, (16.35 Tesla, $\nu_L(^1\text{H}) = 700.13$ MHz), inverser 5 mm Tripelresonanz- <i>cryoprobe</i>	Bruker Biospin
NMR-Probenröhrchen	3 mm <i>match</i>	Hilgenberg
NMR-Probenröhrchen	5 mm Typ502, Typ507-HP7	Norell
Parellelsyntheseroboter	ACT MOS Ω 496	Advanced Chem Tech
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 M Ω	SGwater
RP-Säule (analytisch)	EC250/4 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule (präparativ)	VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
Sensorchip	CM5	Biacore
SpeedVac	Savant SC110	Thermo Electron
Software (allgemein)	Origin Pro 7.5, Adobe Illustrator CS2	OriginLab Adobe
Software (MS)	Xmass 4.1, flexControl 3.0, flexAnalysis 3.0	Bruker Daltonics
Software (NMR)	Topspin 1.3, Topspin 2.1	Bruker Biospin
Software (SPR)	BIA-Eval 3.0	Biacore
Spin-Tubes	SpinX tubes (0.22 μm Celluloseacetat)	CoStar
SPR	Biacore 3000	Biacore
SPR-Puffer	HBS-N	Biacore
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UV/VIS Spektrometer	UV/Vis Spektrometer	Shimadzu
Zentrifugalkonzentratoren	Amicon 2 mL, MWCO 10 kDa	Millipore
Zentrifugen	5084, 5417C, 5417R, Megafuge1.0R	Eppendorf, Heraeus

6.1.2 Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
Acros Organics	Acetonitril (HPLC-Grade) Tri- <i>iso</i> -propylsilan, Chitin
AppliChem	Harnstoff, Trypton
Biacore	NHS, EDC, Ethanolaminhydrochlorid, Na-Acetatpuffer (pH 4.0)
Bruker Daltonics	<i>peptide calibration standard II</i>
Cambridge-Isotope-Laboratories	¹⁵ N-Ammoniumchlorid (¹⁵ N, 99%)
Deutero	CDCl ₃ (99.8%), D ₂ O (99.9%), DMSO- <i>d</i> 6 (99.8%), Essigsäure- <i>d</i> 4 (99.9%), DCl (6M), NaOD (20%)
Fermentas	<i>PAGE-Ruler™ Ladder</i>
Fluka	MeOH (abs.), Gu-HCl
Hewlett Packard	<i>ES Tuning Mix</i>
IRIS Biotech	Di- <i>iso</i> -propylethylamin, DMF, Piperidin, RINK-Amid-Harz, PAL-PEG-PS-Harz Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, TBTU
Merck KG	Acetanhydrid, Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethanol, Ethylacetat, Hydrazinhydrat, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, 2-Propanol, Pyridin, Toluol, Trifluoressigsäure, Kupferspäne, Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, TRIS-HCl, SDS
Pierce	<i>Coomassie Protein Assay Reagent</i>
Sigma-Aldrich	2,5-Dihydroxybenzoesäure, <i>Vitamin Solution</i> MEM(100X), D-Biotin, Imidazol, Kaliumdihydrogenphosphat, red. Glutathion, Thrombin 50u (T-9549), Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumcitrat, Ammoniumsulfat

6.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Konzentration/Menge	Substanz
2YT-Medium (pH 7.5)	16 g/L 10 g/L 5 g/L 0.1% (v/v) 0.1% (v/v)	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid Ampicillin-Lösung Chloramphenicol-Lösung
¹⁵ N-Minimalmedium (pH 7.5)	6.8 g/L (48 mM) 3.0 g/L (22 mM) 3.0 g/L (17 mM) 1.0 g/L (18 mM) 10 mL/L 120 mg/L (1.0 mM) 100 mg/L (1.7 mM) 14.7 mg/L (0.1 mM) 1 mL/L 0.1% (v/v) 0.1% (v/v)	Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Glucose ¹⁵ N-Ammoniumchlorid MEM-Vitaminlösung Magnesiumsulfat Natriumchlorid Calciumchloriddihydrat Biotinlösung Ampicillin-Lösung Chloramphenicol-Lösung
Ampicillin-Lösung	100 mg/mL (286 mM)	Ampicillin
Bindungspuffer (pH 8.0)	10 mM 10 mM 100 mM	Tris reduziertes Glutathion Na ₂ HPO ₄
Biotinlösung	100 mg/L	Biotin
Calciumchloridlösung	100 mM	Calciumchlorid
Chloramphenicol-Lösung	30 mg/mL (93 mM)	Chloramphenicol
Elutionspuffer (pH 5.8)	500 mM 10 mM 100 mM	Imidazol Tris-HCl Na ₂ HPO ₄
Expressionsmedium	10 g/L 5 g/L 6.8 g/L (48 mM) 3 g/L (22 mM) 2 g/L (22 mM) 1 g/L (3.9 mM) 100 mg/L (1.7 mM) 2.7 mL (2 mM) 2.7 mL (0.2 mM) 2.7 mL 0.1% (v/v) 0.1% (v/v)	Trypton Hefeextrakt Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Ammoniumsulfat Natriumcitrat Natriumchlorid Magnesiumsulfatlösung Calciumchloridlösung Glucoselösung Ampicillin-Lösung Chloramphenicol-Lösung
Glucoselösung	50% (w/v)	Glucose
IPTG-Lösung	1 M	Isopropyl-β-thiogalactosid

Magnesiumsulfatlösung	1 M	Magnesiumsulfat
Natriumacetatpuffer (pH 5.0)	10 mM	Natriumacetat
Natriumacetatpuffer (pH 4.5)	5 mM	Natriumacetat
Natriumacetatpuffer- <i>d</i> 3 (pH 4.5)	5 mM	Essigsäure- <i>d</i> 4, NaOD
PAGE-Probenpuffer (2x, reduzierend, pH 6.5)	100 mM 200 mM 20% (v/v) 4% (w/v) 0.2% (w/v)	Tris-HCl DTT Glycerin SDS Bromphenolblau
PAGE-Sammelgelpuffer (4x, pH 6.8)	500 mM 0.4% (v/v)	Tris-HCl SDS
PAGE-Tankpuffer (5x, pH 6.8)	125 mM 960 mM 0.5% (v/v)	Tris-HCl Glycin SDS
PAGE-Trenngelpuffer (4x, pH 8.0)	1.5 M 0.4% (v/v)	Tris-HCl SDS
PBS-Puffer (D ₂ O, pH 7.4)	120 mM 10 mM 10 mM 6 mM	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Natriumazid
PBS-Puffer (H ₂ O, 10x, pH 6.8)	1.37 M 100 mM 17 mM 27 mM	Natriumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumchlorid
Puffer A (pH 8.0)	4 M 10 mM 10 mM 100 mM	GuHCl Tris reduziertes Glutathion Na ₂ HPO ₄
Puffer B (pH 8.0)	10 mM 100 mM	Tris Na ₂ HPO ₄
Puffer C (pH 8.0)	10 mM 50 mM 100 mM	Tris Imidazol Na ₂ HPO ₄
TRIS-Puffer	10 mM	Tris-HCl

6.2 Rekombinante Expression des Prionproteins

Die Proteinexpression und Reinigung erfolgte in Gentechniklaboren der Stufe S1 nach dem GenTG am Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. C. Betzel. Ein Teil der benutzten Puffer und Nährmedien wurde in einem Dampf-Autoklaven bei 120 °C und 5 bar Druck sterilisiert. Auf gleiche Weise wurden alle entstandenen Abfälle und Labormaterialien sterilisiert. Die Proteinkonzentration des exprimierten Proteins wurde mit einem NanoDrop Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm bestimmt.

6.2.1 Expression des Prionproteins

Für die Expression des humanen Prionproteins (90-230) wurden die kompetenten *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 DE3 pLysS mit 200 ng des Plasmids pRSET A-hsPrP90-230 durch Elektroporation transformiert (Pulsstärke 1.8 kV). Die transformierten Zellen wurden in 900 μ L 2YT-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurde 100 μ L auf Agarplatten ausgebracht, die mit Chloramphenicol (30 μ g/ml) und Ampicillin (100 μ g/ml) versehen waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie dieser Platten wurde zur Kultivierung in 3 mL 2YT-Medium aufgenommen und für acht Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 200 mL 2YT-Medium beimpft und für weitere acht Stunden 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Für den Expressionsansatz wurden 900 mL des Expressionsmediums mit 100 mL einer Vorkultur beimpft und die Lösung bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Alle zwei Stunden wurden 20 mL Glucoselösung zugegeben. Ab einer OD_{600} von 1.5 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 400 μ L IPTG-Lösung induziert. Nach dreistündiger Expression wurde die Zellkultur für 3 Minuten bei 15500 g zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde für den Zellaufschluss für eine Stunde bei 37 °C mit Lysozym inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 10x für je 30 s bei 12000 *microns* sonifiziert, für 30 Minuten bei 15500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 50 mL Bindungspuffer/Puffer A (4:1) aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluss wurde für 15 Minuten bei 15500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 40 mL Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde zweimal für je 15 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend für 15 Minuten bei 15500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 mL Ni-NTA-Matrix für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführung in einen Säulenkörper wurde das an die Matrix gebundene Protein mit 50 mL Puffer A gewaschen und im Anschluss über einen Puffergradienten (A/B) über 400 mL mit einer Flussrate von 0.4 mL/ einem Pufferaustausch

unterzogen. Die Matrix wurde daraufhin mit 50 mL Puffer C gewaschen, hierauf das Protein mit 100 mL Elutionspuffer von der Matrix eluiert und das Eluat in 10 mL Fraktionen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch eine SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt und Reinheit analysiert. Die vereinigten Proteinfractionen wurden für drei Stunden gegen Tris-Puffer (pH 8.0) dialysiert. Anschließend wurde der vorhandene Histidin-Überhang spezifisch durch Zugabe von 1 μ L Thrombinlösung pro 1 mL Proteinlösung proteolytisch abgetrennt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde zur Entfernung der Protease eine Spatelspitze des an Celite gebundenen Thrombin-Inhibitors Benzamidin hinzugegeben und weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Suspension wurde für 15 Minuten bei 15500 g zentrifugiert, der Überstand gegen Natriumacetatpuffer (5 mM, pH 5.0) dialysiert und die erhaltene Proteinlösung auf eine Konzentration von 3 mg/mL aufkonzentriert. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 20-25 mg des hPrP(90-230) pro Liter Nährmedium. Die Lagerung des Prionproteins erfolgte nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C.

6.2.2 Expression des ^{15}N -markierten Prionproteins

Die kompetenten *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 DE3 pLysS wurden durch Elektropulstransformation mit 200 ng des Plasmids pRSET A-hsPrP90-230 transformiert und in 900 μ L 2YT-Medium aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und 220 rpm wurden die Zellen auf Chloramphenicol (30 μ g/mL)-Ampicillin (100 μ g/mL)-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus den so selektierten Klonen wurde ein Klon entnommen, in 3 mL 2YT-Medium aufgenommen und für acht Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 200 mL Minimalmedium aufgenommen und für acht Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Für die Expression des ^{15}N -markierten Prionproteins wurden je 100 mL dieser Vorkultur in 900 mL Minimalmedium aufgenommen und für 7 Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert, wobei alle zwei Stunden 25 mL Glucoselösung zugegeben wurden. Bei einer OD_{600} von 0.85 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 400 μ L IPTG-Lösung induziert. Nach sieben Stunden wurde die Zelllösung 3 Minuten bei 15500 g zentrifugiert. Die Reinigung erfolgte analog zu der Beschreibung in Kapitel 6.2.1. Die Ausbeute an ^{15}N -hPrP(90-230) betrug 5 mg/L Nährmedium.

6.3 NMR-Experimente

6.3.1 ^1H , ^{15}N -HSQC-chemical shift mapping Experimente

6.3.1.1 ^1H , ^{15}N -HSQC-chemical shift mapping Experimente mit Peptid 1

Für die ^1H , ^{15}N -HSQC-Experimente wurde das ^{15}N -hPrP(90-230) in einer Konzentration von 400-500 μM in 5 mM Natriumacetatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 4.5) eingesetzt. Die Proteinlösung wurde halbiert und eine Hälfte wurde mit Peptid 1 ($^{153}\text{NMHRYPNQ}^{160}$), gelöst in 5 mM Natriumacetatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, pH 4.5) versetzt, so dass die Peptidkonzentration einem siebenfachen Überschuss über Protein entsprach. Die Rezeptorbelegung betrug in diesem Fall 95%. Beide Proben wurden unter identischen Bedingungen vermessen.

Die Messungen erfolgten in einem 3 mm Probenröhrchen an einem *Avance* 700 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 285 K, 293 K und 305 K unter Verwendung des Pulsprogramms *hsqcetf3gp*. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand der von Zahn *et al.* veröffentlichten Daten.^{65;206}

Die chemische Verschiebung der Signale der ligandhaltigen Probe und der reinen Proteinprobe wurden verglichen und die Änderung der mittleren chemischen Verschiebung nach Gleichung 15 berechnet.

$$\Delta\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) [\text{ppm}] = \Delta\delta(^1\text{H}) [\text{ppm}] + 0.2 * (\Delta\delta(^{15}\text{N}) [\text{ppm}])$$

Gleichung 15: Berechnung der gemittelten Veränderung der chemischen Verschiebung der NH-Resonanzsignale. Mit $\Delta\delta$ = Veränderung der chemischen Verschiebung.

6.3.1.1 ^1H , ^{15}N -HSQC-chemical shift mapping Experimente mit Chitobiose

Das ^{15}N -hPrP(90-230) wurde in einer Konzentration von 278 μM in 5 mM Natriumacetatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 4.5) eingesetzt. Die Konzentration der Chitobiose betrug 33.3 mM, so dass eine Rezeptorbelegung von 90% erreicht wurde. Die Experimente wurden unter Verwendung des Pulsprogramms *hsqcetf3gp* mit 128 *scans* und 256 Inkrementen in F1 bei einer Temperatur von 293 K aufgenommen. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand der von Zahn *et al.* veröffentlichten Daten.^{65;206}

Die chemische Verschiebung der Signale der ligandhaltigen Probe und der reinen Proteinprobe wurden verglichen und die Änderung der mittleren chemischen Verschiebung nach Gleichung 15 berechnet.

6.3.2 STD NMR-Experimente

6.3.2.1 Proteinpräparation hPrP(90-230) für STD NMR-Experimente

Für die Präparation des Proteinkonstrukts hPrP(90-230) wurde zunächst die Filter-Zentrifugationseinheit (AmiconTM, MWCO 10 kDa) bei 2100 g mehrfach mit ddH₂O gespült, um Glycerolreste aus der Filtrationsmembran zu entfernen. Im Anschluss erfolgte der Austausch des Natriumacetatpuffers (5 mM, pH 5.0) durch mehrfaches Dialysieren bei gleichzeitiger Konzentration des Proteins. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration photometrisch bei $\lambda = 280$ nm bestimmt. Die Proteinlösung wurde auf die gewünschte Proteinkonzentration mit einem Probenvolumen von 190 μ L verdünnt und in ein 3 mm NMR-Röhrchen überführt.

6.3.2.2 Proteinpräparation hPrP(121-230)-His-Tag für STD NMR-Experimente

Das hPrP(121-230)-His-Tag wurde in einem Dialyse-Cap (MWCO 3 kDa) zweimal bei einer Temperatur von 4 °C über einen Zeitraum von jeweils zwölf Stunden gegen D₂O-PBS-Puffer (pH 7.4) dialysiert. Das Dialyse-Cap wurde zuvor für 5 Tage in ddH₂O gelagert, um das membranstabilisierende Glycerol zu entfernen.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei $\lambda = 280$ nm bestimmt und auf die gewünschte Konzentration mit einem Probenvolumen von 190 μ L verdünnt. Die Messungen erfolgten in einem 3 mm NMR-Röhrchen.

6.3.2.3 Bestimmung der Proteinsättigung

Die Bestimmung der Proteinsättigung erfolgte mit dem Pulsprogramm *std19sp2d_4.bc*, das keinen $T_{1\rho}$ -Filter aufweist, so dass die Proteinsignale nicht unterdrückt werden. Die Proteinkonzentration der Probe war 74 μ M in Natriumacetat-*d3* Puffer (pH 4.7). Die Spektren wurden mit 2 k *scans* aufgenommen und die Sättigungsleistung wurde zwischen 39 dB und 33 dB variiert. Die Parameter der Messungen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Parameter zur Bestimmung der Proteinsättigung.

Einstrahlpunkt [Hz]	Sättigungsleistung [dB]	Proteinsättigung [%]
-1400	39	4.7
-1050	39	6.0
-700	39	13.0
-350	39	22.0
-1400	33	12.0
-1050	33	14.7
-700	33	18.9
-350	33	27.0

6.3.2.4 STD NMR-Experimente mit den Peptiden 13, 14, 16 und 17

Die STD NMR-Experimente mit den Peptiden **13**, **14**, **16**, und **17** wurde mit dem Proteinkonstrukt hPrP(90-230) durchgeführt. Die Probenpräparation wurde wie in Kapitel 6.3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Messungen wurden in 3 mm NMR-Röhrchen auf einem *Avance* 700 MHz Spektrometer unter Verwendung des Pulsprogramms *std.t4_3.bc* aufgenommen. Die Proteinkonzentration des (hPrP 90-230) betrug jeweils 4.8 μM und die Peptide wurden in einem 50fachen Überschuss zugegeben, was einer Peptidkonzentration von 240 μM entspricht. Die Messungen wurden zum Teil bei einer Temperatur von 285 K und zum Teil bei einer Temperatur von 310 K durchgeführt. Der Sättigungspulsdauer betrug in allen Experimenten 2 s und die Frequenzen des Sättigungspulses wurden für das Peptid **17** zwischen -1400 Hz und -700 Hz variiert. Die Parameter der einzelnen Messungen sind in Tabelle 13 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der STD NMR-Experimente mit den Peptiden **13**, **14**, **16**, und **17**.

Peptid	Temperatur [K]	<i>on-res</i> [Hz]
13	285	-1400
14	285	-1400
16	285	-1400
17	285	-1400
17	285	-1050
17	285	-700
17	310	-1400
17	310	-1050
17	310	-700

6.3.2.5 STD NMR-Experimente mit dem Peptid 11

Die STD NMR-Experimente mit dem Peptid **11** wurden sowohl mit dem hPrP(90-230) als auch mit dem hPrP(121-230)-*His-Tag* durchgeführt.

Die Proteinproben wurden wie in Kapitel 6.3.2.1 beschrieben vorbereitet. Die Proteinkonzentration des hPrP(90-230) betrug 58 μM und die Konzentration des Peptids **11** wurde auf 290 μM eingestellt. Dies entspricht einem fünffachen Überschuss über Protein. Die Messungen wurden ebenfalls in 3 mm NMR-Röhrchen auf einem *Avance* 700 MHz Spektrometer unter Verwendung des Pulsprogramms *std.t4_3.bc* bei einer Temperatur von 310 K aufgenommen. Die Dauer des Sättigungspulses betrug 4 s bei einer Sättigungsleistung von 33 dB. Die Einstrahlfrequenz des Sättigungspulses betrug -1050 Hz. Für die STD NMR-Experimente mit dem hPrP(121-230)-*His-Tag* wurden die Proteinproben wie in Kapitel 6.3.2.2 beschrieben vorbereitet. Die Konzentration des Proteins betrug 4.6 μM und die

Konzentration des Peptids wurde durch eine gestaffelte Zugabe der Peptidstammlösung (15 mM in D₂O-PBS Puffer (pH 7.4)) zwischen 125-659 μ M variiert. Die Vermischung der Proteinprobe mit dem zugegebenen Peptid wurde durch mehrmaliges Invertieren des Röhrchen erreicht. Die Anzahl der *scans* betrug für die Probe mit einer Konzentration von 125 μ M des Peptids **11** 10k, für die weiteren Ligandkonzentrationen wurden 4k *scans* aufgenommen.

Die STD-Prozente, die für die Protonen des Peptids **11** bei den unterschiedlichen Konzentrationen erhalten wurden, sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Diese sind jedoch nicht um die Artefakte (Kapitel 6.2.3.6) bereinigt.

Tabelle 14: Aufführung der STD Prozente des Peptids **11** bei den verschiedenen vermessenen Ligandkonzentrationen.

Überschuss Ligand	28	41	75	99	150
Konzentration [μ M]	125.3	187.1	336.5	441.4	658.5
Tyr157- ϵ	0.79	0.81	0.72	0.66	0.87
Tyr157- δ	2.47	1.68	1.27	1.41	1.43
Pro158- δ	1.16	0.72	0.63	0.62	0.62
Pro158- δ	1.28	0.47	0.53	1.00	0.41
Arg156- δ / Tyr157- β	1.05	0.83	0.77	0.80	0.70
His155- β	1.64	1.39	1.13	0.95	0.86
Asn153- β	1.29	1.06	0.91	0.96	0.76
Asn159- β	2.16	1.82	0.98	1.09	0.73
Pro158- β / Gln160- γ	2.43	1.58	1.28	0.92	0.83
Gln160- β'	3.66	3.18	2.00	1.61	1.01
Gln160- β	3.68	2.63	1.77	1.64	1.42
Arg156- β	5.28	3.73	2.44	2.27	1.65
Arg156- γ	3.80	3.21	2.24	1.97	1.57
Ala- β	2.89	2.13	1.54	1.51	1.18

6.3.2.6 Ligandblindproben mit dem Peptid **11**

Die Messungen der Ligandblindprobe des Peptids **11**, wurden zur Bestimmung der Artefaktprozente unter identischen Bedingungen durchgeführt, wie die STD NMR-Experimente. Es wurden zwei Ligandkonzentrationen mit 337 μ M und 659 μ M in D₂O-PBS Puffer (pH 7.4) mit jeweils 4k *scans* vermessen. Die erhaltenen Artefaktprozente sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Aufführung der Artefakt-Prozente des Peptids **11** bei 336.5 μM und 685.5 μM Peptid **11** in D_2O -PBS Puffer (pH 7.4).

Konzentration [μM]	337	659
Tyr157- ϵ	0.71	0.872
Tyr157- δ	0.96	1.433
Pro158- δ	0.45	0.620
Pro158- δ	0.19	0.406
Arg156- δ / Tyr157- β	0.72	0.699
His155- β	1.10	0.860
Asn153- β	1.02	0.759
Asn159- β	1.12	0.731
Pro158- β / Gln160- γ	1.75	0.831
Gln160- β'	3.45	1.013
Gln160- β	2.38	1.423
Arg156- β	2.96	1.648
Arg156- γ	2.19	1.574
Ala- β	1.88	1.176

6.3.2.9 STD NMR-Experimente mit Chitobiose (**29**)

Die STD NMR-Experimente mit Chitobiose (**29**) wurden mit dem Proteinkonstrukt hPrP(121-230)-*His-Tag* in 3 mm NMR-Röhrchen auf einem *Avance* 700 MHz Spektrometer unter Verwendung des Pulsprogramms *std.t4_3.bc* aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 310 K, die Sättigungsleistung 33 dB bei einer Einstrahlfrequenz des Sättigungspulses von -1050 Hz und einer Sättigungszeit von 4.5 s. Die Proteinkonzentration betrug 9.9 μM , zu der ein 75facher Überschuss an Chitobiose zugegeben wurde, so dass die Endkonzentration des Liganden 718.8 μM war. Die Ligandblindprobe der Chitobiose (**29**) wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Die STD-Prozente und die Artefakte sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung der STD-Prozente und Artefakte, die für die Chitobiose erhalten wurden.

Signal [ppm]	STD-Effekt [%]	Artefakte [%]
2.07	0.40	0.30
2.10	0.30	0.30

6.4 MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente

Die MALDI-TOF-MS H/D Austauschexperimente wurden in Kooperation mit Dr. L. Redecke und PD Dr. M. v. Bergen am Institut für Proteomics des Umweltforschungszentrums (UFZ) Leipzig durchgeführt. Die Experimente erfolgten an einem Ultraflex III TOF-TOF der

Firma Bruker Daltonics, das unter Verwendung des *peptide calibration standard II* (Bruker Daltonics) kalibriert wurde. Die Messungen erfolgten im Positiv-Ionen Modus mit 2000 Laserpulsen pro Messpunkt über einen Massenbereich von 700-5000 m/z.

Für die Probenpräparation der ligandfreien Zeitreihe wurden 1 µL des hPrP(90-230) ($c = 249 \mu\text{M}$) in 19 µL D₂O verdünnt, so dass die Deuteriumkonzentration 95% und die Proteinkonzentration 0.2 µg/µL (12.4 µM) betrug. Die Probe wurde bei 30 °C inkubiert und nach 10, 20, 30 und 60 Minuten wurde ein 2 µL Aliquot abgenommen, das sofort auf 0 °C abgekühlt und durch Zugabe von 2 µl TFA/Wasser ($c = 0.05\%$ (v/v)) auf pH 2.5 angesäuert wurde. Nach Zugabe von 10 µl Pepsin-Matrix in 0.05% (v/v) TFA/Wasser und Inkubation für 4 Minuten bei 0 °C wurde die Probe 1 Minuten bei 0 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 1 µL abgenommen, mit 1.5 µL der MALDI-Matrix vermischt und auf dem Probenträger aufgebracht. Das Lösungsmittel wurde an einer *Speedvac* im Vakuum entfernt und die Probe unmittelbar darauf vermessen.

Für die Probenpräparation der Zeitreihe mit zusätzlichem Peptid **1** wurde 1 µL des hPrP(90-230) ($c = 249 \mu\text{M}$) in 17.26 µL D₂O verdünnt und mit 1.74 µL Peptid **1** ($c = 1\text{mM}$) versetzt. Die Probe wurde bei 30 °C inkubiert und nach 10, 20, 30 und 60 Minuten wurden 2 µL abgenommen. Diese wurden sofort auf 0 °C gekühlt und durch Zugabe von 2 µL TFA/Wasser ($c = 0.05\%$ (v/v)) auf pH 2.5 angesäuert. Nach Zugabe von 10 µL Pepsinmatrix wurde weitere 4 Minuten inkubiert und darauf folgend 1 Minuten bei 0 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 1 µL abgenommen, mit 1.5 µL MALDI-Matrix gemischt und das Lösungsmittel in einer *Speedvac* im Vakuum entfernt. Die Probe wurde im direkten Anschluss vermessen.

Für die Berechnung der Einbaurrate des Deuteriums wurde über eine Software unter zu Hilfenahme von Gleichung 16 ein Fit der kleinsten Abweichung bestimmt.^{188;189}

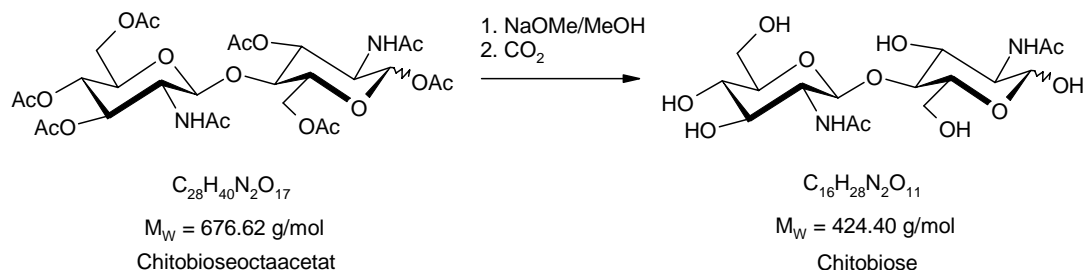
$$y = \left[\sum_{i=1}^n \left[\text{Masse}_i (\text{theoretisch}_i - \text{gemessene}_i)^2 \right] \right] / \left[N \sum_{i=1}^n (\text{Masse}_i) \right]$$

Gleichung 16: Berechnung des Fits für den Vergleich von gemessener und theoretischer Massenverteilung. y = Güte des Fits, i = jedes Ion und N = Anzahl der verglichenen Punkte.¹⁸⁹

6.5 Synthese des Chitobiosylasparaginbausteins

6.5.1 Deacetylierung von Chitobioseoctaacetat²⁰²

Reaktionsgleichung:

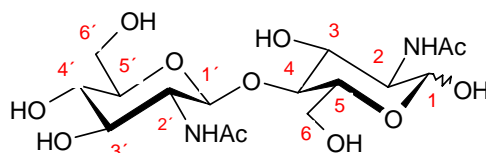


Durchführung:

Nach literaturbekannter Vorschrift²⁰² wurden 1.50 g (2.22 mmol) Chitobioseoctaacetat (**30**) zu 803 mg (1.89 mmol) Chitobiose (**29**) umgesetzt. Diese wurde als farbloser Feststoff in einem α/β Gemisch von 4:1 erhalten. Diese Ausbeute beträgt 85% bezogen auf Chitobioseoctaacetat.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt:	161 °C (Zers.)
DC (Methanol/Chloroform 1/1 v/v):	$R_f = 0.20$
MALDI-TOF-MS (m/z):	424.2 [M+H], 446.2 [M+Na]



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 300 K), δ [ppm]

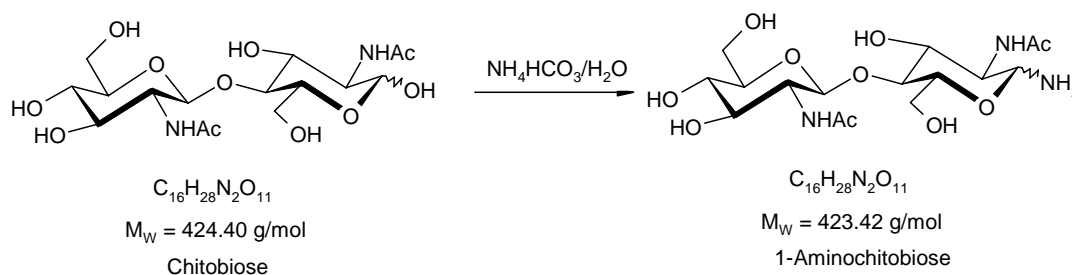
5.10 (*d*, 1H, $^3J_{1,2} = 3.3 \text{ Hz}$, **H1 β**), 4.88 (*d*, 1H, $^3J_{1',2'} = 2.5 \text{ Hz}$, **H1'**), 4.32 (*d*, 1H, $^3J_{1,2} = 8.3 \text{ Hz}$, **H1 α**), 3.93 (*d*, 1H, $^2J_{6a,6b} = 12.2 \text{ Hz}$, **H6b**), 3.91-3.92 (*m*, 1H, **H6'b**), 3.75-3.77 (*m*, 1H, **H2**), 3.76 (*d*, 1H, $^2J_{6a,6b} = 12.2 \text{ Hz}$, **H6a**), 3.75-3.73 (*m*, 2H, H2', **H6a'**), 3.62-3.40 (*m*, 6H, **H3**, **H3'**, **H4**, **H4'**, **H5**, **H5'**), 2.13 (*s*, 3H, NHCOCH₃), 2.09 (*s*, 3H, NHCOCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O), δ [ppm]

175.0 (*q*, NHCOCH₃) 174.8 (*q*, NHCOCH₃) 101.8 (*t*, **C-1 α**), 95.2 (*t*, **C-1'**), 90.8 (*t*, **C-1 β**), 79.7 (*t*, **C-5'**), 76.3 (*t*, **C-5**), 73.8 (*t*, **C-4'**), 70.3 (*t*, **C-3'**), 69.7 (*t*, **C-4**), 60.9 (*s*, **C-6'**), 60.6 (*s*, **C-6 α**), 60.4 (*s*, **C-6 β**) 55.9 (*t*, **C-3**), 22.6 (*p*, NHCOCH₃), 22.3 (*p*, NHCOCH₃).

6.5.2 Darstellung von 1-Aminochitobiose (31)²⁰³

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

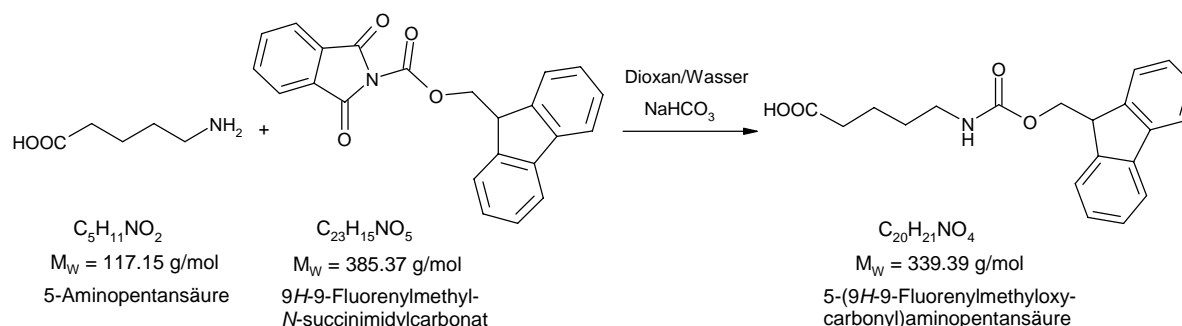
Nach literaturbekannter Vorschrift²⁰³ wurden 803 mg (1.89 mmol) von **29** zu 500 mg (1.18 mmol) 1-Aminochitobiose (**31**) als bräunlicher Feststoff umgesetzt und als Rohprodukt für die weiteren Synthesen verwandt.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt: 222 °C (Zers.)
 DC (Methanol/Chloroform 1/1 v/v): $R_f = 0.25$
 MALDI-TOF-MS (m/z): 423.2 [M+H], 445.2 [M+Na]

6.5.3 Darstellung von 5-(9H-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopentansäure (32)²⁰⁴

Reaktionsgleichung:

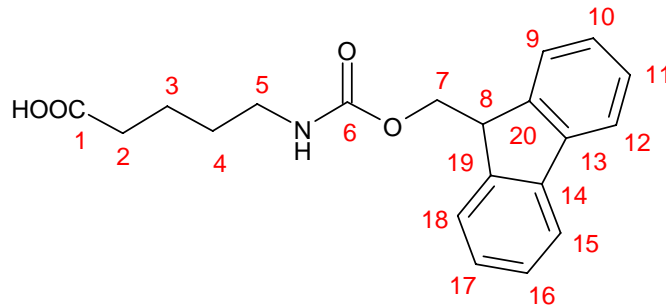


Durchführung:

Nach literaturbekannter Vorschrift²⁰⁴ wurden 1.00 g (8.54 mmol) 5-Aminopentansäure mit 4.32 g (12.8 mmol) 9H-9-Fluorenylmethyl-N-succinimidylcarbonat zu 2.53 g (7.45 mmol) 5-(9H-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopentansäure (**32**) als farbloser Feststoff umgesetzt. Dies entspricht einer Ausbeute von 87% bezogen auf 5-Aminopentansäure.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt: 127.5-129.5 °C

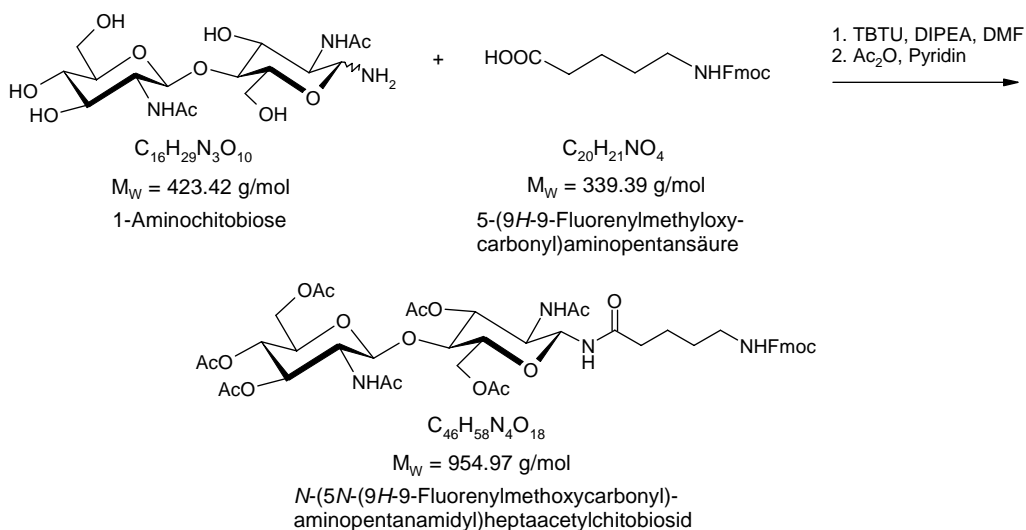
DC (Chloroform / Methanol 7/3 v/v): $R_f = 0.58$ EI-MS (m/z): 339 (M^+), 165 (95, Fluoren), 178 (100, Methylenefluoren), 55 (13, $(CH_2)_4CO_2H$), 44 (11, CO_2). 1H -NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 300K), δ [ppm]

7.89-7.87 (*m*, 2H, **H-12**, **H-15**), 7.69-7.68 (*m*, 2H, **H-9**, **H-18**), 7.43-7.39 (*m*, 2H, **H-10**, **H-17**), 7.36-7.31 (*m*, 2H, **H-11**, **H-16**), 4.29 (*d*, $^3J_{7,8} = 7.0$ Hz, 2H, **H-7**), 4.20 (*t*, $^3J_{8,7} = 7.0$ Hz, 2H, **H-8**), 2.98-2.96 (*m*, 2H, **H-5**), 2.19 (*t*, $^3J_{2,3} = 7.1$ Hz, 2H, **H-2**), 1.49-1.37 (*m*, 4H, **H-3**, **H-4**).

 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 300K), δ [ppm]

142.6 (*q*, **C-1**), 139.4 (*q*, **C-19**, **C-20**), 137.4 (*q*, **C-13**, **C-14**), 128.9 (*t*, **C-12**, **C-16**), 127.3 (*t*, **C-9**, **C-18**), 121.4 (*t*, **C-10**, **C-17**), 120.04 (*t*, **C-11**, **C-16**), 109.8 (*s*, **C-7**), 33.9 (*s*, **C-2**), 29.2 (*s*, **C-5**), 22.1 (*s*, **C-4/C-3**), 20.7 (*s*, **C-4/C-3**).

6.5.4 Darstellung von *N*-(5*N*-(9*H*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (33)

Reaktionsgleichung:

Durchführung:

500 mg (1.18 mmol) 1-Aminochitobiose (**31**) wurden unter Schutzgas in 17 mL absolutem DMF gelöst und auf eine Temperatur von -20 °C gekühlt. 455 mg (1.42 mmol) TBTU wurden bei Raumtemperatur in 4 mL DMF gelöst und 232 µL DIPEA (184 mg, 1.42 mmol) hinzugegeben. Diese gelbe, klare Lösung wurde zu 380 mg (1.12 mmol) **32**, gelöst in 6 mL DMF, gegeben und nach 5 Minuten tropfenweise in den Kolben mit der Lösung von **31** überführt. Die Reaktionslösung wurde für drei Stunden bei -20 °C bis Raumtemperatur gerührt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wurde ein Teil des Lösungsmittels im Vakuum entfernt, ein Gemisch aus 30 mL Pyridin und 20 mL Essigsäureanhydrid hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Essigsäureanhydrid, Pyridin und DMF wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol coevaporiert. Anschließend wurde der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 424 mg (580 µmol) *N*-(5*N*-(9*H*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (**33**) als farbloser Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 49% bezogen auf **32**.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt:	215.2 °C (Zers.)
DC (Chloroform / Methanol 9/1 v/v):	R _f = 0.45
MALDI-TOF-MS (m/z):	955.2 [M+H], 977.2 [M+Na]
[α] _D ²⁵ :	+10.7° (c 0.3, DMF)

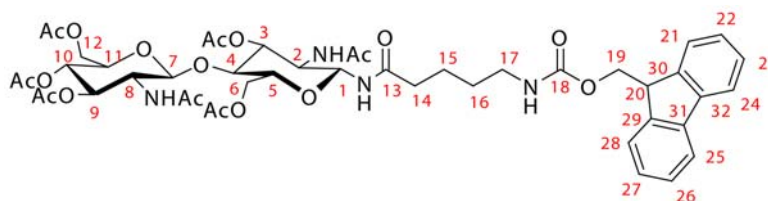
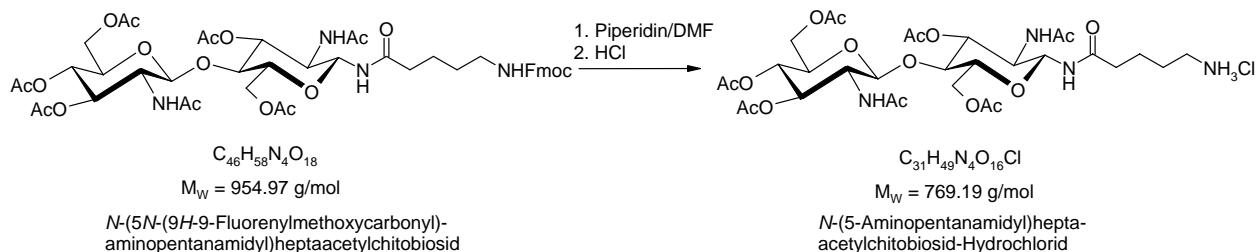


Tabelle 17: Zusammenfassung der ^1H -NMR-Daten (400 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) und ^{13}C NMR-Daten (100 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) von Verbindung **33**.

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3J_{\text{H,H}}$ [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
GlcNHAc	NH-1	8.341	<i>d</i>	9.4	1	-	-
	1	5.057	<i>dd</i>	9.7, 9.7	1	77.9	<i>t</i>
	NH-2	7.886	<i>d</i>	9.5	1	-	-
	2	3.835-3.762	<i>d</i>	-	2 (mit H-11)	52.9	<i>t</i>
	3	4.960	<i>dd</i>	9.7, 9.7	1	74.5	<i>t</i>
	4	3.692	<i>dd</i>	9.5, 9.5	1	76.1	<i>t</i>
	5	3.578-3.516	<i>m</i>	-	2 (mit H-8)	73.9	<i>t</i>
	6a	4.314-4.584	<i>m</i>	-	4 (mit H-19a,b, H-12a)	62.0	<i>s</i>
6b	3.978	<i>dd</i>	12.2, 5.5	1			
GlcNHAc'	NH-8	7.983	<i>d</i>	9.0	1	-	-
	7	4.676	<i>d</i>	8.8	1	100.2	<i>t</i>
	8	3.578-3.516	<i>m</i>		2 (mit H-5)	54.2	<i>t</i>
	9	5.141	<i>dd</i>	10.0, 10.0	1	72.6	<i>t</i>
	10	4.819	<i>dd</i>	9.7, 9.7	1	68.7	<i>t</i>
	11	3.835-3.762	<i>m</i>		2 (mit H-2)	70.9	<i>t</i>
	12a	4.314-4.584	<i>m</i>		4 (mit H-19a,b; H-6a)	63.1	<i>s</i>
	12b	3.906	<i>dd</i>	12.0, 2.0	1		
Amino-pentansäure	NH	7.241	<i>t</i>	5.6	1	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
	14	2.123-2.061	<i>m</i>	-	2	35.4	<i>s</i>
	15	1.449-1.405	<i>m</i>	-	2	22.6	<i>s</i>
	16	1.363-1.317	<i>m</i>	-	2	29.3	<i>s</i>
	17	2.965-2.927	<i>m</i>	-	2	40.3	<i>s</i>
Fmoc	18	-	-	-	-	156.1	<i>q</i>
	19	4.314-4.584	<i>m</i>		4 (mit H-6a, H-12a)	65.6	<i>s</i>
	20	4.202	<i>t</i>	6.7	1	47.1	<i>t</i>
	21, 28	7.692-7.677	<i>m</i>	-	2	125.4	<i>t</i>
	22, 27	7.432-7.406	<i>m</i>	-	2	127.8	<i>t</i>
	23, 26	7.347-7.318	<i>m</i>	-	2	127.4	<i>t</i>
	24, 25	7.902-7.885	<i>m</i>	-	2	120.3	<i>t</i>
Acetyl	2.040, 2.019, 1.959, 1.951, 1.907, 1.753, 1.705 (<i>s</i> , 7x 3H, CH ₃)					170.0 (<i>q</i>), 169 (<i>q</i>) CO-Ac	

6.5.5 Darstellung von *N*-(5-Aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid (**34**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

207 mg (217 μmol) **33** wurden in 36 mL DMF gelöst und auf $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Dann wurden langsam 4.0 mL einer 20%igen (*v/v*) Lösung von Piperidin (688 mg, 8.00 mmol) in DMF zu der Reaktionslösung getropft und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vier Stunden wurde die Reaktionslösung mit 660 μL 37%iger Salzsäure bei einer Temperatur von $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ auf pH 2.5-3 eingestellt, wobei ein farbloser Niederschlag aus der klaren Lösung ausfiel. Die Suspension wurde auf die Hälfte des Volumens eingeeengt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und mittels *RP*-HPLC gereinigt.

Reinigung per HPLC (präparative Pyramid C_{18} *reversed phase* Säule, Flussrate 20 mL, System: A: 95% Wasser, 5% MeCN, 0.1% TFA, B: 95% MeCN, 5% Wasser, 0.1% TFA.

0-6.5 min	100-90% A	0-10% B
6.5-19.8 min	90-65% A	10-35% B
19.8-22.7 min	65-0% A	35-100% B
22.7-31.4 min	0% A	100% B
31.4-33.6 min	0-100% A	100-0% B

Es wurden 91.7 mg (120 μmol) *N*-(5-Aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid (**34**) als farbloser Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 57% bezogen auf **33**.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt:	219 °C (Zers.)
DC (Chloroform / Methanol 7/3 v/v):	R _f = 0.03
MALDI-TOF-MS (m/z):	733.1 [M+H], 755.2 [M+Na]
[α] _D ²⁵ :	-6.9° (c 0.25, H ₂ O)
RP-HPLC:	R _t = 15 min

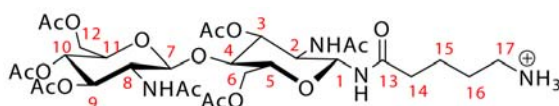
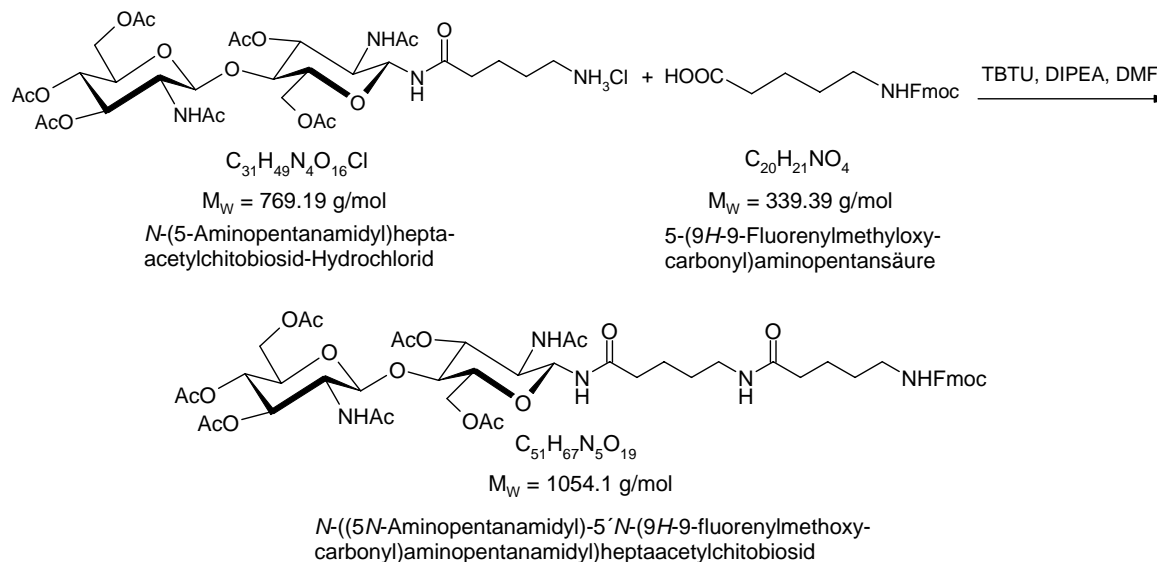


Tabelle 18: Zusammenfassung der ¹H-NMR-Daten (500 MHz, D₂O, 300 K) und ¹³C NMR-Daten (125 MHz, D₂O, 300 K) von Verbindung **34**.

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ¹ H	Multiplizität	³ J _{H,H} [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ¹³ C	Phase
GlcNHAc	1	5.125	dd	10.1, 9.0	1	74.3	t
	2	3.995-3.940	m	-	3 (mit H-5, H-6b)	76.3	t
	3	5.225-5.163	m	-	2 (mit H-9)	78.0	t
	4	3.843	ddd	10.0, 5.4, 1.9	1	74.3	t
	5	3.995-3.940	m	-	3 (mit H-2, H-6b)	52.8	t
	6a	4.034	dd	12.7, 1.9	1	63.0	s
	6b	3.995-3.940	m	-	3 (mit H-2, H-5)		
GlcNHAc'	7	4.763	d	8.5	1	100.9	t
	8	3.782	dd	10.5, 8.5	1	54.6	t
	9	5.225-5.163	m	-	2 (mit H-3)	72.9	t
	10	4.966	dd	9.7, 9.7	1	68.7	t
	11	3.928-3.897	m	-	1	71.3	t
	12a	4.442	dd	12.2, 1.9	1	62.2	s
	12b	4.394	dd	12.7, 3.5	1		
Aminopentansäure	13	-	-	-	-	177.2	q
	14	2.268-2.240	m	-	2	35.2	s
	15	1.600-1.588	m	-	4	26.5	s
	16					22.2	s
	17	2.946-2.917	m	-	2	39.4	s
Acetyl	2.077 (s, 3H), 2.067 (s, 3H), 2.057 (s, 3H), 2.066 (s, 3H), 1.982 (s, 3H), 1.901 (s, 3H), 1.873 (s, 3H), 7 x CH ₃					175.0 (q), 174.1 (q), 174.0 (q), 173.2 (q), CO (Ac), 20.8 (p), 20.6 (p), 20.5 (p), 20.4 (p), 20.3 (p), CH ₃	

6.5.6 Darstellung von *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'*N*-(9*H*-9-Fluorenyl-methoxycarbonyl)aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (**35**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Es wurden 91.7 mg (120 μmol) **34** unter Schutzgas in 1.50 mL DMF gelöst und auf -30°C gekühlt. 75.9 mg (237 μmol) TBTU wurden bei Raumtemperatur in 500 μL DMF gelöst und 54.2 μL DIPEA (42.8 mg, 348 μmol) hinzugegeben. Diese gelbe, klare Lösung wurde zu 22.2 mg (189 μmol) 5-Fmoc-Aminopentansäure (**32**), gelöst in 500 μL DMF, gegeben und nach 5 Minuten tropfenweise zu der Lösung des Amins gegeben. Die Reaktionslösung wurde 13 Stunden bei -30°C bis $+6^\circ\text{C}$ gerührt, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert.

Es wurden 85.0 mg (80.6 μmol) an *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'*N*-(9*H*-9-Fluorenyl-methoxycarbonyl)aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (**35**) erhalten, was einer Ausbeute von 67%, bezogen auf **34** entspricht.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt:	205 $^\circ\text{C}$ (Zers.)
DC (Chloroform / Methanol 7/3 v/v):	$R_f = 0.72$
MALDI-TOF-MS (m/z):	1077.9 [M+Na]
$[\alpha]_D^{25}$:	+4.0 $^\circ$ (c 0.25, DMF)

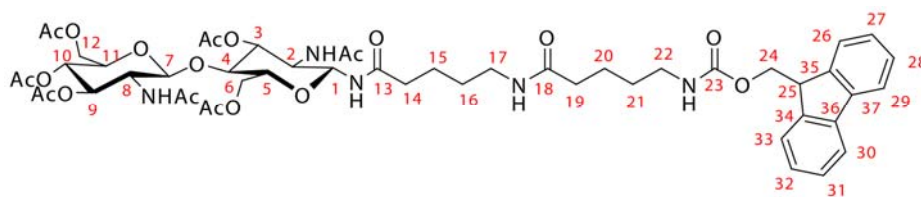


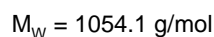
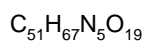
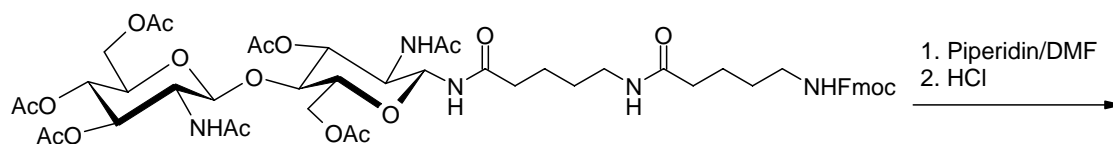
Tabelle 19: Zusammenfassung der ^1H -NMR-Daten (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) und ^{13}C NMR-Daten (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) von Verbindung **35**.

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3J_{\text{H,H}}$ [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
GlcNHAc	NH-1	8.310	<i>d</i>	9.3	1	-	-
	1	5.045	<i>dd</i>	9.3, 9.3	1	78.3	<i>t</i>
	NH-2	7.840	<i>dd</i>	9.3, 9.3	1	-	-
	2	3.824-3.738	<i>m</i>	-	2 (mit H-11)	52.8	<i>t</i>
	3	4.951	<i>dd</i>	9.3, 9.3	1	74.6	<i>t</i>
	4	3.678	<i>dd</i>	9.5, 9.5	1	75.7	<i>t</i>
	5	3.574-3.502	<i>m</i>	-	2 (mit H-8)	74.0	<i>t</i>
	6a	4.301-4.245	<i>m</i>	-	4 (mit H-12a, H-24a,b)	62.7	<i>s</i>
6b	3.964	<i>dd</i>	12.1, 5.5	1			
GlcNHAc'	7	4.665	<i>d</i>	8.1	1	100.3	<i>t</i>
	NH-8	7.991-7.951	<i>m</i>	-	3 (mit H-29, H-30)	-	-
	8	3.574-3.502	<i>m</i>	-	2 (mit H-5)	54.4	<i>t</i>
	9	5.130	<i>dd</i>	10.0, 10.0	1	72.5	<i>t</i>
	10	4.805	<i>dd</i>	10.0, 10.0	1	68.6	<i>t</i>
	11	3.824-3.738	<i>m</i>	-	2 (mit H-2)	71.0	<i>t</i>
	12a	4.301-4.245	<i>m</i>	-	4 (mit H-6a, H-24a,b)	62.0	<i>s</i>
12b	3.894	<i>dd</i>	12.4, 1.7	1			
Amino-pentansäure	NH-17	7.723-7.708	<i>m</i>	-	3 (mit H-26, H-33)	-	-
	13	-	-	-	-	171.7	<i>q</i>
	14	2.079-2.016	<i>m</i>	-	4 (mit H-19)	35.3	<i>s</i>
	15	1.480-1.293	<i>m</i>	-	8 (mit H-20, H-21)	22.5, 22.6	<i>s</i>
	16						
	17	3.002-2.930	<i>m</i>	-	4 (mit H-22)	35.6	<i>s</i>
Amino-pentansäure'	NH-22	7.281-7.244	<i>m</i>	-	1	-	-
	18	-	-	-	-	172.6	<i>q</i>
	19	2.079-2.016	<i>m</i>	-	4 (mit H-14)	34.9	<i>s</i>
	20	1.480-1.293	<i>m</i>	-	8 (mit H-15, H-16)	29.0, 28.8	<i>s</i>
	21						
	22	3.002-2.930	<i>m</i>	-	4 (mit H-17)	35.6	<i>s</i>

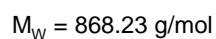
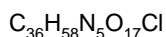
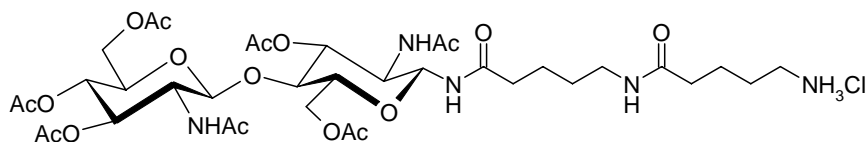
Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3J_{\text{H,H}}$ [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
Fmoc	23	-	-	-	-	-	-
	24	4.301-4.245	<i>m</i>	-	4 (mit H-12a)	65.6	<i>s</i>
	25	4.196	<i>t</i>	6.9	1	47.3	<i>t</i>
	26, 33	7.723-7.708	<i>m</i>	-	3 (mit NH-17)	109.9	<i>t</i>
	27, 32	7.562-7.526	<i>m</i>	-	2	127.7	<i>t</i>
	28, 31	7.425-7.387	<i>m</i>	-	2	124.7	<i>t</i>
	29, 30	7.991-7.951	<i>m</i>	-	3 (mit NH-8)	119.4	<i>t</i>
	34, 35	-	-	-	-	143.9	<i>q</i>
	36, 37	-	-	-	-	140.7	<i>q</i>
Acetyl	2.028, (<i>s</i> , 3H), 2.003 (<i>s</i> , 3H), 1.944 (<i>s</i> , 3H), 1.934 (<i>s</i> , 3H), 1.893 (<i>s</i> , 3H), 1.739 (<i>s</i> , 3H), 1.701 (<i>s</i> , 3H) 7 x CH ₃					20.7 (<i>p</i>), 20.4 (<i>p</i>), 20.4 (<i>p</i>), 20.3 (<i>p</i>), 20.2 (<i>p</i>), 18.8 (<i>p</i>), 18.0(<i>p</i>), 7 x CH ₃ , 170.0 (<i>q</i>), 170.0 (<i>q</i>), 169.6 (<i>q</i>), 169.4 (<i>q</i>), 169.3 (<i>q</i>), 169.2 (<i>q</i>), 169.2 (<i>q</i>), 7 x CO(Ac)	

6.5.7 Darstellung von *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'-aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid (36)

Reaktionsgleichung:



N-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'-*N*-(9*H*-9-fluorenylmethoxy-carbonyl)aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid



N-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'-aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid

Durchführung:

Es wurden 85.0 mg (80.6 μmol) von **35** in 11.5 mL DMF gelöst und auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Darauf folgend wurden 1.2 mL einer 20%igen (v/v) Lösung von Piperidin (206 mg, 2.42 mmol) in DMF zu der Reaktionslösung getropft und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei einer Temperatur von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 200 μL 37%iger Salzsäure auf pH 2.5-3.0 eingestellt, wobei ein farbloser Niederschlag aus der klaren Lösung ausfiel. Die Suspension wurde auf die Hälfte des Volumens eingengt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt und über *RP*-HPLC gereinigt.

Reinigung per HPLC (präparative Pyramid C_{18} *reversed phase* Säule, Flussrate 20 mL, System: A: 95% Wasser, 5% MeCN, 0.1% TFA, B: 95% MeCN, 5% Wasser, 0.1% TFA.

0-9.5 min	100-80% A	0-20% B
9.5-23 min	80-45% A	20-55% B
23-26 min	45-0% A	55-100% B
26-31.5 min	0% A	100% B
31.5-33.6 min	0-100% A	100-0% B

Es wurden 16.5 mg (19.0 μmol) *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'-aminopentanamidyl)-heptaacetylchitobiosid-Hydrochlorid (**36**) als farbloser Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 24% bezogen auf **35**.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt:	220.2 $^{\circ}\text{C}$ (Zers.)
DC (Chloroform / Methanol 7/3 v/v):	$R_f = 0.03$
MALDI-TOF-MS (m/z):	833.9 [M+H], 855.8 [M+Na], 872.7 [M+K]
$[\alpha]_D^{25}$:	-2.0° (c 0.25, H_2O)
<i>RP</i> -HPLC:	$R_t = 16$ min

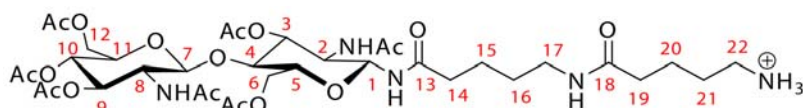
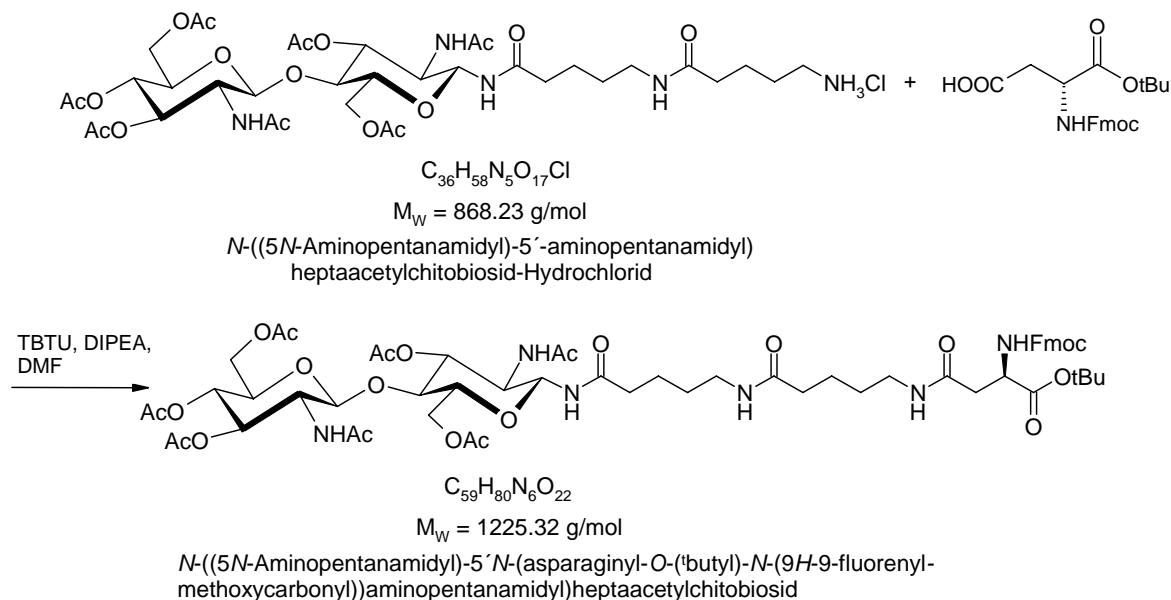


Tabelle 20: Zusammenfassung der ^1H -NMR-Daten (500 MHz, D_2O , 300 K) und ^{13}C NMR-Daten (125 MHz, D_2O , 300 K) von Verbindung **36**.

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3J_{\text{H,H}}$ [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
GlcNHAc	1	4.949-4.913	<i>m</i>	-	2 (mit H-10)	68.5	<i>t</i>
	2	3.736-3.663	<i>m</i>	-	2 (mit H-5)	53.7	<i>t</i>
	3	3.642-3.564	<i>m</i>	-	2 (mit H-4)	79.6	<i>t</i>
	4	3.642-3.564	<i>m</i>	-	2 (mit H-3)	72.7	<i>t</i>
	5	3.736-3.663	<i>m</i>	-	5 (mit H-2)	73.6	<i>t</i>
	6a	4.280	<i>d</i>	12.0	1	62.8	<i>s</i>
	6b	3.917-3.865	<i>m</i>	-	2 (mit H-11)		
GlcNHAc'	7	4.705	<i>d</i>	-	1	100.6	<i>t</i>
	8	3.823	<i>dd</i>	9.9, 9.9	1	54.0	<i>t</i>
	9	5.151	<i>dd</i>	9.8, 9.8	1	72.5	<i>t</i>
	10	4.949-4.913	<i>m</i>	-	2 (mit H-1)	78.1	<i>t</i>
	11	3.917-3.865	<i>m</i>	-	2 (mit H-6b)	71.1	<i>t</i>
	12a	4.189-4.116	<i>m</i>	-	2 (mit H-12b)	62.1	<i>s</i>
	12b	4.189-4.116	<i>m</i>	-	2 (mit H-12a)		
Amino-pentansäure	13	-	-	-	-	177.4	<i>q</i>
	14	1.454-1.394	<i>m</i>	-	2	38.8	<i>s</i>
	15, 16	1.514-1.487	<i>m</i>	-	4	27.6, 26.2	<i>s</i>
	17	1.328-1.272	<i>m</i>	-	2	22.4	<i>s</i>
Amino-pentansäure'	18	-	-	-	-	176.4	<i>q</i>
	19	3.021	<i>t</i>	6.6	2	22.3	<i>s</i>
	20, 21	2.137-2.113	<i>m</i>	-	4	35.2, 35.0	<i>s</i>
	22	2.860-2.828	<i>m</i>	-	2	39.1	<i>s</i>
Acetyl	1.976 (<i>s</i> , 3H), 1.962 (<i>s</i> , 3H), 1.932 (<i>s</i> , 3H), 1.903 (<i>s</i> , 3H), 1.837 (<i>s</i> , 3H), 1.811 (<i>s</i> , 3H), 7 x CH_3					174.6 (<i>q</i>), 174.5 (<i>q</i>), 173.8 (<i>q</i>), 173.7 (<i>q</i>), 173.1 (<i>q</i>), 172.8 (<i>q</i>), 7x $\text{CO}(\text{Ac})$, 22.0 (<i>p</i>), 20.2 (<i>p</i>), 20.0 (<i>p</i>), 19.9 (<i>p</i>), 7x CH_3	

6.5.8 Darstellung von *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5'*N*-(asparaginylo-(*t*-butyl)-*N*-(9*H*-9-fluorenylmethoxycarbonyl))aminopentanamidyl)-heptaacetylchitobiosid (**37**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung:

Es wurden 24.9 mg (28.7 μmol) **36** unter Schutzgas in 300 μL DMF gelöst und auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Dann wurden 24.5 mg (76.3 μmol) TBTU in 150 μL DMF gelöst und 17.5 μL DIPEA (13.8 mg, 107 μmol) hinzugegeben. Diese Lösung wurde zu einer Lösung von 18.8 mg (45.6 μmol) Fmoc-Asp-O*t*Bu in 150 μL DMF, gegeben. Nach zwei Minuten wurde diese Kupplungslösung tropfenweise zu dem gelösten Amin gegeben und 24 Stunden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis $+6\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Anschließend wurde das Rohprodukt in einer 5%igen (v/v) Lösung von Methanol in Chloroform aufgenommen und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Das so erhaltene gereinigte Produkt wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und gefriergetrocknet.

Es wurden 22.0 mg (17.9 μmol) von **37** als leicht gelblicher Feststoff erhalten. Die Ausbeute beträgt 72% bezogen auf die Menge an eingesetztem Edukt **36**.

Charakterisierung:

Schmelzpunkt: 240 °C (Zers.)

DC (Chloroform / Methanol 19/1 v/v): $R_f = 0.10$ $[\alpha]_D^{25}$: +34.8° (c 0.096, DMF)

MALDI-TOF-MS (m/z): 1247.7 [M+Na]

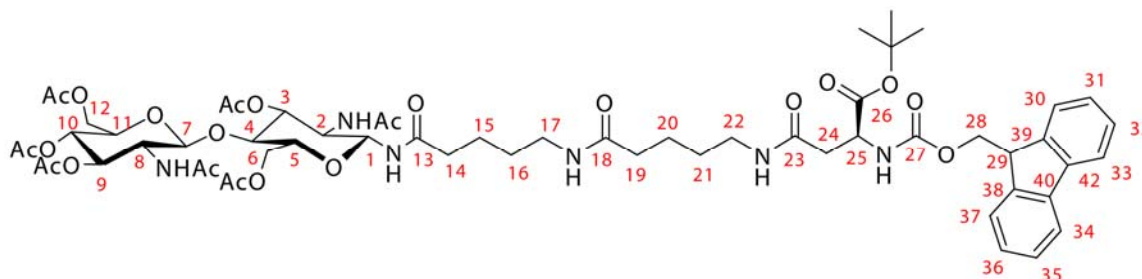


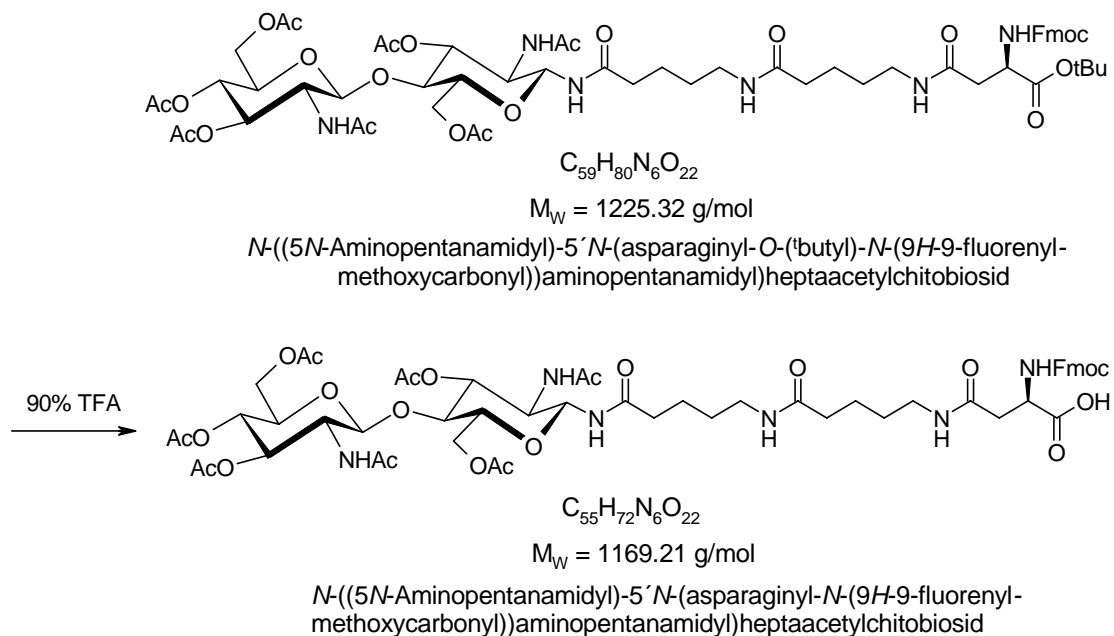
Tabelle 21: Zusammenfassung der ^1H -NMR-Daten (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) **37**. ^{13}C NMR-Daten (125 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) Wegen der geringen Konzentration der Probe konnten nicht von allen Atomen die chemischen Verschiebungen erhalten werden.

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3J_{\text{H,H}}$ [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
GlcNHAc	NH-1	8.331	<i>d</i>	9.2	1	-	-
	1	5.055	<i>dd</i>	9.6, 9.6	1	78.2	<i>t</i>
	NH-2	7.553	<i>d</i>	8.0	1	-	-
	2	3.834-3.758	<i>m</i>	-	2 (mit H-11)	70.7	<i>t</i>
	3	4.963	<i>dd</i>	9.6, 9.6	1	74.4	<i>t</i>
	4	3.692	<i>dd</i>	9.2, 9.2	1	75.8	<i>t</i>
	5	3.579-3.516	<i>m</i>	-	2 (mit H-8)	74.9	<i>t</i>
	6a	4.330-4.263	<i>m</i>	-	4 (mit H-12a, H-28a,b)	64.3	<i>s</i>
6b	3.977	<i>dd</i>	12.1, 5.7	1			
GlcNHAc'	7	4.676	<i>d</i>	8.3	1	100.2	<i>t</i>
	NH-8	8.132	<i>d</i>	8.3	1	-	-
	8	3.579-3.516	<i>m</i>	-	2 (mit H-5)	54.1	<i>t</i>
	9	5.142	<i>dd</i>	9.9, 9.9	1	72.9	<i>t</i>
	10	4.819	<i>dd</i>	9.7, 9.7	1	68.7	<i>t</i>
	11	3.834-3.758	<i>m</i>	-	2 (mit H- 2)	52.8	<i>t</i>
	12a	4.330-4.263	<i>m</i>	-	2 (mit H-6a, H-28a,b)	61.9	<i>s</i>
	12b	3.905	<i>dd</i>	12.1, 1.9	1		

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3\text{J}_{\text{H,H}}$ [Hz]	rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
Aminopentansäure A	13	-	-	-	-	-	-
	14	2.446-2.401	<i>m</i>	-	4 (mit H-19)	40.5	<i>s</i>
	15, 16	1.501-1.388	-	-	4	29.4	<i>s</i>
	NH-17	-	-	-	-	-	-
	17	3.031-2.963	<i>m</i>	-	4 (mit H-22)		
Aminopentansäure'	18		<i>m</i>	-			
	19	2.446-2.401	<i>m</i>	-	4 (mit H-14)	40.5	<i>s</i>
	20, 21	1.355-1.293	<i>m</i>	-	4	29.4	<i>s</i>
	NH-22			-		-	-
	22	3.031-2.963	<i>m</i>	-	4 (mit H-17)	-	-
Asparagin	NH-23	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-
	24	2.67-2.69	<i>m</i>	-	-	-	-
	NH-25	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	-	-
Fmoc	27	-		-	-	-	-
	28	4.330-4.263	<i>m</i>	-	4 (mit H-6a, H-12a)	-	-
	29	4.226	<i>t</i>	-	1	-	-
	30, 37	7.742-7.691	<i>m</i>	-	2	125.4	<i>t</i>
	31, 36	7.443-7.413	<i>m</i>	-	2	-	-
	32, 35	7.348-7.318	<i>m</i>	-	2	-	-
	33, 34	7.910-7.894	<i>m</i>	-	2	120.5	<i>t</i>
	38, 39	-	-	-	-	-	-
40, 41	-	-	-	-	-	-	
Acetyl	2.044 (<i>s</i> , 3H), 2.018 (<i>s</i> , 3H), 1.960 (<i>s</i> , 3H), 1.951 (<i>s</i> , 3H), 1.907 (<i>s</i> , 3H), 1.752 (<i>s</i> , 3H), 1.713 (<i>s</i> , 3H), 7x CH ₃						

6.5.9 Darstellung von *N*-((5*N*-Aminopentanamidyl)-5′*N*-(asparaginyln-*N*-(9*H*-9-fluorenylmethoxycarbonyl))aminopentanamidyl)heptaacetylchitobiosid (**38**)

Reaktionsgleichung:



Durchführung

Es wurden 75.1 mg (61.2 μmol) **37** mit einer 90%igen TFA-Lösung (TFA/H₂O, 9/1 (v/v)) für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. TFA und Wasser wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Es wurden 71.6 mg (61.2 μmol) von **38** als farbloser Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 100% bezogen auf die Menge an eingesetztem Edukt **37**.

Charakterisierung

Schmelzpunkt: 237 °C (Zers.)
 MALDI-TOF-MS (m/z): 1191.7 [M+Na], 1213.8 [M+2 Na]

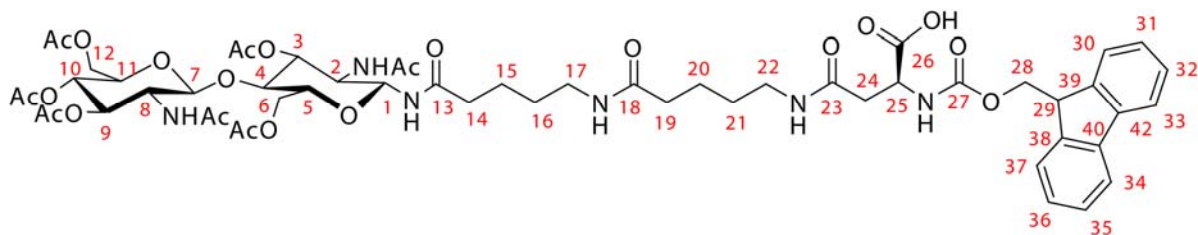


Tabelle 22: Zusammenfassung der ^1H -NMR-Daten (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) **38**. ^{13}C NMR-Daten (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K). Wegen der geringen Konzentration der Probe konnten nicht von allen Atomen die chemischen Verschiebungen erhalten werden.

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multiplizität	$^3J_{\text{H,H}}$ [Hz]	Rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
GlcNHAc	NH-1	8.331	<i>d</i>	9.2	1	-	-
	1	5.055	<i>dd</i>	9.6, 9.6	1	78.2	<i>t</i>
	NH-2	7.553	<i>d</i>	8.0	1	-	-
	2	3.834-3.758	<i>m</i>	-	2 (mit H-11)	70.7	<i>t</i>
	3	4.963	<i>dd</i>	9.6, 9.6	1	74.4	<i>t</i>
	4	3.692	<i>dd</i>	9.2, 9.2	1	75.8	<i>t</i>
	5	3.579-3.516	<i>m</i>	-	2 (mit H-8)	74.9	<i>t</i>
	6a	4.330-4.263	<i>m</i>	-	4 (mit H-12a, H-28a,b)	64.3	<i>s</i>
GlcNHAc'	6b	3.977	<i>dd</i>	12.1, 5.7	1	-	-
	7	4.676	<i>d</i>	8.3	1	100.2	<i>t</i>
	NH-8	8.132	<i>d</i>	8.3	1	-	-
	8	3.579-3.516	<i>m</i>	-	2 (mit H-5)	54.1	<i>t</i>
	9	5.142	<i>dd</i>	9.9, 9.9	1	72.9	<i>t</i>
	10	4.819	<i>dd</i>	9.7, 9.7	1	68.7	<i>t</i>
	11	3.834-3.758	<i>m</i>	-	2 (mit H- 2)	52.8	<i>t</i>
	12a	4.330-4.263	<i>m</i>	-	2 (mit H-6a, H-28a,b)	61.9	<i>s</i>
Aminopentansäure	12b	3.905	<i>dd</i>	12.1, 1.9	1	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
	14	2.446-2.401	<i>m</i>	-	4 (mit H-19)	40.5	<i>s</i>
	15, 16	1.501-1.388	-	-	4	29.4	<i>s</i>
	NH-17	-	-	-	-	-	-
Aminopentansäure'	17	3.031-2.963	<i>m</i>	-	4 (mit H-22)	-	-
	18	-	<i>m</i>	-	-	-	-
	19	2.446-2.401	<i>m</i>	-	4 (mit H-14)	40.5	<i>s</i>
	20, 21	1.355-1.293	<i>m</i>	-	4	29.4	<i>s</i>
	NH-22	-	-	-	-	-	-
	22	3.031-2.963	<i>m</i>	-	4 (mit H-17)	-	<i>s</i>

Spinsystem	Nr.	δ [ppm] ^1H	Multi- plizität	$^3\text{J}_{\text{H,H}}$ [Hz]	Rel. Integral	δ [ppm] ^{13}C	Phase
Asparagin	NH-23	-		-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-
	24	2.63-2.65	<i>m</i>	-	-	-	-
	NH-25	-		-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	-	-
Fmoc	27	-	-	-	-	-	-
	28	-	<i>m</i>	-	-	-	-
	29	4.226	<i>t</i>	-	1	-	-
	30, 37	7.742-7.691	<i>m</i>	-	2	125.4	-
	31, 36	7.443-7.413	<i>m</i>	-	2	-	-
	32, 35	7.348-7.318	<i>m</i>	-	2	-	-
	33, 34	7.910-7.894	<i>m</i>	-	2	120.5	<i>t</i>
	38, 39	-	-	-	-	-	-
	40, 41	-	-	-	-	-	-
Acetyl	2.044 (s, 3H), 2.018 (s, 3H), 1.960 (s, 3H), 1.951 (s, 3H), 1.907 (s, 3H), 1.752 (s,3H), 1.713 (s, 3H), 7 x CH ₃					-	-

6.6 Peptidsynthese

6.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Automatisierte Festphasenpeptidsynthese (AAV1)

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese erfolgte an einem Syntheseroboter der Firma *Advanced ChemTech* unter Verwendung eines Polystyrol-PAL-PEG-Harzes, welches eine Belegung von 0.21 μmol Bindungsstellen pro 1 mg Harz aufwies.

Das Harz wurde vor der ersten Kupplung durch das abwechselnde Versetzen des Harzes mit 2-Propanol und DMF gequellt. Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde das Harz zweimal für je 15 Minuten mit einer Lösung von 20% (v/v) Piperidin in DMF versetzt. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte unter Einsatz eines vierfachen Überschusses der Aminosäure (0.5 M in DMF) und eines fünffachen Überschusses an DIPEA (1.0 M in DMF) und TBTU (0.5 M in DMF). Die Kupplungsschritte jeder Aminosäure wurden dreimal wiederholt und die Kupplungszeiten betragen für die erste Kupplung 25 min, für die zweite Kupplung 40 Minuten und für die dritte Kupplung 50 Minuten. Das Blockieren nicht umgesetzter Bindungsstellen erfolgte durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit einer Lösung von 10% (v/v) Essigsäureanhydrid in DMF für 10 Minuten. Dieser Vorgang wurde

zweimal wiederholt. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit DMF, in dem alle Nebenprodukte und Reste der Reagenzien entfernt wurden.

Die Fmoc-Gruppe der letzten gekuppelten Aminosäure wurde manuell abgespalten, um eine vorläufige Ausbeute der Synthese bestimmen zu können.

Manuelle Abspaltung der Fmoc-Gruppe (AAV2)

Für die Bestimmung der Rohausbeute der Peptidsynthese wurde die Fmoc-Gruppe der letzten gekuppelten Aminosäure manuell abgespalten. Hierzu wurde das Harz mit 2000 μL Piperidin/DMF (20% (v/v)) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung in einem lichtgeschützten Kolben überführt und das Harz viermal mit je 2000 μL DMF gewaschen und die Waschlösung mit der Reaktionslösung vereint. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die photometrische Quantifizierung des abgespaltenen Methylenfluorens. Hierzu wurden 250 μL der Reaktionslösung mit DMF auf 2000 μL verdünnt und die so erhaltene Lösung bei einer Wellenlänge $\lambda = 301 \text{ nm}$ vermessen. Die Stoffmenge des abgespaltenen Methylenfluorens errechnet sich nach Gleichung 17.

$$n_{\text{Fmoc}} = (OD * V + \varepsilon^{-1} + d^{-1}) * F$$

Gleichung 17: Berechnung der Stoffmenge des abgespaltenen Methylenfluorens (n_{Fmoc}). Mit OD: gemessene Absorption, V: Volumen der Reaktionslösung (20 mL), ε : Molarer Extinktionskoeffizient ($7.95 * 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d: Schichtdicke der Küvette (1 cm) und F: Verdünnungsfaktor (16).

Die prozentuale Ausbeute berechnet sich aus dem Quotienten der Menge an abgespaltenem Methylenfluoren und der Anzahl der Bindungsstellen des eingewogenen Harzes.

Abspaltung der Peptide von der Festphase (AAV3)

Vor dem Abspalten der Peptide vom Harz wurde dieses gründlich mit Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet, um letzte Spuren an DMF zu entfernen.

Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit einer Lösung aus TFA/TIPS/ H_2O (95/3/2) und anschließendem Schütteln der Reaktionslösung für 90 Minuten. Die Reaktionslösung wurde darauffolgend in einen Kolben überführt, das Harz viermal mit 2 mL TFA gewaschen und die vereinigten Lösungen im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der verbliebene Rückstand wurde zum Entfernen letzter TFA-Spuren einmal mit Dichlormethan coevaporiert und im Anschluss mit 'Butyl-Methylether versetzt. Die erhaltene Suspension wurde für fünf Minuten im Ultraschall homogenisiert und im Anschluss bei 3300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Reinigung der Peptide über *RP*-HPLC (AAV4)

Die Reinigung der Peptide erfolgte über eine präparative *RP*-HPLC-Säule (Pyramid C₁₈ *reversed phase*) mit einer Flussrate von 20 mL/min. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten eines Laufmittelgemisches aus Laufmittel A (Wasser/Acetonitril 95/5 mit 0.1% (v/v) TFA) und Laufmittel B (Acetonitril/Wasser 95/5 mit 0.1% (v/v) TFA), die Detektion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm und $\lambda = 280$ nm.

Für die HPLC-Injektion des Rohprodukts wurden ca. 30 mg des gefriergetrockneten Rohprodukts eingewogen und in 1 mL des Laufmittels A gelöst. Die erhaltene Lösung wurde eine Minute bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand durch einen Zentrifugationsfilter (0.22 μ m) bei 3300 g zentrifugiert. Die Reinigung der Octapeptide erfolgte nach einer der beiden unten aufgeführten Methoden für Octapeptide, die entsprechend der Peptidsequenz ausgewählt wurden. Die Reinigung der Undecapeptide **19** und **23** erfolgte nach Methode 3, während für die Reinigung der Glycopeptide **39** und **40** die Methode 4 verwendet wurde. Die angegebenen Gradienten der einzelnen Methoden wurden, wenn nötig, geringfügig verändert.

Methode 1: Für Octapeptide der Ursprungssequenz YYRENMHR:

0-11.9 min	100-90% A	0-10% B
11.9-42.2 min	90-75% A	10-25% B
42.2-46.5 min	75-0% A	25-100% B
49.5-50.8 min	0% A	100% B
50.8-55.2 min	0-100% A	100-0% B

Methode 2: Für Octapeptide der Ursprungssequenz NMHRYPNQ:

0-24.9 min	100-91% A	0-9% B
24.9-29.2 min	91% A	9% B
29.2-33.5 min	91-60% A	9-40% B
33.5-36.8 min	60-0% A	25-100% B
36.8-41.3 min	0% A	100% B
41.3-45.5 min	0-100% A	100-0% B

Methode 3: Für Undecapeptide aus der Sequenz YYRENMHRYPNQVYYR:

0-7.8 min	100-90% A	0-10% B
7.8-40.5 min	90-70% A	10-30% B
40.5-48.7 min	70-0% A	30-100% B
48.7-50.9 min	0% A	100% B
50.9-55.2 min	0-100% A	100-0% B

Methode 4: Für Glycopeptide:

0-11.9 min	100-90% A	0-10% B
11.9-18.4 min	90% A	10% B
18.4-27.0 min	90-75% A	10-25% B
27.0-31.4 min	75-0% A	25-100% B
31.4-33.6 min	0% A	100% B
33.6-37.9 min	0-100% A	100-0% B

Charakterisierung der Peptide mit NMR (AAV5)

Alle Peptide wurden NMR-spektroskopisch charakterisiert. Hierzu wurden 2-6 mg des jeweiligen Peptids in H₂O/D₂O (9:1, pH 3.0) gelöst und auf einem 500 MHz oder einem 700 MHz Spektrometer bei einer Temperatur von 300 K vermessen. Das Wassersignal wurde mit einer WATERGATE-Pulssequenz unterdrückt. Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme eines TOCSY-Spektrums, die Peptidsequenz wurde durch die Auswertung der NOE-Kontakte der jeweiligen Aminosäuren unter Zuhilfenahme eines ROESY-Spektrums verifiziert.

6.6.2 Synthese der Peptide 1-19

Die Synthese der Peptide **1-19** erfolgte in einer automatisierten Festphasenpeptidsynthese an einem Syntheseroboter der Firma *Advanced Chem Tech* nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV1. Es wurden 143 mg des Polystyrol-PAL-PEG-Harzes eingewogen, so dass die Anzahl der Bindungsstellen 30 μ mol betrug. Die Rohausbeute der Synthese wurde über die Stoffmenge des abgespaltenen Methylenfluorens bestimmt (AAV2) und die Abspaltung der Peptide erfolgte nach AAV3. Die Peptide wurden nach AAV4 gereinigt, so dass eine Reinheit >95% erreicht wurde. Für die Charakterisierung per MALDI-TOF-MS wurden von dem HPLC-Eluat 0.5 μ L abgenommen und auf dem MALDI-Target mit DHB kokristallisiert. Die Charakterisierung per NMR-Spektroskopie erfolgte nach AAV5.

Die Daten der Charakterisierung und die Ausbeuten der erhaltenen Peptide sind in dem folgenden Abschnitt zusammengefasst.

Peptid 1:

Sequenz: NMHRYPNQ

Molmasse: 1058.2 g/mol

Ausbeute: 16.9 mg (53%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1059.1 [M+H], 1081.2 [M+Na], 1097.2 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.255	2.875	2.875	-	-	7.603	6.965	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.680	4.377	1.913	1.913	2.437	2.437	-	-	1.995	-	-
¹⁵⁵ His	8.532	4.517	3.018	3.018	-	-	8.473	-	6.986	-	-
¹⁵⁶ Ala	8.216	4.217	1.574	1.574	1.395	1.395	3.056	3.056	7.052	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.272	4.795	3.065	2.735	-	-	7.124	-	6.745	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.342	2.238	2.238	1.965	1.885	3.764	3.630	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.404	4.578	2.773	2.773	-	-	7.546	7.050	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.179	4.236	2.055	1.915	2.295	2.295	7.549	6.859	-	-	7.435/6.765

Peptid 2:

Sequenz: AYRENMHR

Molmasse: 1075.23 g/mol

Ausbeute: 15.1 mg (47%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1076.3 [M+H], 1092.3 [M+Na], 1114.3 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Ala	-	3.978	1.408	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.542	4.490	2.912	2.912	-	-	6.743	-	7.054	-	-
¹⁵¹ Arg	8.169	4.171	1.689	1.689	1.589	1.448	3.089	3.089	7.074	-	-
¹⁵² Glu	8.229	4.149	1.869	1.869	2.369	2.369	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.457	4.561	2.709	2.709	-	-	7.523	6.831	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.222	4.350	1.910	1.851	2.369	2.369	-	-	1.990	-	-
¹⁵⁵ His	8.464	4.577	3.171	3.171	-	-	7.213	-	8.534	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.269	4.230	1.749	1.749	1.650	1.529	3.109	3.109	7.093	-	7.578/7.033

Peptid 3:

Sequenz: YARENMHR
 Molmasse: 1075.23 g/mol
 Ausbeute: 13.5 mg (42%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1076.7 [M+H], 1092.7 [M+Na], 1114.3 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.133	3.069	3.009	-	-	6.776	-	7.065	-	-
¹⁵⁰ Ala	8.461	4.273	1.270	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵¹ Arg	8.281	4.193	1.772	1.772	1.704	1.571	3.133	3.133	7.097	-	-
¹⁵² Glu	8.321	4.253	1.991	1.871	2.351	2.351	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.453	4.583	2.752	2.671	-	-	7.510	6.834	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.263	4.353	1.951	1.851	2.451	2.392	-	-	1.991	-	-
¹⁵⁵ His	8.463	4.583	3.132	3.192	-	-	7.215	n.d.	8.529	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.263	4.213	1.751	1.751	1.670	1.552	3.132	3.132	7.098	-	7.571/7.034

n.d.: nicht detektiert.

Peptid 4:

Sequenz: YYAENMHR
 Molmasse: 1082.21 g/mol
 Ausbeute: 12.9 mg (40%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1082.9 [M+H], 1104.9 [M+Na], 1120.9 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.103	3.004	3.004	-	-	6.753	-	7.022	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.279	4.452	2.850	2.850	-	-	6.733	-	7.016	-	-
¹⁵¹ Ala	8.079	4.131	1.248	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵² Glu	8.079	4.131	1.969	1.849	2.350	2.350	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.351	4.551	2.730	2.730	-	-	7.565	7.032	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.129	4.341	1.949	1.849	2.450	2.369	-	-	1.980	-	-
¹⁵⁵ His	8.421	4.571	3.110	3.190	-	-	7.193	-	8.524	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.236	4.231	1.749	1.749	1.649	1.529	3.110	3.110	7.093	-	7.571/7.034

Peptid 5:

Sequenz: YYRANMHR

Molmasse: 1109.29 g/mol

Ausbeute: 20.1 mg (60%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1110.5 [M+H], 1132.5 [M+Na], 1148.5 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.129	3.034	3.034	-	-	6.759	-	7.011	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.413	4.450	2.888	2.808	-	-	6.719	-	6.992	-	-
¹⁵¹ Arg	7.955	4.109	1.668	1.668	1.547	1.468	3.088	3.088	7.052	-	-
¹⁵² Ala	8.140	4.049	1.286	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.321	4.529	2.718	2.718	-	-	7.515	6.832	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.123	4.329	1.948	1.848	2.430	2.430	-	-	1.990	-	-
¹⁵⁵ His	8.446	4.589	3.108	3.108	-	-	7.201	-	8.534	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.271	4.229	1.748	1.748	1.647	1.528	3.108	3.108	7.091	-	7.577/7.032

Peptid 6:

Sequenz: YYREAMHR

Molmasse: 1124.30 g/mol

Ausbeute: 20.7 mg (61%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1124.6 [M+H], 1146.6 [M+Na], 1162.6 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.141	3.029	3.029	-	-	6.759	-	7.022	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.392	4.470	2.859	2.859	-	-	6.733	-	7.002	-	-
¹⁵¹ Arg	8.084	4.090	1.667	1.667	1.568	1.428	3.089	3.089	7.052	-	-
¹⁵² Glu	8.131	4.110	1.948	1.828	2.368	2.368	-	-	-	-	-
¹⁵³ Ala	8.277	4.170	1.267	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.178	4.310	1.889	1.889	2.429	2.429	-	-	1.995	-	-
¹⁵⁵ His	8.467	4.610	3.109	3.169	-	-	7.212	-	8.534	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.339	4.229	1.748	1.748	1.648	1.528	3.109	3.109	7.093	-	7.591/7.037

Peptid 7:

Sequenz: YYRENAHR
 Molmasse: 1107.21 g/mol
 Ausbeute: 21.2 mg (64%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1108.0 [M+H], 1130.0 [M+Na], 1146.0 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.131	3.030	3.030	-	-	7.049	-	7.573	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.390	4.451	2.850	2.850	-	-	6.843	-	7.513	-	-
¹⁵¹ Arg	8.085	4.111	1.669	1.669	1.569	1.428	3.069	3.069	7.043	-	-
¹⁵² Glu	8.202	4.130	1.958	1.849	2.349	2.349	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.430	4.551	2.669	2.669	-	-	7.517	6.830	-	-	-
¹⁵⁴ Ala	8.147	4.161	1.228	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁵ His	8.407	4.571	3.190	3.110	3.110	-	7.213	-	8.527	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.245	4.210	1.749	1.749	1.648	1.528	3.110	3.110	7.093	-	7.757/7.038

Peptid 8:

Sequenz: YYRENMAR
 Molmasse: 1101.26 g/mol
 Ausbeute: 17.9 mg (41%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1101.9 [M+H], 1118.0 [M+Na], 1119.9 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.108	3.067	3.067	-	-	6.735	-	7.030	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.399	4.461	2.865	2.865	-	-	6.722	-	7.012	-	-
¹⁵¹ Arg	8.047	4.096	1.598	1.598	1.432	1.432	3.093	3.093	7.049	-	-
¹⁵² Glu	8.184	4.114	1.848	1.848	1.964	1.964	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.447	4.575	2.722	-	-	-	7.515	6.803	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.209	4.378	2.030	1.900	2.459	2.459	-	-	2.008	-	-
¹⁵⁵ Ala	8.194	4.215	1.313	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.162	4.215	1.795	1.795	1.672	1.672	3.112	3.112	7.105	-	7.463/7.024

Peptid 9:

Sequenz: YYRENMHA

Molmasse: 1082.21 g/mol

Ausbeute: 14.2 mg (36%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1083.2 [M+H], 1105.2 [M+Na], 1121.2 [M+K].

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.103	3.078	3.078	-	-	6.752	-	7.260	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.402	4.450	2.865	2.865	-	-	6.736	-	7.010	-	-
¹⁵¹ Arg	8.052	4.090	1.674	1.563	1.411	1.411	3.082	3.082	7.044	-	-
¹⁵² Glu	8.172	4.109	1.827	1.948	2.347	2.347	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.434	4.551	2.710	2.710	-	-	7.523	6.830	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.227	4.328	1.847	1.928	2.389	2.389	-	-	1.986	-	-
¹⁵⁵ His	8.414	4.590	3.209	3.091	-	-	8.533	-	7.215	-	-
¹⁵⁶ Ala	8.194	4.210	1.306	-	-	-	-	-	-	-	6.971/7.545

Peptid 10:

Sequenz: AMHRYPNQ

Molmasse: 1015.17 g/mol

Ausbeute: 11.0 mg (27%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1016.5 [M+H], 1038.5 [M+Na]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Ala	-	4.005	1.407	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.576	4.330	2.009	1.888	2.488	2.488	-	-	2.008	-	-
¹⁵⁵ His	8.572	4.553	3.008	3.008	-	-	6.793	-	8.472	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.270	4.209	1.568	1.568	1.388	1.388	3.050	3.050	7.057	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.290	4.791	3.050	3.050	-	-	6.739	-	7.126	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.335	1.961	1.907	2.214	2.214	3.767	3.639	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.411	4.570	2.749	2.749	-	-	7.546	-	6.847	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.180	4.230	2.047	1.908	2.289	2.289	-	-	6.740	7.433	7.039/7.543

Peptid 11:

Sequenz: NAHRYPNQ

Molmasse: 998.08 g/mol

Ausbeute: 16.8 mg (42%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 999.3 [M+H], 1021.3 [M+Na], 1052.3 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.233	2.866	2.866	-	-	7.606	6.960	-	-	-
¹⁵⁴ Ala	8.619	4.239	1.238	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁵ His	8.429	4.481	2.996	2.996	-	-	6.962	-	8.470	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.203	4.198	1.558	1.558	1.362	1.362	3.038	3.038	7.047	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.266	4.762	3.040	2.714	-	-	6.723	-	7.122	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.321	2.194	2.194	1.921	1.921	3.760	3.630	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.408	4.559	2.758	2.758	-	-	7.546	6.844	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.182	4.220	2.036	1.888	2.280	2.280	-	-	7.432	6.769	7.544/7.038

Peptid 12:

Sequenz: NMARYPNQ

Molmasse: 992.13 g/mol

Ausbeute: 21.4 mg (72%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 992.8 [M+H], 1014.9 [M+Na], 1030.9 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.289	2.918	2.918	-	-	6.963	7.615	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.656	4.429	1.997	1.922	2.497	2.497	-	-	2.030	-	-
¹⁵⁵ Ala	8.289	4.178	1.256	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.067	4.158	1.576	1.576	1.387	1.387	3.065	3.065	7.054	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.078	4.818	3.038	2.757	-	-	6.761	-	7.101	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.339	2.216	1.936	1.876	1.876	3.698	3.578	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.412	4.579	2.777	2.777	-	-	7.553	6.868	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.201	4.239	2.096	1.916	2.297	2.297	-	-	7.427	6.761	7.548/7.056

Peptid 13:

Sequenz: NMHAYPNQ

Molmasse: 973.09 g/mol

Ausbeute: 4.8 mg (16%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 973.7 [M+H], 995.7 [M+Na], 1011.7 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.245	2.877	2.877	-	-	7.611	6.947	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.702	4.346	1.905	1.905	2.423	2.423	-	-	2.000	-	-
¹⁵⁵ His	8.468	4.526	3.044	3.044	-	-	8.496	-	7.078	-	-
¹⁵⁶ Ala	8.156	4.205	1.183	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.143	4.746	3.024	2.746	-	-	6.746	-	7.106	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.337	2.204	2.204	1.918	1.918	3.725	3.541	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.419	4.566	2.755	2.755	-	-	7.549	6.848	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.219	4.225	2.064	1.904	2.644	2.644	-	-	7.427	6.747	7.551/7.038

Peptid 14:

Sequenz: NMHRAPNQ

Molmasse: 996.10 g/mol

Ausbeute: 10.2 mg (35%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 966.6 [M+H], 988.5 [M+Na], 1004.5 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.263	2.877	2.877	-	-	7.617	6.958	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.705	4.382	1.922	1.922	2.451	2.451	-	-	2.010	-	-
¹⁵⁵ His	8.579	4.612	3.137	3.137	-	-	8.542	-	7.222	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.317	4.252	1.651	1.651	1.530	1.530	3.111	3.111	7.102	-	-
¹⁵⁷ Ala	8.394	4.532	1.309	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.332	2.229	1.969	1.850	1.850	3.739	3.612	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.402	4.552	2.751	2.751	-	-	7.546	6.837	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.207	4.232	2.070	1.909	2.271	2.271	-	-	7.448	6.795	7.533/7.037

Peptid 15:

Sequenz: NMHRYANQ

Molmasse: 1032.16 g/mol

Ausbeute: 12.8 mg (41%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1032.6 [M+H], 1054.7 [M+Na], 1070.6 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.251	2.874	2.874	-	-	7.605	6.957	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.690	4.376	1.915	1.915	2.435	2.435	-	-	1.999	-	-
¹⁵⁵ His	8.530	4.536	3.035	3.035	-	-	8.495	-	7.039	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.246	4.195	1.574	1.574	1.393	1.393	3.054	3.054	7.042	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.214	4.516	3.025	2.815	-	-	6.741	-	7.073	-	-
¹⁵⁸ Ala	8.232	4.205	1.283	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.289	4.556	2.755	2.714	-	-	7.524	6.839	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.211	4.216	2.054	1.894	2.274	2.274	-	-	7.416	6.759	7.532/7.039

Peptid 16:

Sequenz: NMHRYPAQ

Molmasse: 1015.17 g/mol

Ausbeute: 12.3 mg (40%)

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1015.9 [M+H], 1037.9 [M+Na], 1053.9 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.254	2.851	2.880	-	-	7.605	6.969	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.680	4.376	1.914	1.914	2.435	2.435	-	-	1.999	-	-
¹⁵⁵ His	8.525	4.520	3.025	3.025	-	-	8.477	-	6.994	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.212	4.198	1.570	1.570	1.395	1.395	3.055	3.055	7.052	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.252	4.788	3.038	2.736	-	-	6.748	-	7.111	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.324	2.219	2.219	1.928	1.928	3.752	3.582	-	-	-
¹⁵⁹ Ala	8.293	4.217	1.335	-	-	-	-	-	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.255	4.217	1.935	1.935	2.292	2.292	-	-	7.442	6.768	7.501/7.024

Peptid **17**:

Sequenz: NMHRYPNA
 Molmasse: 1001.14 g/mol
 Ausbeute: 20.8 mg (60%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1002.4 [M+H], 1024.4 [M+Na], 1040.4 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.258	2.901	2.852	-	-	n.d	n.d	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.698	4.370	1.890	1.890	2.426	2.426	-	-	1.996	-	-
¹⁵⁵ His	8.517	4.519	3.022	3.022	-	-	8.480	-	7.007	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.201	4.174	1.559	1.380	1.265	1.265	3.043	2.827	7.060	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.234	4.781	3.042	2.749	-	-	6.742	-	7.118	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.331	2.219	2.197	1.951	1.863	3.734	3.599	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.371	4.584	2.710	2.710	-	-	n.d	n.d	-	-	-
¹⁶⁰ Ala	8.138	4.195	1.324	-	-	-	-	-	-	-	7.500/6.959

n.d.: nicht detektiert.

Peptid **18**:

Sequenz: YYRENMHR
 Molmasse: 1167.32 g/mol
 Ausbeute: 23.2 mg (66%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1168.0 [M+H], 1190.0 [M+Na], 1206.0 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.127	3.014	3.014	-	-	7.012	-	6.734	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.411	4.439	2.858	2.858	-	-	6.993	-	6.705	-	-
¹⁵¹ Arg	8.057	4.087	1.666	1.558	1.412	1.412	3.064	3.064	7.041	-	-
¹⁵² Glu	8.174	4.088	1.939	1.823	2.321	2.321	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.428	4.537	2.681	2.681	-	-	7.513	6.821	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.186	4.322	1.939	1.821	2.423	2.423	-	-	1.995	-	-
¹⁵⁵ His	8.443	4.555	3.188	3.091	-	-	8.514	-	7.194	-	-
¹⁵⁶ Ala	8.255	4.205	1.743	1.646	1.511	1.511	3.092	3.092	7.045	-	7.576/7.030

Peptid 19:

Sequenz: YYRENMHRYPNQ
 Molmasse: 1669.86 g/mol
 Ausbeute: 14.2 mg (28%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1671.1 [M+H], 1693.1 [M+Na], 1710.1 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁴⁹ Tyr	-	4.445	2.866	2.866	-	-	6.716	-	6.987	-	-
¹⁵⁰ Tyr	8.408	4.447	3.057	3.159	-	-	6.733	-	7.004	-	-
¹⁵¹ Arg	8.062	4.095	1.673	1.556	1.400	1.400	3.060	3.060	7.031	-	-
¹⁵² Glu	8.161	4.095	1.927	1.81	2.338	2.338	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.426	4.525	2.702	2.702	-	-	6.849	7.512	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.174	4.310	1.811	1.811	2.357	2.357	-	-	1.995	-	-
¹⁵⁵ His	8.372	4.487	3.021	3.021	-	-	8.457	-	7.005	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.093	4.172	1.538	1.538	1.361	1.361	3.021	3.021	7.031	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.195	4.778	3.042	2.788	-	-	6.732	-	7.090	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.325	1.849	1.931	2.201	2.201	3.717	3.591	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.409	4.566	2.846	2.748	-	-	7.045	7.535	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.179	4.212	1.907	1.907	2.061	2.061	-	-	6.849	7.535	7.420/6.751

6.6.3 Synthese der Peptide 20-28

Die Synthese der Peptide **20-28** erfolgte manuell mit einer Ansatzgröße von 50 μ mol. Hierzu wurden 55 mg des Rink-Amid-Harzes (Belegung 0.91 μ mol/mg) eingewogen. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für jeweils 15 Minuten. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte durch eine zweifache Kupplung für jeweils 30 min, in der die zu kuppelnde Aminosäure (0.5 M in DMF) mit einem vierfachen und TBTU (0.5 M in DMF) sowie DIPEA (1.0 M in DMF) in einem fünffachen Überschuss eingesetzt wurde. Das Blockieren nicht umgesetzter Bindungsstellen erfolgte durch zehnmütiges Versetzen mit 2 mL 10% (v/v) Acetanhydrid in DMF. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF gewaschen.

Die Bestimmung der Rohausbeute über den Wert des abgespaltenen Methylenfluorens erfolgte nach AAV2 und die Abspaltung der Peptide erfolgte nach AAV3. Die Peptide wurden nach AAV4 gereinigt, so dass eine Reinheit >95% erreicht wurde. Für die Charakterisierung per MALDI-TOF-MS wurden von dem HPLC-Eluat 0.5 μ L abgenommen

und auf dem MALDI-Target mit DHB kokristallisiert. Die Charakterisierung per NMR-Spektroskopie erfolgte nach AAV5.

Die Daten der Charakterisierung und die Ausbeuten der erhaltenen Peptide sind im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

Peptid 20:

Sequenz: RENMHRYP
 Molmasse: 1101.26 g/mol
 Ausbeute: 12.1 mg (37%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 1101.9 [M+H], 1123.9 [M+Na], 1139.9 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵¹ Arg	-	3.973	1.846	1.846	1.569	1.569	3.150	3.150	7.123	-	-
¹⁵² Glu	8.759	4.312	1.909	1.909	2.350	2.350	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.633	4.592	2.701	2.701	-	-	7.733	6.854	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.336	4.351	1.930	1.849	2.420	2.420	-	-	1.991	-	-
¹⁵⁵ His	8.455	4.531	3.050	3.050	-	-	7.034	n.d.	8.489	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.172	4.191	1.790	1.790	1.581	1.581	3.071	3.071	7.063	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.275	4.792	3.019	2.801	-	-	6.753	-	7.132	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.283	2.190	2.190	1.905	1.905	3.751	3.551	-	-	n.d.

n.d.: nicht detektiert.

Peptid 21:

Sequenz: ENMHRY
 Molmasse: 847.96 g/mol
 Ausbeute: 5.2 mg (31%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 849.0 [M+H], 871.0 [M+Na], 888.0 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵² Glu	-	3.998	2.069	2.069	2.390	2.390	-	-	-	-	-
¹⁵³ Asn	8.866	4.650	2.749	2.690	-	-	7.546	6.893	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.506	4.351	1.951	1.849	2.450	2.450	-	-	1.993	-	-
¹⁵⁵ His	8.471	4.512	3.050	3.050	-	-	7.054	n.d.	8.503	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.263	4.171	1.380	1.380	1.579	1.579	3.050	3.050	n.d.	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.177	4.484	3.032	2.831	-	-	6.754	-	7.090	-	7.480/7.013

n.d.: nicht detektiert.

Peptid 22:

Sequenz:	NMHR
Molmasse:	555.66 g/mol
Ausbeute:	6.7 mg (61%)
MALDI-TOF-MS [m/z]:	556.6 [M+H], 578.7 [M+Na], 594.7 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.267	2.881	2.881	-	-	7.617	6.955	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.715	4.391	1.928	1.928	2.450	2.451	-	-	2.011	-	-
¹⁵⁵ His	8.593	4.592	3.149	3.149	-	-	7.215	n.d.	8.549	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.353	4.237	1.664	1.664	1.552	1.553	3.121	3.121	7.107	-	7.599/7.038

Peptid 23:

Sequenz:	NMHRYPNQVYYR
Molmasse:	1639.87 g/mol
Ausbeute:	9.8 mg (12%)
MALDI-TOF-MS [m/z]:	1640.1 [M+H], 1662.3 [M+Na], 1678.2 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.271	2.871	2.871	-	-	7.619	6.981	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.694	4.396	2.464	2.464	1.935	1.935	-	-	2.005	-	-
¹⁵⁵ His	8.539	4.549	3.037	3.037	-	-	7.004	-	8.479	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.210	4.241	1.595	1.547	1.417	1.417	3.045	3.045	7.039	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.170	4.824	3.071	2.777	-	-	6.754	-	7.107	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.348	2.236	2.236	1.954	1.954	3.766	3.649	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.374	4.585	2.779	2.779	-	-	8.479	7.004	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.037	4.242	1.937	1.937	2.306	2.306	-	-	n.d.	n.d.	-
¹⁶¹ Val	8.008	3.927	1.877	-	0.743	0.743	-	-	-	-	-
¹⁶² Tyr	8.042	4.480	2.840	2.840	-	-	6.773	-	7.068	-	-
¹⁶³ Tyr	7.992	4.824	3.071	2.777	-	-	6.761	-	7.029	-	-
¹⁶⁴ Arg	8.037	4.162	1.754	1.754	1.543	1.483	3.109	3.109	7.083	-	n.d.

n.d.: nicht detektiert.

Peptid 24:

Sequenz: HRYPNQ
 Molmasse: 812.89 g/mol
 Ausbeute: 17.3 mg (24%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 813.6 [M+H], 835.5 [M+Na], 851.5 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁵ His	-	4.236	3.259	3.259	-	-	6.826	-	8.428	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.584	4.286	1.600	1.600	1.459	1.392	3.046	3.046	-	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.461	4.772	3.056	2.729	-	-	6.734	-	7.147	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.318	2.214	2.214	1.922	1.922	3.780	3.628	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.403	4.552	2.750	2.750	-	-	7.538	6.835	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.176	4.227	1.916	1.916	2.264	2.264	-	-	7.538	7.504	7.433/6.751

Peptid 25:

Sequenz: RYPNQ
 Molmasse: 675.75 g/mol
 Ausbeute: 10.4 mg (31%) (Prolin-*cis/trans* Gemisch (1:2))
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 675.4 [M+H], 697.5 [M+Na], 713.4 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

Isomer 1:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁶ Arg	-	3.904	1.780	1.780	1.502	1.502	3.099	3.099	7.092	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.632	4.808	2.794	3.065	-	-	6.776	-	7.141	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.325	2.212	2.212	1.918	1.918	3.771	3.501	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.349	4.557	2.761	2.761	-	-	7.543	6.855	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.183	4.227	1.897	2.058	2.281	2.281	-	-	7.555	6.855	7.435/6.756

Isomer 2:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁶ Arg	-	3.959	1.824	1.824	1.577	1.577	3.135	3.135	7.067	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.668	4.417	2.830	2.830	-	-	6.789	-	7.066	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.325	2.212	2.212	1.918	1.918	3.771	3.501	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.589	4.496	2.726	2.726	-	-	7.543	6.855	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.281	4.213	1.868	1.868	2.242	2.242	-	-	7.555	6.855	7.435/6.756

Peptid 26:

Sequenz: YPNQ
 Molmasse: 519.45 g/mol
 Ausbeute: 11.8 mg (45%) (Prolin-*cis/trans* Gemisch (1:4))
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 520.5[M+H], 542.4 [M+Na], 558.4 [M+K]

NMR-Charakterisierung:

Isomer 1:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁷ Tyr	-	4.420	2.915	3.160	-	-	6.805	-	7.146	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.398	2.217	2.217	1.890	1.890	3.659	3.325	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.532	4.568	2.770	2.770	-	-	7.414	6.756	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.259	4.205	2.025	1.840	2.256	2.256	-	-	7.548	6.863	7.580/7.044

Isomer 2:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁷ Tyr	-	4.420	2.915	3.160	-	-	6.805	-	7.146	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.398	2.217	2.217	1.890	1.890	3.659	3.325	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.547	4.628	2.660	2.660	-	-	7.414	6.756	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.428	4.216	1.889	1.889	2.260	2.260	-	-	7.548	6.863	7.580/7.044

Peptid 27:

Sequenz: PNQVYY
 Molmasse: 781.87 g/mol
 Ausbeute: 7.8 mg (20%)
 MALDI-TOF-MS [m/z]: 782.6 [M+H], 804.5 [M+Na]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁸ Pro	6.938	4.344	2.393	2.393	1.991	1.991	3.355	3.342	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.794	4.652	2.727	2.727	-	-	7.545	6.879	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.390	4.249	1.879	1.879	2.183	2.183	-	-	7.380	6.777	-
¹⁶¹ Val	8.056	3.922	1.813	-	0.706	0.706	-	-	-	-	-
¹⁶² Tyr	8.023	4.411	2.988	2.759	-	-	7.018	6.739	-	-	-
¹⁶³ Tyr	8.139	4.475	2.835	2.835	-	-	7.053	6.753	-	-	n.d.

n.d.: nicht detektiert.

Peptid 28:

Sequenz:	NQVY
Molmasse:	521.58 g/mol
Ausbeute:	7.0 mg (26%)
MALDI-TOF-MS [m/z]:	522.7 [M+H], 544.7 [M+Na]

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵⁹ Asn	-	4.309	2.903	2.903	-	-	7.618	6.936	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.641	4.330	1.891	1.891	2.186	2.186	-	-	7.391	6.790	-
¹⁶¹ Val	8.169	3.989	1.908	-	0.796	0.796	-	-	-	-	-
¹⁶² Tyr	8.231	4.509	3.007	2.842	-	-	7.104	7.104	6.765	6.765	7.452/6.990

6.6.5 Synthese des Glycopeptids 39

Die Synthese der Glycopeptide erfolgte manuell in einem 50 μ mol Ansatz, für den 55 mg des Rink-Amid-Harzes (Belegung 0.91 μ mol/mg) eingewogen wurden. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte für einige Aminosäuren durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für jeweils 15 Minuten. Für die Aminosäuren, deren Methylenfluorenwerte im Anschluss der Kupplung bestimmt wurden, erfolgte die Abspaltung nach AAV2.

Die Kupplung der natürlichen Aminosäuren erfolgte durch eine dreifache Kupplung für jeweils 30 min, in der die zu kuppelnde Aminosäure (0.5 M in DMF) mit einem vierfachen und TBTU (0.5 M in DMF) sowie DIPEA (1.0 M in DMF) in einem fünffachen Überschuss eingesetzt wurde.

Für die Kupplung des Chitobiosylasparaginbausteins wurde ein 1.2-facher Überschuss des Bausteins verwendet und die Kupplungslösung über einen Zeitraum von 12 Stunden geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Um den Erfolg der Kupplung des Chitobiosylasparaginbausteins zu überprüfen, wurde die Menge des abgespaltenen Methylenfluorens für die Kupplung des Chitobiosylasparaginbausteins und zusätzlich für die C- und N-terminal gelegenen Aminosäuren bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tabelle 23: Auflistung der Kupplungsausbeuten einiger Aminosäurekupplungen für die Synthese des Glycopeptids 39.

gekuppelte Aminosäure	n _{Fmoc} [μ mol]	Ausbeute [%]
Asparagin Position 159	30	60
Asn(LinkChi)	3.6	7
Asparagin Position 153	1.55	3

Das Blockieren nicht umgesetzter Bindungsstellen erfolgte durch zweimaliges Versetzen mit 2 mL 10% (v/v) Acetanhydrid in DMF über eine Zeitspanne von zehn Minuten. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF gewaschen. Die Abspaltung der *O*-Acetylgruppen des Chitobioseoctaacetat erfolgte durch das Versetzen des Harzes mit Hydrazinhydrat in trockenem Methanol (1:5) für sechs Stunden unter Schutzgas. Im Anschluss wurde das Harz mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Im Anschluss wurde das Peptid nach AAV3 vom Harz abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV4 gereinigt. Die Charakterisierung erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und NMR-Spektroskopie nach AAV5.

Peptid 39:

Sequenz:	NMHRYN(LinkChi)NQ
Molmasse:	1679.84 g/mol
Ausbeute:	0.83 mg (1%) Methionin liegt als Sulfoxid vor.
MALDI-TOF-MS [m/z]:	1689.0 [M+H]
Reinheit:	97% (HPLC)

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.266	2.907	2.097	-	-	6.971	7.618	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.815	4.456	2.157	2.049	2.865	2.865	-	-	2.648	-	-
¹⁵⁵ His	8.635	4.542	3.048	3.048	-	-	7.034	-	8.520	-	-
¹⁵⁶ Arg	8.312	4.241	1.619	1.619	1.447	1.447	3.081	3.081	7.075	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.310	4.520	2.944	2.823	-	-	6.754	-	7.078	-	-
¹⁵⁸ Asn	8.369	4.606	2.608	2.716	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.333	4.241	2.747	2.747	-	-	6.824	7.514	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.258	4.219	2.050	1.920	2.285	2.285	-	-	6.776	7.445	7.516/7.035
Link 1	7.927	2.148	1.490	1.395	3.081	7.927	2.148	1.490	1.395	-	-
Link 2	7.857	2.200	1.362	1.478	3.060	7.857	2.200	1.362	1.478	-	-

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a	6b
GlcNAc	8.439	8.174	4.993	3.576	3.503	3.694	3.591	3.769	3.769
GlcNAc'	-	8.302	4.521	3.510	3.412	3.433	3.668	3.714	3.714

6.6.6 Synthese des Glycopeptids 40

Die Synthese der Glycopeptide erfolgte ebenfalls manuell in einem 50 μmol Ansatz. Es wurden 55 mg des Rink-Amid-Harzes (Belegung 0.91 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) eingewogen. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für jeweils 15 Minuten

Die Kupplung der natürlichen Aminosäuren erfolgte durch eine dreifache Kupplung für jeweils 30 min, in der die zu kuppelnde Aminosäure (0.5 M in DMF) mit einem vierfachen und TBTU (0.5 M in DMF) sowie DIPEA (1.0 M in DMF) in einem fünffachen Überschuss eingesetzt wurde. Für die Kupplung des Chitobiosylasparaginbausteins wurde ein 1.2-facher Überschuss des Bausteins verwendet und die Kupplungslösung über einen Zeitraum von 12 Stunden geschüttelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Das Blockieren nicht umgesetzter Bindungsstellen erfolgte durch zweimaliges Versetzen mit 2 mL 10% (v/v) Acetanhydrid in DMF über eine Zeitspanne von zehn Minuten. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF gewaschen. Die Abspaltung der *O*-Acetylgruppen des Chitobioseoctaacetat erfolgte durch das Versetzen des Harzes mit Hydrazinhydrat in trockenem Methanol (1:5) für sechs Stunden unter Schutzgas. Das Harz wurde das Harz mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Im Anschluss wurde das Peptid nach AAV3 vom Harz abgespalten und das erhaltene Rohprodukt nach AAV4 gereinigt. Die Charakterisierung erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und NMR nach AAV5.

Peptid 40:

Sequenz:	NMHN(LinkChi)YPNQ
Molmasse:	1620.77 g/mol
Ausbeute nach Fmoc:	9.5 μ mol (19%)
Ausbeute:	7.6 mg (9%)
MALDI-TOF-MS [m/z]:	1621.7 [M+H], 1643.6 [M+Na], 1659.6 [M+K].
Reinheit:	96% (HPLC)

NMR-Charakterisierung:

	NH	H α , α'	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	ϵ'	CONH ₂
¹⁵³ Asn	-	4.481	2.840	2.840	-	-	7.601	6.965	-	-	-
¹⁵⁴ Met	8.687	4.361	1.928	1.928	2.439	2.439	-	-	1.911	-	-
¹⁵⁵ His	8.494	4.542	3.000	3.000	-	-	8.519	-	7.084	-	-
¹⁵⁶ Asn	8.033	4.761	3.040	2.779	-	-	-	-	-	-	-
¹⁵⁷ Tyr	8.584	4.552	2.777	2.641	-	-	7.160	6.823	-	-	-
¹⁵⁸ Pro	-	4.426	2.254	2.254	1.945	1.945	3.767	3.616	-	-	-
¹⁵⁹ Asn	8.524	4.581	2.780	2.780	-	-	7.555	6.868	-	-	-
¹⁶⁰ Gln	8.279	4.602	2.517	2.517	2.563	2.563	-	-	7.546	7.044	7.575/7.049
Link 1	8.406	2.059	1.861	1.861	2.360	2.360	4.281	4.281	-	-	-
Link 2	8.244	2.100	1.881	1.881	2.398	2.398	4.312	4.312	-	-	-

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a	6b
GlcNAc	8.437	8.174	4.982	3.559	3.214	3.702	3.520	3.762	3.759
GlcNAc'	-	8.298	4.518	3.497	3.353	3.417	3.354	3.682	3.682

6.7 SPR-Bindungsstudien

6.7.1 Immobilisierung des Prionproteins auf dem Messchip

Die SPR-Experimente erfolgten an einem Biacore 3000 Gerät der Firma Biacore. Für die Messungen wurde der kommerziell erhältliche Puffer HBS-N (pH 7.4) der Firma Biacore verwendet, der vor der Messung 15 Minuten im Vakuum und Ultraschall entgast wurde. Als Messchip diente der kommerziell erhältliche CM5-Chip der Firma Biacore, der auf seiner Oberfläche eine Dextranmatrix trägt. Der Messchip besitzt vier Flusszellen, für die pro Messreihe nur zwei benötigt wurden, so dass ein Messchip für zwei Messreihen zur Verfügung stand.

Für die Messungen wurde das Prionprotein (hPrP(90-230), hPrP(90-230)-His-Tag) kovalent an die Oberfläche des Messchips gebunden. Hierzu wurde zunächst für sieben

Minuten eine Lösung aus EDC/NHS 1:1 mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ in zwei der vier Flusszellen über Chipoberfläche geleitet, um diese zu aktivieren.

Für die Immobilisierung des Prionproteins wurde die Proteinstammlösung in Natriumacetatpuffer (pH 4.0) auf eine Konzentration von 1 μM verdünnt. Von dieser Lösung wurden 3 μL mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ mittels des *manual inject* Befehls über die Messzelle geleitet, so dass zwischen 100 und 300 fmol des Proteins immobilisiert wurden. Das Blockieren der nicht umgesetzten Bindungsstellen auf der Messzelle und der Referenzzelle erfolgte durch die Injektion von Ethanolamin ($c = 1 \text{ M}$) für sieben Minuten bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Da die Messungen der Peptide in mehreren Etappen erfolgte, sind in der Tabelle 24 die Belegungen der verwendeten Chips und die hiermit gemessenen Peptide zusammengefasst.

Tabelle 24: Übersicht über die Belegung der verwendeten Chips und die vermessenen Peptide. Die Flusszellen geben an, welche der vier Flusszellen für die Messreihe verwendet wurde.

Chip (Flusszellen)	Belegung [fmol]	vermessene Peptide
1 (1+2)	101	1, 2, 4-7, 14-15,
1 (3+4)	198	10-13, 16, 17, 20-22
2 (1+2)	404	3, 6, 8, 9
2 (3+4)	244	23-26, Chitobiose
3 (1+2)	366	27, 28, 40
3 (3+4)	331	39

6.7.2 Aufnahme der Konzentrationsreihen

Die Aufnahme der Konzentrationsreihen erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen HSB-N Puffer (pH 7.4) der Firma Biacore. Die im Puffer gelösten Peptide wurden über den Befehl *Quickinjekt* injiziert und für 300 s mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ über den Messchip geleitet. Nach beendeter Injektion wurde über einen Zeitraum von 300 s die Dissoziation des Liganden ermöglicht. Da im Regelfall die Basislinie innerhalb dieser Zeit erreicht wurde, konnte auf eine Regeneration der Messzelle verzichtet werden. Die vermessenen Konzentrationen der einzelnen Peptide sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

Tabelle 25: Übersicht über die per SPR vermessenen Konzentrationen der Peptide und der Chitobiose.

Ligand	vermessene Konzentrationen [μM]
1	5, 10, 25, 100
2	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500
3	50, 100, 150, 250, 500, 600, 750, 1000
4	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500
5	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500
6	50, 100, 150, 250, 500, 600, 750, 1000
7	50, 100, 250, 500, 750
8	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500
9	25, 50, 100, 250, 500
10	50, 100, 150, 250, 500, 600, 750, 1000
11	5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500
12	25, 50, 100, 250, 350, 500, 600
13	50, 100, 250, 350, 500, 600
14	10, 25, 50, 100, 250, 500, 750
15	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750
16	25, 50, 100, 250, 350, 500, 600
17	250, 300, 350, 500, 600, 750, 1000
20	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500
21	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500
22	25, 50, 100, 250, 500
23	5, 10, 25, 50, 100, 250, 350, 500, 750
24	5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500, 562
25	10, 25, 50, 100, 200, 300, 500, 750
26	25, 50, 100, 200, 300, 500, 750
27	nicht vollständig löslich
28	50, 75, 100, 250, 300, 350, 400
29	5, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000
39	25, 40, 50, 100, 200, 400
40	10, 25, 50, 100, 150, 250

6.8 Molecular docking

Die *molecular docking* Studien wurden mit der Software Sybyl 7.5 und dem darin implementierten Programm FlexiDockTM durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde mit der von Zahn *et al.* per NMR-aufgeklärten Proteinstruktur (PDB: 1qm2) gearbeitet, die den gesamten globulären Teil des Proteins umfasst. Diese wurde auf Fehler überprüft im Anschluss mit Ladungen des Typs Gasteiger-Hückel versehen und die

Struktur über 300 Iterationen energetisch minimiert.^{194;207} Die Parameter der Minimierung sind in Tabelle 26 gezeigt.

Tabelle 26: Parameter der energetischen Minimierung des Prionproteinmodells (PDB-Eintrag 1qm2).

<i>Method</i>	<i>Powell</i>
<i>Force Field</i>	Tripos
<i>Charge</i>	Gasteiger-Hückel
<i>Dielectric Function</i>	<i>constant</i>
<i>Dielectric Constant</i>	20
<i>NB-Cutoff</i>	8
<i>H-Bondradius Scaling</i>	0.7
<i>maximum Iterations</i>	300
<i>energy before minimize</i>	+1007.3 kcal/mol
<i>energy after minimize</i>	-114.5 kcal/mol

Die Struktur der Chitobiose wurde ebenfalls mit der Software Sybyl 7.5 erstellt und über 50 Iterationen mit den Parametern der Tabelle 26 energetisch minimiert, so dass die Energie +12.8 kcal/mol betrug.

Das Peptid ¹⁵³NMHRYPNQ¹⁶⁰ wurde über die *build polymer* Funktion in einer *random* Konformation erstellt, in welcher der N-Terminus positiv geladen und der C-Terminus als Säureamid vorlag. Dieses Peptid wurde einer Moleküldynamikrechnung (MD) unterzogen, deren Parameter in Tabelle 27 aufgelistet sind und anschließend mit den Parametern aus Tabelle 26 über 100 Iterationen minimiert.

Tabelle 27: Parameter der Moleküldynamikrechnung (MD).

<i>Time Stepp</i>	1 fs
<i>Interval length</i>	100000 fs
Temperatur	300 K
<i>data write frequency</i>	100 fs
<i>Force Field</i>	Tripos
<i>Charge</i>	Gasteiger-Hückel
<i>Dielectric Function</i>	<i>constant</i>
<i>Dielectric Constant</i>	1
<i>energy before MD</i>	+632.8 kcal/mol
<i>energy after MD</i>	+42.8 kcal/mol

Für das Docking der Chitobiose und des Peptids NMHRYPNQ wurde der Ligand in der Nähe der Bindungsstelle vorpositioniert, wobei darauf geachtet wurde, dass die experimentell erhaltenen Bindungsepitope eingehalten wurden. Mittels der in Sybyl 7.5 implementierten Software FlexiDockTM wurde die Lage und Konformation der Aminosäuren von Ligand und

Rezeptor im Bereich der Bindungsregion über 300000 Generationen optimiert. Die Bindungsregion wurde als 3 Å-Umkreis um den Liganden definiert. Die Energie wurde nach Gleichung 18 berechnet.

$$E_{\text{Bindung}} = E_{\text{Komplex}} - (E_{\text{Ligand}} + E_{\text{Protein}})$$

Gleichung 18: Berechnung der Bindungsenergie des gedockten Liganden (E_{Bindung}). Mit E_{Komplex} = berechnete Energie des Proteinligandkomplexes, E_{Ligand} = ermittelte Energie des Liganden, E_{Protein} = ermittelte Energie des Proteins.

6.9 Aggregationsassays und CD-Spektroskopie

6.9.1 Oxidativer Aggregationsassay

Der oxidative Aggregationsassay wurde sowohl mit dem hPrP(90-230) als auch mit dem hPrP(90-230)-His-Tag unter den Bedingungen von Redecke *et al.* durchgeführt.¹⁰⁰

Das Prionprotein wurde zunächst durch Zentrifugationsfilter (MWCO = 10 kDa) auf 5 mg/mL (0.3 mM) aufkonzentriert und diese Stammlösung 45 Minuten bei 4 °C und 16200 g zentrifugiert, um gebildete Aggregate und ausgefallenes Protein abzutrennen. Aus dem Überstand wurden pro Probenansatz 42 µL abgenommen.

Die Konzentration der Peptidstammlösung betrug 5 mM des Peptids, gelöst in 5 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0). Von dieser Stammlösung wurden 18 µL abgenommen und zu den 42 µL der Proteinslösung pipettiert. Die finale Konzentration des Proteins betrug damit 210 µM, die des Peptids 1500 µM. Die peptidfreien Kontrollproben wurden mit 18 µL Natriumacetatpuffer (pH 5.0) auf das Endvolumen von 60 µL aufgefüllt.

Die Peptidproben wurden daraufhin, ebenso wie die Positivkontrollproben, mit einem Kupferplättchen, das eine Masse zwischen 15 mg und 20 mg aufwies, versehen und für 180 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, während die Negativkontrollprobe nicht mit Kupfer versetzt und bei 4 °C gelagert wurde. Im Anschluss wurde das Kupferplättchen entfernt und die Lösung für 45 Minuten bei 4 °C und 16200 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die obersten 20 µL abgenommen und für die Proteinbestimmung verwandt. Jedes Peptid wurde, ebenso wie die Kontrollproben, in drei parallelen Ansätzen getestet, um Fehler bei der Probenpräparation herauszumitteln.

Die Proteinkonzentration der Proben des Aggregationsassays wurde mit Hilfe eines Bradford-Assays bestimmt.¹⁹⁷ Hierzu wurden aus den 20 µL der Proben, die aus dem Assay erhalten wurden, 5-, 10- und 20-fache Verdünnungen mit einem Probenvolumen von 30 µL angesetzt. Aus den Verdünnungen wurden jeweils 10 µL in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und mit 250 µL des Bradfordreagenzes (*Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce*) gemischt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch, in dem die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gemessen wurde. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden

gegen Lysozym und bovines Serumalbumin (BSA) kalibriert und die Proteinmenge der einzelnen Proben mit denen der Negativkontrolle verglichen.

6.9.2 Nichtoxidativer Aggregationsassay

Der nicht oxidative Aggregationsassay wurde entsprechend den Bedingungen von Baskakov *et al.* durchgeführt.^{91;208} Hierzu wurde das Prionprotein mit Hilfe eines Zentrifugationsfilter (MWCO = 10 kDa) zunächst auf eine Konzentration von 6 mg/mL (0.4 mM) konzentriert und zeitgleich der Natriumacetatpuffer gegen eine 6 M GuHCl-Lösung ausgetauscht.

Für den Konversionsassay wurden 83 μ L des Prionproteins mit 32 μ L Wasser, 250 μ L einer 4.8 M Harnstofflösung und jeweils 50 μ L einer Natriumchloridlösung ($c = 1.5$ M) und eines zehnfachkonzentrierten PBS-Puffers versetzt. Für die Peptidproben wurden zusätzlich noch 35 μ L der Peptidstammlösung ($c = 1.5$ mM) hinzugegeben, während die peptidfreien Proben mit 35 μ L Wasser aufgefüllt wurden. Die Proben wurden daraufhin für 5 Tage bei 37 °C und 600 rpm inkubiert.

Für den fluoreszenzspektroskopischen Nachweis der Fibrillen wurden 12 μ L aus den Probengefäß abgenommen und mit 400 μ L einer Thioflavin T Lösung ($c = 50$ μ M) versetzt. Die resultierende Lösung wurde dann mit 1588 μ L Natriumacetatpuffer (5 mM, pH 5.5) auf das Endvolumen aufgefüllt, so dass die Proteinkonzentration auf 0.3 μ M verdünnt wurde. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit wurden die Proben bei einer Extinktion von $\lambda = 450$ nm angeregt und die Emissionsspektren in einem Bereich von 460-600 nm detektiert.

6.9.3 Circular Dichroismus (CD) Messungen

Die Messungen der CD-Spektren erfolgten an einem JASCO J-810 Polarispektrometer in einer 100 μ L-Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm.

Die Proteinproben, die aus den Aggregationsassays erhalten wurden, wurden mit Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 5.0) um den Faktor 12.5 verdünnt, so dass die Proteinkonzentration 16.8 μ M und die Peptidkonzentration 120 μ M betrug. Die Konzentration der Peptide in den proteinfreien Proben betrug 250 μ M in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0).

Die Messungen erfolgten in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 190$ -250 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min und einem Intervall von 1 nm.

Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mit den Programmen *K2D2* und *CDtool*.^{182;198}

7 Toxikologie

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
2-Aminoethanol	Xn	20-36/37/38	-
5-Aminopentansäure	-	-	-
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	-
Ammoniumsulfat	-	-	-
Calciumchlorid	Xi	36	22-24
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Deuteriumoxid	-	-	-
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F ⁺ , Xn	12-19-22-66-67	2-9-16-29-33
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Xn	22-36/37/38	26-36
<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -propylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
<i>N,N'</i> -Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid	C	20/21/22-34-42/43	26-36/37/39-45
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Essigsäure- <i>d4</i>	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F; Xi	11-36-66-67	2-16-26-33
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	-
Fmoc-Aminosäuren	-	-	22-24/25
Glycin	-	-	24/25
Harnstoff	-	-	-
Hydrazinhydrat	T, N	45-10-23/24/25-34-43-50/53	53-45-60-61
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	-	-	24/25
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Isopropyl- β -D-thiogalactosid	-	-	-
Magnesiumsulfat	-	-	-
Methanol (MeOH)	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Natrium	F, C	14/15-34	(1/2)5*-8-43-45
Natriumacetat	-	-	24/25
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumcitrat	-	-	25

Natriumchlorid	-	-	-
Dinatriumhydrogenphosphat	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat	-	-	-
Natriumdodecylsulfat	Xn	22-36/38	26-36
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriummethanolat	C, T	11-23/24/25-34-39	7-16-36/37/39-45
Natriumsulfat	-	-	-
Ni-NTA Agarose	Xn	10-22-40-42/43	13-26-36-46
Piperidin	F,T	11-23/24-34	16-26-27-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
TBTU	Xi	36/37/38	26-36
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Tri- <i>iso</i> -propylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36
Trypton	-	-	-

8 Anhang

8.1 Proteinsequenzen

8.1.1 Proteinsequenz hPrP(90-230)

⁹⁰GQGGGTHSQW NKPSKPKTNM KHMAGAAAAG AVVGGLGGYM LGSAMSRPII HFGSDYEDRY
YRENMHRYPN QVYYRPMDEY SNQNNFVHDC VNITIKQHTV TTTTKGENFT ETDVKMMERV
VEQMCITQYK RESQAYYQRG S²³⁰

8.1.2 Proteinsequenz hPrP(90-230)-His-Tag

MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWGS ⁹⁰GQGGGTHSQW NKPSKPKTNM
KHMAGAAAAG AVVGGLGGYM LGSAMSRPII HFGSDYEDRY YRENMHRYPN QVYYRPMDEY
SNQNNFVHDC VNITIKQHTV TTTTKGENFT ETDVKMMERV VEQMCITQYK RESQAYYQRG S²³⁰

8.1.3 Proteinsequenz hPrP(121-230)-His-Tag

MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWGS ¹²¹VVGGLGGYM LGSAMSRPII
HFGSDYEDRY YRENMHRYPN QVYYRPMDEY SNQNNFVHDC VNITIKQHTV TTTTKGENFT
ETDVKMMERV VEQMCITQYK RESQAYYQRG S²³⁰

8.2 NMR-Pulsprogramme

hsqcetf3gp (¹H, ¹⁵N-HSQC-Pulsprogramm)

```
;avance-version (07/04/04)
;HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;using f3 - channel
;
;Davis et al., J. Magn. Reson. 98, 207 - (1992)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

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

```

#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d13=4u"
"d26=1s/(cnst4*4)"

"d0=3u"

"in0=infl/2"

"DELTA1=d26-p16-d13-4u"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA=p16+d16+larger(p2,p14)+d0*2"
# else
"DELTA=p16+d16+p2+d0*2"
# endif /*LABEL_CN*/

1 ze
  d11 p16:f3
2 d1 do:f3
3 (p1 ph1)
  d26 p13:f3
  (center (p2 ph1) (p22 ph6):f3 )
  d26 UNBLKGRAD
  p28 ph1
  d13
  (p1 ph2)
  3u
  p16:gp1
  d16
  (p21 ph3):f3
  d0

# ifdef LABEL_CN
  (center (p2 ph5) (p14:sp3 ph1):f2 )
# else
  (p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/

d0

```

```

p16:gp2*EA
d16
(p22 ph4):f3
DELTA
(ralign (p1 ph1) (p21 ph4):f3 )
d26
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
d13
p16:gp3
DELTA1 p16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2
  F1EA(igrad EA, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

```

```

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

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (adiabatic)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion (adiabatic)
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d26: 1/(4J(YH))
;cnst4: = J(YH)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)

```



```

;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2 : gp 3
;                       50 : 80 : 20.1   for C-13
;                       50 : 80 : 8.1    for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100

;preprocessor-flags-start
;LABEL_CN: for C-13 and N-15 labeled samples start experiment with
;          option -DLABEL_CN (eda: ZGOPTNS)
;preprocessor-flags-end

;$Id: hsqcetf3gp,v 1.4 2007/04/11 13:34:30 ber Exp $

```

std.t4_3.bc (STD-Pulsprogramm mit Spinlockfilter)

```

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

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

```

"d12=20u"

"p29=d29"

"l5=d20/p13+0.5"

"d31=p13*15"

"DELTA1=d1-d31"

1 ze

10u st0

2 30m

4u BLKGRAD

d12 fq2:f2 st

50u UNBLKGRAD

4u pl10:f1

(p17 ph2)

(p17*2 ph3)

4u

p30:gp1

10m pl1:f1

4u BLKGRAD

DELTA1

3 (p13:sp13 ph4):f2

4u

lo to 3 times l5

p1 ph1

4u pl29:f1

(p29 ph21)

50u UNBLKGRAD

p16:gp2

d16 pl18:f1

p28*0.23077 ph5

d19*2

p28*0.69231 ph5

d19*2

p28*1.46154 ph5

d19*2
p28*1.46154 ph6
d19*2
p28*0.69231 ph6
d19*2
p0*0.23077 ph6
46u
p16:gp2
d16
go=2 ph31
30m wr #0 if #0
4u BLKGRAD
d31
exit

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

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default) [120 dB]
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p129: f1 channel - power level as for TOCSY-spinlock
;sp13: f2 channel - shaped pulse for saturation [35 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - high power pulse
;p13: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p29: f1 channel - trim pulse
;p30: gradient pulse [5 msec]
;d1 : relaxation delay: 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d20: saturation time
;d29: spinlock time [10 - 50 msec]
;d31: saturation time as executed
;l5: loop for saturation: (p11 + d20) * 15 = saturation time
;NS: 16 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 16
;gp1: gradient for spinlock
;gp2: gradient for watersuppression

```

;define FQ2LIST (irradiation frequencies, alternating on/off resonance)
;      (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/fl")

;use gradient ratio:  gp 1
;      40

;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: 20%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;$Id: $

```

std19sp2d_2.bc (STD-Pulsprogramm ohne Spinlockfilter)

```

;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list
;using different memory buffers for on- and off-resonance irradiation
;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters
;define 1H on channel f2 in edasp

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

1 ze
  10u st0
2 20u p11:f1
  d7 fq1:f2 st
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times l7
  p1 ph1
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p118: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
30m wr #0 if #0
exit

ph1=0 2
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*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
;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 p118
;          use for fine adjustment
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if necessary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped 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) * 17 (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.
;NBL = number of memory buffers with TD size = 2 for two irradiation frequencies
;td1 = NBL = 2
;this pulse program produces a ser file (PARMOD = 2D)
;NS" = NS*2+DS"
;DS" = DS/2
;use gradient ratio  gp1 : gp2
;                   20  20
```

9 Literaturverzeichnis

1. Creutzfeldt, H. G. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesamte Neurol. und Psychiatrie* **57**, 1-18 (1920).
2. Jakob, A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische pseudosklerose — Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden.). *Z. Gesamte Neurol. Psychiatrie* **64**, 147-228 (1921).
3. Ironside, J.W. Prion diseases in man. *J Pathol* **186**, 227-34 (1998).
4. Goodfield, J. Cannibalism and kuru. *Nature* **387**, 841 (1997).
5. Prusiner, S.B. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-83 (1998).
6. Whitfield, J.T., Pako, W.H., Collinge, J., and Alpers, M.P. Mortuary rites of the South Fore and kuru. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 3721-4 (2008).
7. Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol* **3**, 11-40 (2008).
8. Porter, D.D., Porter, H.G., and Cox, N.A. Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol* **111**, 1407-10 (1973).
9. Aguzzi, A., Montrasio, F., and Kaeser, P.S. Prions: health scare and biological challenge. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 118-26 (2001).
10. Mabbott, N.A. and MacPherson, G.G. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4**, 201-11 (2006).
11. Mabbott, N.A. and Bruce, M.E. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol* **82**, 2307-18 (2001).
12. Gibbs, C.J. Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M. and Matthews, W.B. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**, 388-9 (1968).
13. Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., and Alpers, M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**, 794-6 (1966).
14. Brown, P., Preece, M., Brandel, J.P., Sato, T., McShane, L., Zerr, I., Fletcher, A., Will, R.G., Pocchiari, M., Cashman, N.R., d'Aignaux, J.H., Cervenakova, L., Fradkin, J., Schonberger, L.B., Collins, S.J. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* **55**, 1075-81 (2000).

15. Hope, J., Reekie, L.J., Hunter, N., Multhaup, G., Beyreuther, K., White, H., Scott, A.C., Stack, M.J., Dawson, M., Wells, G.A. Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* **336**, 390-2 (1988).
16. Morgan, K.L. Bovine spongiform encephalopathy: time to take scrapie seriously. *Vet Rec* **122**, 445-6 (1988).
17. Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., and Atkinson, M.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* **128**, 199-203 (1991).
18. Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-5 (1996).
19. Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C. J. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501 (1997).
20. Will, R.G., Zeidler, M., Stewart, G.E., Macleod, M.A., Ironside, J.W., Cousens, S.N., Mackenzie, J., Estibeiro, K., Green, A.J., Knight, R.S. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **47**, 575-82 (2000).
21. Fasano, C., Campana, V., and Zurzolo, C. Prions: protein only or something more? Overview of potential prion cofactors. *J Mol Neurosci* **29**, 195-214 (2006).
22. Mestel, R. Putting prions to the test. *Science* **273**, 184-9 (1996).
23. Narang, H. A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp Biol Med* **227**, 4-19 (2002).
24. Soto, C. and Castilla, J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med* **10 Suppl**, 63-7 (2004).
25. Ledford, H. Virus paper reignites prion spat. *Nature* **445**, 575 (2007).
26. Narang, H.K. Virus-like particles in natural scrapie of the sheep. *Res Vet Sci* **14**, 108-10 (1973).
27. Cho, H.J. Is the scrapie agent a virus? *Nature* **262**, 411-2 (1976).
28. Manuelidis, L., Yu, Z.X., Barquero, N., and Mullins, B. Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1965-70 (2007).

29. Manuelidis, L. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem* **100**, 897-915 (2007).
30. Griffith, J.S. Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-4 (1967).
31. Prusiner, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-44 (1982).
32. Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-6 (1967).
33. Bellinger-Kawahara, C., Diener, T.O., McKinley, M.P., Groth, D.F., Smith, D.R., Prusiner, S.B. Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology* **160**, 271-4 (1987).
34. Bellinger-Kawahara, C., Cleaver, J.E., Diener, T.O., and Prusiner, S.B. Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation. *J Virol* **61**, 159-66 (1987).
35. Alper, T., Haig, D.A., and Clarke, M.C. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 278-84 (1966).
36. Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-11 (1982).
37. Enari, M., Flechsig, E., and Weissmann, C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9295-9 (2001).
38. Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D., and Prusiner, S.B. Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6617-21 (1988).
39. Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R., Prusiner, S. B. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**, 739-43 (2001).
40. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-47 (1993).
41. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-82 (1992).

42. Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**, 967-8 (1994).
43. Kimberlin, R.H. and Walker, C.A. Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol* **89**, 551-62 (1979).
44. Farquhar, C.F., Dornan, J., Somerville, R.A., Tunstall, A.M., and Hope, J. Effect of Sinc genotype, agent isolate and route of infection on the accumulation of protease-resistant PrP in non-central nervous system tissues during the development of murine scrapie. *J Gen Virol* **75**, 495-504 (1994).
45. Brown, K.L., Stewart, K., Ritchie, D.L., Mabbott, N.A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W.I., Bruce, M.E. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1308-12 (1999).
46. Heggebo, R., Press, C.M., Gunnes, G., Lie, K.I., Tranulis, M.A., Ulvund, M., Groschup, M.H., Landsverk, T. Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* **81**, 2327-37 (2000).
47. Beekes, M. and McBride, P.A. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* **278**, 181-4 (2000).
48. Mabbott, N.A., Williams, A., Farquhar, C.F., Pasparakis, M., Kollias, G., Bruce, M.E. Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol* **74**, 3338-44 (2000).
49. Cobb, N.J. and Surewicz, W.K. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* **48**, 2574-85 (2009).
50. Sigurdson, C.J., Williams, E.S., Miller, M.W., Spraker, T.R., O'Rourke, K.I., Hoover, E.A. Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* **80**, 2757-64 (1999).
51. Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-3 (1985).
52. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B., Weissmann, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-46 (1985).

53. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., Weissmann, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-28 (1986).
54. Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-40 (1987).
55. Baldwin, M.A. Analysis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors: the prion protein. *Methods Enzymol* **405**, 172-87 (2005).
56. Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kasczak, R.J., Bolton, D.C., Bendheim, P.E. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**, 185-92 (1990).
57. Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., and DeArmond, S.J. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**, 1-5 (1986).
58. Burthem, J., Urban, B., Pain, A., and Roberts, D.J. The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood* **98**, 3733-8 (2001).
59. Moser, M., Colello, R.J., Pott, U., and Oesch, B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-17 (1995).
60. Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., Caughey, W.S. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-80 (1991).
61. Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10962-6 (1993).
62. Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., and Cohen, F.E. Prion protein biology. *Cell* **93**, 337-48 (1998).
63. Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K., Yee, V.C. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol* **8**, 770-4 (2001).
64. Antonyuk, S.V., Trevitt, C.R., Strange, R.W., Jackson, G.S., Sangar, D., Batchelor, M., Cooper, S., Fraser, C., Jones, S., Georgiou, T., Khalili-Shirazi, A., Clarke, A.R., Hasnain, S.S., Collinge, J. Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2554-8 (2009).
65. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M.,

- Calzolari, L., Wider, G., Wuthrich, K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 145-50 (2000).
66. Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C.M., Lario, P., Avdievich, N.I., Antholine, W.E., Olmstead, M.M., Vrielink, A., Gerfen, G.J., Peisach, J., Scott, W.G., Millhauser, G.L. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* **41**, 3991-4001 (2002).
67. Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., Dyson, H.J. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2042-7 (1999).
68. Brazier, M.W., Davies, P., Player, E., Marken, F., Viles, J.H., Brown, D.R. Manganese binding to the prion protein. *J Biol Chem* **283**, 12831-9 (2008).
69. Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S.B., Antholine, W.E., Gerfen, G.J., Peisach, J., Millhauser, G.L. Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* **42**, 6794-803 (2003).
70. Aronoff-Spencer, E., Burns, C.S., Avdievich, N.I., Gerfen, G.J., Peisach, J., Antholine, W.E., Ball, H.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Millhauser, G.L. Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 13760-71 (2000).
71. Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-7 (1997).
72. Pauly, P.C. and Harris, D.A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**, 33107-10 (1998).
73. Singh, A., Mohan, M.L., Isaac, A.O., Luo, X., Petrak, J., Vyoral, D., Singh, N. Prion protein modulates cellular iron uptake: a novel function with implications for prion disease pathogenesis. *PLoS ONE* **4**, e4468 (2009).
74. Brown, D.R. and Besinger, A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* **334**, 423-9 (1998).
75. Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J., Jones, I.M. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* **344**, 1-5 (1999).

76. Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., Aguzzi, A., Firestein, S. Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* **12**, 60-9 (2009).
77. Apetri, A.C. and Surewicz, W.K. Atypical effect of salts on the thermodynamic stability of human prion protein. *J Biol Chem* **278**, 22187-92 (2003).
78. Morrissey, M.P. and Shakhnovich, E.I. Evidence for the role of PrP(C) helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11293-8 (1999).
79. Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B., and Kobata, A. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**, 8380-8 (1989).
80. Stimson, E., Hope, J., Chong, A., and Burlingame, A.L. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* **38**, 4885-95 (1999).
81. Wormald, M.R. and Dwek, R.A. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7**, 155-60 (1999).
82. Bosques, C.J. and Imperiali, B. The interplay of glycosylation and disulfide formation influences fibrillization in a prion protein fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7593-8 (2003).
83. Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90 (1995).
84. Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-8 (1993).
85. Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T. Caughey, B. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3923-7 (1995).
86. Kocisko, D.A., Lansbury, P.T. Jr, and Caughey, B. Partial unfolding and refolding of scrapie-associated prion protein: evidence for a critical 16-kDa C-terminal domain. *Biochemistry* **35**, 13434-42 (1996).
87. Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.T., Caughey, B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**, 698-700 (1995).

88. Bessen, R.A., Raymond, G.J., and Caughey, B. In situ formation of protease-resistant prion protein in transmissible spongiform encephalopathy-infected brain slices. *J Biol Chem* **272**, 15227-31 (1997).
89. Hill, A.F., Antoniou, M., and Collinge, J. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* **80**, 11-4 (1999).
90. Torrent, J., Alvarez-Martinez, M.T., Heitz, F., Liautard, J.P., Balny, C., Lange, R. Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry* **42**, 1318-25 (2003).
91. Bocharova, O.V., Breydo, L., Parfenov, A.S., Salnikov, V.V., and Baskakov, I.V. In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J Mol Biol* **346**, 645-59 (2005).
92. Baskakov, I.V., Legname, G., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control. *J Biol Chem* **276**, 19687-90 (2001).
93. Jansen, K., Schafer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S.B., Riesner, D. Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem* **382**, 683-91 (2001).
94. Post, K., Pitschke, M., Schafer, O., Wille, H., Appel, T.R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S.B., Riesner, D. Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem* **379**, 1307-17 (1998).
95. Xiong, L.W., Raymond, L.D., Hayes, S.F., Raymond, G.J., and Caughey, B. Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. *J Neurochem* **79**, 669-78 (2001).
96. Milhavel, O. and Lehmann, S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* **38**, 328-39 (2002).
97. Redecke, L., Binder, S., Elmallah, M.I., Broadbent, R., Tilkorn, C., Schulz, B., May, P., Goos, A., Eich, A., Rubhausen, M., Betzel, C. UV light induced conversion and aggregation of prion proteins. *Free Radic Biol Med* **46**, 1353-61 (2009).
98. Requena, J.R., Dimitrova, M.N., Legname, G., Teijeira, S., Prusiner, S.B., Levine, R.L. Oxidation of methionine residues in the prion protein by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* **432**, 188-95 (2004).
99. Requena, J.R., Groth, D., Legname, G., Stadtman, E.R., Prusiner, S.B., Levine, R.L. Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa(29-231) prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7170-5 (2001).

100. Redecke, L., von Bergen, M., Clos, J., Konarev, P.V., Svergun, D.I., Fittschen, U.E., Broekaert, J.A., Bruns, O., Georgieva, D., Mandelkow, E., Genov, N., Betzel, C. Structural characterization of beta-sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation in vitro. *J Struct Biol* **157**, 308-20 (2007).
101. Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810-3 (2001).
102. Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**, 195-206 (2005).
103. Supattapone, S., Deleault, N.R., and Rees, J.R. Amplification of purified prions in vitro. *Methods Mol Biol* **459**, 117-30 (2008).
104. Weber, P., Giese, A., Piening, N., Mitteregger, G., Thomzig, A., Beekes, M., Kretzschmar, H.A. Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15818-23 (2006).
105. Weissmann, C. and Aguzzi, A. Approaches to therapy of prion diseases. *Annu Rev Med* **56**, 321-44 (2005).
106. Cashman, N.R. and Caughey, B. Prion diseases--close to effective therapy? *Nat Rev Drug Discov* **3**, 874-84 (2004).
107. Brown, P. Drug therapy in human and experimental transmissible spongiform encephalopathy. *Neurology* **58**, 1720-5 (2002).
108. Caughey, B., Ernst, D., and Race, R.E. Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol* **67**, 6270-2 (1993).
109. Demaimay, R., Chesebro, B., and Caughey, B. Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red and other Congo Red analogs. *Arch Virol Suppl* **16** 277-83 (2000).
110. Demaimay, R., Harper, J., Gordon, H., Weaver, D., Chesebro, B., Caughey, B. Structural aspects of Congo red as an inhibitor of protease-resistant prion protein formation. *J Neurochem* **71**, 2534-41 (1998).
111. Farquhar, C., Dickinson, A., and Bruce, M. Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* **353**, 117 (1999).
112. Wong, C., Xiong, L.W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., Caughey, B. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J* **20**, 377-86 (2001).

113. Supattapone, S., Nguyen, H.O., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., and Scott, M.R. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14529-34 (1999).
114. Caughey, W.S., Raymond, L.D., Horiuchi, M., and Caughey, B. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12117-22 (1998).
115. Priola, S.A., Raines, A., and Caughey, W.S. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**, 1503-6 (2000).
116. White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., Hawke, S. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**, 80-3 (2003).
117. Chabry, J., Caughey, B., and Chesebro, B. Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem* **273**, 13203-7 (1998).
118. Horiuchi, M., Baron, G.S., Xiong, L.W., and Caughey, B. Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J Biol Chem* **276**, 15489-97 (2001).
119. Chabry, J., Priola, S.A., Wehrly, K., Nishio, J., Hope, J., Chesebro, B. Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence. *J Virol* **73**, 6245-50 (1999).
120. Ettaiche, M., Pichot, R., Vincent, J.P., and Chabry, J. In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126. *J Biol Chem* **275**, 36487-90 (2000).
121. Lin, M.C., Mirzabekov, T., and Kagan, B.L. Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment. *J Biol Chem* **272**, 44-7 (1997).
122. Soto, C., Kascsak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kascsak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I., Frangione, B. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* **355**, 192-7 (2000).
123. Adessi, C., Halazy, S., Saborio, G., and Soto-Jara, C. Prion-inhibiting peptides and derivatives thereof for the treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *PCT Int Appl* (2003).
124. Chesebro, B.W., Caughey, B.W., Chabry, J., and Priola, S. Sequences of peptide inhibitors for formation of protease resistant prion proteins associated with transmissible spongiform encephalopathies. *U S* (2001).

125. Sklaviadis, T., Panagiotides, C., Paspaltsis, J., and Karageorgis, B. Prion protein-binding peptides, and therapeutic and diagnostic use. *PCT Int Appl* (2004).
126. Soto-Jara, C., Baumann, M.H., and Frangione, B. Peptides and pharmaceutical compositions thereof for treatment of disorders or diseases associated with abnormal protein folding into amyloid or amyloid-like deposits. *U S* (2002).
127. Soto-Jara, C. Peptide analogs and mimetics suitable for in vivo use in the treatment of diseases associated with abnormal protein folding into amyloid, amyloid-like deposits or b-sheet rich pathological precursor thereof. *PCT Int Appl* (2001).
128. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**, 1056-63 (1977).
129. Kullmann, J. Enzymatic peptide synthesis. *CRC Press*, Boca Raton (1987).
130. Merrifield, R.B. Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* **21**, 412 (1962).
131. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **85**, 2149-54 (1963).
132. Carpino, L.A. and Han, G.Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. *J Org Chem* **37**, 3404-9 (1972).
133. Wellings, D.A. and Atherton, E. Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol* **289**, 44-67 (1997).
134. Korr, R., Trzeciak, A., and Bannwarth, W. New Coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **30**, 1927-30 (1989).
135. Reid, G.E. and Simpson, R.J. Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids. *Anal Biochem* **200**, 301-9 (1992).
136. Carpino L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* **115**, 4397-8 (1993).
137. Carpino, L. A., El-Fahama, A., and Albericio, F. Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Letters* **35**, 2279 (1994).

138. Carpino, L.A., Imazumi, H., El-Faham, A., Ferrer, F.J., Zhang, C., Lee, Y., Foxman, B.M., Henklein, P., Hanay, C., Mugge, C., Wenschuh, H., Klose, J., Beyermann, M., Bienert, M. The uronium/guanidinium Peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. *Angew Chem Int Ed* **41**, 441-5 (2002).
139. Pearson, D.A., Blanchette, M., Baker, M.L., and Guindon, C.A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* **30**, 2739-42 (1989).
140. Gamblin, D.P., Scanlan, E.M., and Davis, B.G. Glycoprotein synthesis: an update. *Chem Rev* **109**, 131-63 (2009).
141. Pratt, M.R. and Bertozzi, C.R. Synthetic glycopeptides and glycoproteins as tools for biology. *Chem Soc Rev* **34**, 58-68 (2005).
142. Bodanszky, M. and Kwei, J.Z. Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependence in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides. *Int J Pept Protein Res* **12**, 69-74 (1978).
143. Hackenberger, C.P., O'Reilly, M.K., and Imperiali, B. Improving glycopeptide synthesis: a convenient protocol for the preparation of beta-glycosylamines and the synthesis of glycopeptides. *J Org Chem* **70**, 3574-8 (2005).
144. Baneyx, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-21 (1999).
145. Whittaker, J.W. Selective isotopic labeling of recombinant proteins using amino acid auxotroph strains. *Methods Mol Biol* **389**, 175-88 (2007).
146. Cai, M., Huang, Y., Sakaguchi, K., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Craigie, R. An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in Escherichia coli. *J Biomol NMR* **11**, 97-102 (1998).
147. Venters, R.A., Calderone, T.L., Spicer, L.D., and Fierke, C.A. Uniform ¹³C isotope labeling of proteins with sodium acetate for NMR studies: application to human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **30**, 4491-4 (1991).
148. Muchmore, D.C., McIntosh, L.P., Russell, C.B., Anderson, D.E., and Dahlquist, F.W. Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. *Methods Enzymol* **177**, 44-73 (1989).

149. Pellecchia, M., Bertini, I., Cowburn, D., Dalvit, C., Giralt, E., Jahnke, W., James, T.L., Homans, S.W., Kessler, H., Luchinat, C., Meyer, B., Oschkinat, H., Peng, J., Schwalbe, H., Siegal, G. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 738-45 (2008).
150. Pellecchia, M., Sem, D.S., and Wuthrich, K. NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 211-9 (2002).
151. Meyer, B. and Peters, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed* **42**, 864-90 (2003).
152. Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531-4 (1996).
153. Hajduk, P.J., Augeri, D.J., Mack, J., Mendoza, R., Yang, J., Betz, S.F., Fesik S.W. NMR-based screening of proteins containing ¹³C-labeled methyl groups. *J Am Chem Soc* **122**, 7898-904 (2000).
154. Pellecchia, M., Meininger, D., Dong, Q., Chang, E., Jack, R., Sem, D.S. NMR-based structural characterization of large protein-ligand interactions. *J Biomol NMR* **22**, 165-73 (2002).
155. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* **38**, 1784-8 (1999).
156. Mayer, M. and Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* **123**, 6108-17 (2001).
157. Kalk, A. and Berendsen, H.J.C. Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins. *J Mag Res* **24**, 343-66 (1976).
158. Claasen, B., Axmann, M., Meinecke, R., and Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin alpha(IIb)beta3 in native platelets than in liposomes. *J Am Chem Soc* **127**, 916-9 (2005).
159. Mandell, J.G., Falick, A.M., and Komives, E.A. Measurement of amide hydrogen exchange by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **70**, 3987-95 (1998).
160. Mandell, J.G., Falick, A.M., and Komives, E.A. Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14705-10 (1998).

161. Smith, D.L., Deng, Y., and Zhang, Z. Probing the non-covalent structure of proteins by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **32**, 135-46 (1997).
162. Kipping, M. and Schierhorn, A. Improving hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry by reduction of the back-exchange effect. *J Mass Spectrom* **38**, 271-6 (2003).
163. Turbadar, T. Complete absorption of light by thin metal films. *Proc Phy Soc* **73**, 40-4 (1959).
164. Otto, A. Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmaschwingungen. *Phys Stat Sol* **26**, 99-101 (1968).
165. Kretschmann, E. and Raether H. Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons excited by light. *Z Naturf* **230**, 2135 (1968).
166. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. F. Phys* **216**, 398-400 (1968).
167. Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I., *et al.* Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620-7 (1991).
168. Xing, L., Tjarlund, K., Lindqvist, B., Kaplan, G.G., Feigelstock, D., Cheng, R.H., Casasnovas, J.M. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J* **19**, 1207-16 (2000).
169. Quinn, J.G. *et al.* Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem* **281**, 135-43 (2000).
170. Pattnaik, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl Biochem Biotechnol* **126**, 79-92 (2005).
171. Weimar, T. Neue Trends bei der Verwendung von Biosensoren auf der Basis evaneszierender Wellen. *Angew Chem* **112**, 1271-74 (2000).
172. Karlsson, R. and Stahlberg, R. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal Biochem* **228**, 274-80 (1995).
173. Nieba, L., Krebber, A., and Pluckthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-65 (1996).
174. Ober, R.J. and Ward, E.S. The choice of reference cell in the analysis of kinetic data using BIAcore. *Anal Biochem* **271**, 70-80 (1999).

175. Bulheller, B.M., Rodger, A., and Hirst, J.D. Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* **9**, 2020-35 (2007).
176. Lottspeich, F. and Zorbas, H.H. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (1998).
177. Bodger, A. and Norden, B. Circular Dichroism and Linear Chroism. Oxford University Press, Oxford (1997).
178. Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**, 119-39 (2005).
179. Pelton, J.T. and McLean, L.R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* **277**, 167-76 (2000).
180. Berova, N., Nakanishi, K., and Woody, R.W. Circular Dichroism Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, New York (2000).
181. Fandrich, M. and Dobson, C.M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J* **21**, 5682-90 (2002).
182. Perez-Iratxeta, C. and Andrade-Navarro, M.A. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol* **8**, 25 (2008).
183. Böhm, H.J., Klebe, G., and Kubinyi, H. Wirkstoffdesign. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin 599 (1996).
184. Tripos. FlexiDockTM. Manual (2006).
185. Claasen, B. Synthese und Charakterisierung von peptidischen Liganden des zellulären, humanen Prionproteins: Inhibition der Aggregation des Prionproteins. Dissertation, Universität Hamburg (2005).
186. Zahn, R., von Schroetter, C., and Wuthrich, K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett* **417**, 400-4 (1997).
187. Peters, H. Persönliche Mitteilung. Institut f. Chemie, Universität Lübeck (2006).
188. Jehmlich, N. Persönliche Mitteilung. Umweltforschungszentrum Leipzig (2007).
189. Choudhary, K., Spicer, V.L., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Ens, W., Loewen, P.C., Standing, K.G. Method for estimating the isotopic distributions of metabolically labeled proteins by MALDI-TOFMS: application to NMR samples. *Anal Chem* **78**, 5419-23 (2006).

190. Lu, X., Wintrode, P.L., and Surewicz, W.K. Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1510-5 (2007).
191. Colombo, G., Meli, M., Morra, G., Gabizon, R., and Gasset, M. Methionine sulfoxides on prion protein Helix-3 switch on the alpha-fold destabilization required for conversion. *PLoS ONE* **4**, e4296 (2009).
192. Myszka, D.G., Morton, T.A., Doyle, M.L., and Chaiken, I.M. Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophys Chem* **64**, 127-37 (1997).
193. Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J.K., Lindon, J.C. Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *J Magn Reson* **132**, 125-9 (1998).
194. Gasteiger, J. and Marsili, M. Prediction of proton magnetic resonance shifts: the dependence on hydrogen charges obtained by iterative partial equalization of orbital electronegativity. *Organ Magn Reson* **15**, 353-60 (1981).
195. Gasteiger J. and Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **366**, 3219-22 (1980).
196. Davies, M.J. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* **1703**, 93-109 (2005).
197. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
198. Lees, J.G., Smith, B.R., Wien, F., Miles, A.J., and Wallace, B.A. CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Anal Biochem* **332**, 285-9 (2004).
199. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* **177**, 244-9 (1989).
200. Lau, S.J., Kruck, T.P., and Sarkar, B. A peptide molecule mimicking the copper(II) transport site of human serum albumin. A comparative study between the synthetic site and albumin. *J Biol Chem* **249**, 5878-84 (1974).
201. Canello, T., Engelstein, R., Moshel, O., Xanthopoulos, K., Juanes, M.E., Langeveld, J., Sklaviadis, T., Gasset, M., Gabizon, R. Methionine sulfoxides on PrPSc: a prion-specific covalent signature. *Biochemistry* **47**, 8866-73 (2008).

202. Zemplen, G. Abbau der reduzierenden Biosen, V.: Konstitutions-Ermittlung der Melibiose und der Raffinose. *Ber Dt Chem Ges* **60**, 923-30 (1927).
203. Likkosherstov, L.M., Novikova, V.A., Derevitskaja, N.K., and Kochetkov, N.K. A new simple synthesis of amino sugars beta-D-glycosylamines. *Carbohydr Res* **146**, C1-C5 (1986).
204. Beyermann, M., Bienert, M., Niedrich, H., Carpino, L., and Sadat-Aalae, D. Rapid continuous peptide synthesis via Fmoc amino acid chloride coupling and 4-(aminomethyl)-piperidine deblocking. *J. Org. Chem* **55**, 721-8 (1990).
205. Taraboulos, A., Rogers, M., Borchelt, D.R., McKinley, M.P., Scott, M., Serban, D., Prusiner, S.B. Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8262-6 (1990).
206. Biological Magnetic Data Bank. <http://www.bmrb.wisc.edu> (2007).
207. Gasteiger, J. and Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **36**, 3219-22 (1980).
208. Bocharova, O.V., Breydo, L., Salnikov, V.V., Gill, A.C., and Baskakov, I.V. Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrP^{Sc} from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Sci* **14**, 1222-32 (2005).

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Reihe von Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern Brigitte und Peter, sowie meiner Schwester Maren, für den Rückhalt und die Unterstützung über all die Jahre hinweg.

Katharina für die schöne Zeit, das Verständnis und einfach fürs dasein.

Prof. Dr. Dr. C. Betzel für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig sein zu können.

Dr. Lars Redecke für die Hilfe bei den biochemischen Arbeiten und die vielen Diskussionen über das Prionprotein und darüber hinaus.

Dennis Wilhelm für die vielen wissenschaftlichen und privaten Diskussionen, sowie die stete Hilfsbereitschaft bei fachlichen und persönlichen Fragen.

Moritz Waldmann für die gute Stimmung im AK, das Korrekturlesen des Manuskripts und die vielen Fragen und Antworten rund um die Chemie.

Anna-Winona Struck und Kathrin Althoff für die gute Laune im AK und die stete, nie endende Hilfsbereitschaft.

Beatrice Jürs, Katrin Schäfer und Katharina Wallach für die tolle Zeit im Labor 13A und das soziale Engagement im AK.

Dr. Thomas Hackl für die grandiose Zusammenarbeit bei der NMR-Administration und die vielen geselligen Diskussionen.

Robin Job für die Rechneradministration und die musikalische Unterstützung im AK.

Miriam Kötzler, Katrin Schäfer, Dr. Martin Hollinger, Dr. Lars Redecke und Moritz Waldmann für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Meike Fellenberg für die Hilfe bei der NMR-Administration.

Meinen Schwerpunktpraktikanten Caroline Reibe, Alexander Buschke und Miriam Kötzer für die geleisteten Beiträge zu dieser Arbeit.

Ilona Grüneberg für die Hilfe bei der Durchführung diverser Synthesen und die richtige Wellenlänge.

Martin Wienke, Karolina Elsholz, Winrich Scherres, Nils Diedrich, Lars Fischer, Michael Goldflam, Joachim Albers, Kolja Klein, Dr. Mirko Lindner, Dr. Atilla Coksezen, Dr. Svenja Scheid, Dr. Boris Kroepelin, Dr. Britta Hünnefeld für die zahlreichen Hilfestellungen und die gute Atmosphäre im AK.

Dr. Birgit Claasen für die hervorragende Vorarbeit auf dem Priongebiet und die gute Zusammenarbeit beim Schreiben des Papers.

Dr. Christian Flügge für die Hilfe beim Umgang mit der Merck-HPLC und für die lustige Zeit, in der wir zusammen im AK waren.

Dr. Thomas Kühnemund, dafür, dass er mein Interesse an der Peptidchemie geweckt hat.

Dr. Jan-Christoph Westermann für die vielen Tipps rund um Sybyl.

Nico Jehmlich für die Bereitstellung der Software zum Auswerten der MALDI-TOF-MS H/D-Austauschexperimente.

Lars Redecke und PD Dr. Martin von Bergen für die Messungen der MALDI-TOF-MS H/D-Austauschexperimente in Leipzig.

Mohammed I. Y. Elmallah für die Bereitstellung des hPrP(121-230) und die nette Atmosphäre im Biochemielabor.

Meinen Kommilitonen Dr. Nicolas Böge, Dr. Nina Deppermann, Dr. Nicolas Gisch, Hauke Heller, Sönke Jessel, Meike Jacobsen, Katja Maetzold, Dana Rühl und Svenja Warnecke für die vielen netten Stunden in und außerhalb der Uni.

11 *Curriculum Vitae*

Persönliche Daten:

Name: Dirk Rehders
Geburtsdatum und –ort: 22.06.1980 in Hamburg

Ausbildung:

01/2006-07/2009: Promotion am in der Forschungsgruppe Prof. Dr. Bernd Meyer, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.

Titel: Aufklärung der Interaktion zwischen dem humanen Prionprotein und dem peptidischen Aggregationsinhibitor NMHRYPNQ

Tag der Disputation: 31.07.2009

04/2005-09/2005: Diplomarbeit in der Forschungsgruppe Prof. Dr. Bernd Meyer, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.

Titel: Darstellung und Untersuchung von Peptiden aus der B1-Domäne des humanen CEACAM1

10/2000-09/2005: Studium der Chemie, Universität Hamburg
Diplom: 29.09.2005 (Note 1.0)

06/1999: Abitur (Note 2.1)

08/1990-06/1999: Gymnasium Oberalster in Hamburg

08/1986-06/1990: Grundschule: Ludwig-Frahm-Schule in Hamburg

Anstellungsverhältnisse:

09/2006 -12/2008 Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum Organische Chemie.

01/2006-09/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des SFB 470 Glycostrukturen und Biosysteme.

10/2005-03/2006	Lehrtätigkeit im chemischen Praktikum für Mediziner, Universität Hamburg
10/2005-11/2005	Betreuung von Studenten der Biochemie im Grundpraktikum Organische Chemie
04/2005-10/2005	Lehrtätigkeit im organisch-chemischen Praktikum für Holzwirte, Universität Hamburg
10/2004-11/2004	Betreuung von Studenten der Biochemie im Grundpraktikum Organische Chemie
11/2003-05/2005	EDV-Gehilfe im Abrechnungsbüro für Ärzte, Hildegard Wilde, Hamburg-Duvenstedt
10/2003-11/2003	Betreuung von Studenten der Biochemie im Grundpraktikum Organische Chemie
10/2002-11/2002	Betreuung von Studenten der Biochemie im Grundpraktikum Organische Chemie

Publikationen:

Rehders, D., Claasen, B., Redecke, L., Buschke, A., Reibe, C., Jehmlich, N., von Bergen, M., Betzel, C. and Meyer, B. Peptide NMHRYPNQ of the cellular prion protein (PrP^C) inhibits aggregation and is a potential key for understanding prion prion interactions. *J Mol Biol.* **392**, 198-207 (2009).

Posterpräsentationen:

Rehders, D., Claasen, B., Redecke, L., Buschke, A., Reibe, C., Jehmlich, N., von Bergen, M., Betzel, C. and Meyer, B. „Aggregation of the Human Cellular Prion Protein (PrP^C) is Quantitatively Inhibited by the Octapeptide NMHRYPNQ“

30th European Peptide Symposium, 31.08-05.09.2008, Helsinki, Finland.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die von mir genannten Quellen verwendet habe. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, den 23.06.2009

Dirk Rehders