

Identifizierung eines immunsuppressiven Wirkstoffmoleküls durch strukturbasiertes virtuelles Screening nach Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Tim Geppert, Stefanie Bauer, Jan A. Hiss, Elea Conrad, Michael Reutlinger, Petra Schneider, Martin Weisel, Bernhard Pfeiffer, Karl-Heinz Altmann, Zoe Waibler und Gisbert Schneider*

Interferone der Klasse I (nachfolgend als IFN- α und IFN- β bezeichnet) sind proinflammatorische Zytokine, die eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung viral er Infektionen spielen.^[1] Sie ermöglichen eine erste Abwehr gegen Pathogene und tragen zum Überleben des Wirts bei, bis die adaptive Immunantwort einsetzt.^[2] IFN Typ I wird hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) produziert.^[3] Alle IFN vom Typ I binden an einen gemeinsamen Rezeptor (IFNAR). Durch die Bindung wird ein positiver Rückkopplungskreislauf in Gang gesetzt, der zu einem weiteren Anstieg der IFN-Ausschüttung führt.^[4] Es gibt Indizien dafür, dass chronisch aktivierte pDC IFN- α als Reaktion auf die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) produzieren. Dies trägt möglicherweise zur Pathogenese von systemischem Lupus erythematosus, einer schweren Autoimmunkrankheit, bei.^[5] Ähnliche immunotoxische Symptome können während der IFN-Behandlung von chronischer Hepatitis und autoimmuninduzierter Diabetes Typ I auftreten.^[6,7]

Hier beschreiben wir die Identifizierung eines nicht-peptidischen Inhibitors der Wechselwirkung zwischen IFN- α und IFNAR. Die bioaktive Substanz wurde durch rechnergestütztes, virtuelles Screening gefunden. Mit diesem Ansatz konnten wir einen wirkstoffartigen Inhibitor der Protein-

Protein-Interaktion (PPI)^[4] bei gleichzeitig geringem experimentellem Laboraufwand identifizieren. Die resultierende Leitstruktur reduziert die In-vitro-Produktion von IFN- α durch murine pDC signifikant. NMR- und Oberflächenplasmonresonanz(SPR)-Experimente bestätigen die direkte Wechselwirkung des Inhibitors mit IFN- α . Unsere Ergebnisse zeigen, dass computerbasierte Modelle relevante Hypothesen in Bezug auf Kontaktstellen in makromolekularen Komplexen liefern und deren Modulation durch niedermolekulare Wirkstoffe ermöglichen können. Wir sehen diese Studie als einen wichtigen Meilenstein für eine zukünftige Arzneistoffentwicklung, die darauf zielt, krankhaft erhöhte IFN- α -Titer zu reduzieren. Darüber hinaus führen wir aber auch eine Technik mit potentiell breitem Anwendungsfeld für die schnelle Identifizierung von PPI-Inhibitoren ein.

NMR-Strukturen des humanen IFN- α als Apostruktur (PDB-ID:1itf,^[9] Modell 16) und im Komplex mit der Ektodomäne des Rezeptors (IFNAR2-EC) (PDB-ID: 2hym,^[10] Modell 6) wurden der Proteindatenbank (PDB)^[11] entnommen (Abbildung 1A). Wir selektierten repräsentative niedrigenergetische Konformationen mit der kleinsten durchschnittlichen Abweichung (gemessen als Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung aller Nicht-Wasserstoffatome, rmsd) zu allen weiteren NMR-Modellen, die im Datenbankeintrag gespeichert waren (rmsd = 2.6 ± 0.4 Å für IFN- α , rmsd = 1.0 ± 0.1 Å für IFNAR2-EC). Die Kontaktfläche des IFN- α zu IFNAR2-EC umfasst dabei 801 Å². Da die Kontaktflächen von Protein-Protein- und Protein-Wirkstoff-Komplexen häufig überlappen,^[12] und um durch die IFN-IFNAR-Wechselwirkung induzierte lokale Konformationsänderungen^[13] möglichst zu vermeiden, entschieden wir uns dazu, eine vielversprechende Ligandenbindestelle auf der ungebundenen Apostruktur des humanen IFN- α zu ermitteln. Der durchschnittliche rmsd-Wert zwischen der Struktur des gebundenen und ungebundenem IFN- α beträgt 1.14 Å. Die Wechselwirkungsfläche zum Rezeptor ist hier durch zwei nichtverbundene Sequenzfragmente (His⁷-Gln⁴⁶, Pro¹³⁷-Glu¹⁶⁵) realisiert; für diese beträgt der entsprechende rmsd-Wert 1.5 Å. Dieser etwas höhere Wert ist ein Hinweis darauf, dass während der Rezeptorbindung in diesem Bereich tatsächlich eine größere Konformationsänderung als im übrigen Teil des Proteins stattfindet.

Mithilfe unserer Software PocketPicker^[14] zur Erkennung von potentiellen Bindetaschen auf Proteinoberflächen und der Methode iPred^[15] zur Identifizierung von „Hot-Spots“ an Protein-Protein-Schnittstellen suchten wir nach potentiellen Ligandenbindetaschen auf der Oberfläche von IFN- α . Die

[*] T. Geppert, Dr. J. A. Hiss, M. Reutlinger, Dr. P. Schneider, B. Pfeiffer, Prof. Dr. K.-H. Altmann, Prof. Dr. G. Schneider^[+]

Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich

Department für Chemie und Angewandte Biowissenschaften

Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich (Schweiz)

E-Mail: gisbert.schneider@pharma.ethz.ch

S. Bauer, E. Conrad, Priv.-Doz. Dr. Z. Waibler^[+]

Junior Research Group „Novel Vaccination Strategies and Early Immune Responses“, Paul-Ehrlich-Institut, 63225 Langen (Deutschland)

Dr. M. Weisel

Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Beilstein-Stiftungsprofessur, Frankfurt (Deutschland)

[+] Diese Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken Kay-Martin Hanschmann und Peter Volkers für statistische Analysen, Gerd Sutter für die Bereitstellung von MVA, Martin Löwer für die Implementierung der VirtualLigand-Software und The Chemical Computing Group Inc. für eine Forschungslizenz der Software MOE. Diese Studie wurde unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds (SNF, 205321-134783), der OPO-Stiftung Zürich (G.S.) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (WA 2873/1-1; Z.W.).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201105901> zu finden.

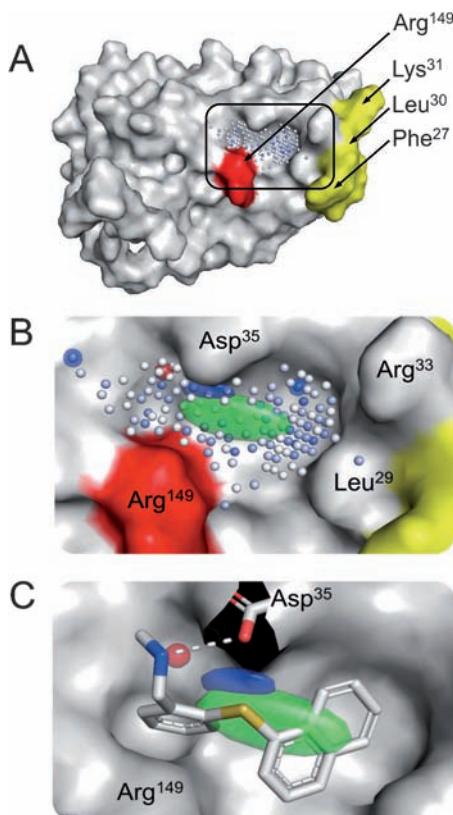


Abbildung 1. Wechselwirkungsfläche zwischen IFN- α und dessen Rezeptor, IFNAR. A) Die untersuchte Bindetasche an der Oberfläche von IFN- α ist durch blaue Kugeln dargestellt. Vorhergesagte wechselwirkende Aminosäurereste („Hot-Spots“) sind rot (höchster Wert) und gelb (mittlerer Wert) dargestellt. B) „VirtualLigand“-Pharmakophormodell in der Bindetasche (grün: lipophiles Zentrum, blau: Wasserstoffbrückendor, rot: Wasserstoffbrückenakzeptor). C) Überlagerung der Dockingposition von Molekül 1 mit dem „VirtualLigand“-Modell. Eine potentielle Wasserstoffbrücke zwischen Asp³⁵ und Molekül 1 ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

Software PocketPicker extrahierte insgesamt 19 mögliche Bindetaschen, von denen sich drei im Wechselwirkungsbereich des (IFN- α)-(IFNAR2-EC)-Komplexes befinden. Die Wechselwirkungsflächenanalyse mittels iPred erbrachte sechs potentielle „Hot-Spot“-Aminosäurereste. Vier dieser „Hot-Spots“ befinden sich in der Umgebung einer kleinen Kavität mit einem Volumen von 155 Å³. Die „Hot-Spot“-Vorhersagen stimmen genau mit früheren Mutationsstudien überein, welche die Wechselwirkung des humanen IFNAR mit IFN- α untersuchten.^[16,17] Besonders erwähnenswert ist, dass diese früheren biochemischen Untersuchungen noch weitere Aminosäurereste als wichtig für die Wechselwirkung beschrieben, während die iPred-Vorhersage auf den Bereich der Bindetasche fokussiert ist und somit das essentielle Wechselwirkungszentrum hervorhebt.

Basierend auf dem Proteinstrukturmodell generierten wir anschließend ein tolerantes Pharmakophormodell in der extrahierten Bindetasche mithilfe unseres „VirtualLigand“-Ansatzes.^[18] Potentielle Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungsstellen wurden als Wahrscheinlichkeitsdichten berechnet und zum Durchmustern („virtuelles Screening“) einer

Sammlung von 556 763 kommerziell erhältlichen, wirkstoffartigen Substanzen verwendet. Von den 100 am besten bewerteten Molekülen wurden sechs manuell ausgewählt und mit der Software GOLD v5.0.1^[19] in die IFN- α Tasche platziert (Tabelle 1, Abbildung 1C). Die Bewertungsfunktion (*GoldScore*) lieferte positive Werte für die berechneten gebundenen Positionen aller sechs Moleküle (Verbindung 1 erhielt die beste Bewertung). Dies ließ eine tatsächliche Bindung vermuten.

Tabelle 1: Substanzen, die mithilfe von virtuellem Screening ausgewählt und auf Inhibition der IFN- α -Antwort in vitro getestet wurden ($n=4$).

Nr.	Struktur	Inhibition (% \pm SD)	GoldScore
1		99 \pm 2	54
2		14 \pm 35	35
3		12 \pm 25	43
4		1 \pm 33	34
5		unlöslich in DMSO	50
6		unlöslich in DMSO	53

Um zu testen, ob die sechs Kandidatenmoleküle tatsächlich die IFN- α -Antwort blockieren, wurden Flt3-L-differenzierte pDC-Kulturen aus murinem Knochenmark gewonnen (BM-pDCs) und mit modifiziertem Vakzinia-Virus Ankara (MVA) infiziert. Für dieses Virus ist beschrieben, dass es eine IFN- α -Antwort durch BM-pDCs hervorruft.^[20] Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen behandelt. Die Verbindung 1 unterdrückte die MVA-induzierte IFN- α -Antwort durch BM-pDCs komplett ($IC_{50}=2-8\ \mu\text{M}$), wohingegen die Substanzen 2–4 die MVA-induzierte IFN- α -Antwort nicht blockierten (Abbildung 2 A,B). Die Verbindungen 5 und 6 waren im Testpuffer unlöslich und wurden daher nicht getestet. Um die Spezifität der IFN- α -Hemmung zu testen, ermittelten wir die Konzentrationen an Interleukin(IL)-12 (IL-12p70 und IL-12p40) im Überstand der MVA-infizierten und mit Verbindung 1 behandelten BM-pDCs. Die von einer MVA-Infektion ausgelöste IL-12-Produktion sollte durch die Hemmung der IFN-IFNAR-Wechselwirkung nicht beeinflusst werden. Tatsächlich beobachteten wir auch nur bei hohen Konzentrationen eine reduzierte IL-12-Produktion (Abbildung 2 B).

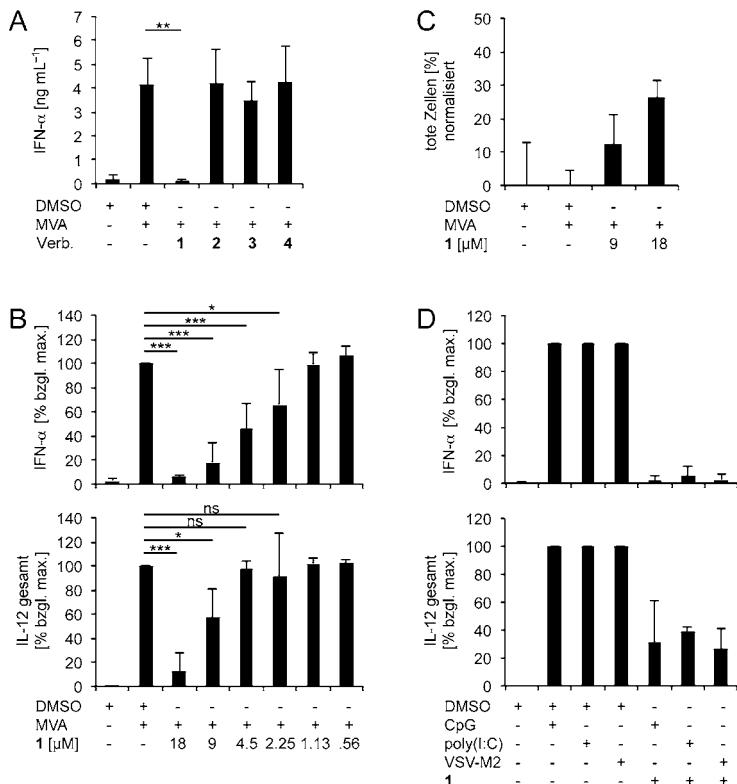


Abbildung 2. Die MVA-induzierte IFN- α -Antwort in BM-pDCs wird durch Verbindung **1** spezifisch inhibiert. A) BM-pDCs wurden mit MVA infiziert („multiplicity of infection“: moi 1) und mit der jeweiligen Testsubstanz behandelt (18 μ M; in DMSO gelöst). Kontrollzellen wurden nur mit DMSO behandelt (in gleicher Konzentration) oder zusätzlich mit MVA bei moi 1 infiziert. 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Überstände mittels ELISA ($n=3$) auf IFN- α untersucht. B) BM-pDCs wurden bei moi 1 mit MVA infiziert und mit Verbindung **1** in den angegebenen Konzentrationen (in DMSO gelöst) behandelt. Kontrollzellen wurden entweder nur mit DMSO behandelt (höchste Konzentration) oder bei moi 1 mit MVA infiziert. 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN- α oder gesamtes IL-12 (Detektion von IL-12p70 und IL-12p40) überprüft. Die gezeigten Werte wurden auf MVA-induziertes IFN- α oder die totale IL-12-Produktion normalisiert ($n=5$). C) BM-pDCs wurden bei moi 1 mit MVA infiziert und mit Verbindung **1** in den angegebenen Konzentrationen (in DMSO gelöst) behandelt. Kontrollzellen wurden entweder nur mit DMSO behandelt (höchste Konzentration) oder bei moi 1 mit MVA infiziert. 18 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumiodid angefärbt und mit FACS analysiert. Die Prozentwerte sind auf MVA-induzierten Zelltod normalisiert ($n=4$). D) BM-pDCs wurden mit CpG2216 in einer Konzentration von 5 μ g mL $^{-1}$ stimuliert, mit 2 μ g poly(I:C) transfiziert oder bei moi 1 mit VSV-M2 infiziert. Sofern angegeben, wurden Zellen zusätzlich mit Verbindung **1** behandelt (9 μ M). Kontrollzellen wurden entweder nur mit DMSO behandelt (entsprechende Konzentration) oder bei moi 1 mit MVA infiziert. 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Überstände auf ihren Gehalt an IFN- α oder totalem IL-12 (Detektion von IL-12p70 und IL-12p40) mittels ELISA getestet. Die gezeigten Werte sind normalisiert auf CpG2216-, poly(I:C)- oder VSV-M2-induzierte IFN- α -Produktion ($n=3$). Fehlerbalken markieren Standardabweichungen. ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05 \geq 0.01$; **, $p < 0.01 \geq 0.001$; ***, $p < 0.001$ (Dunnett-Test oder paarweiser Bonferroni-Permutationstest).

Dieser Befund ist möglicherweise korreliert mit einer zytotoxischen Aktivität von Verbindung **1** in hoher Konzentration (Abbildung 2C). Wir weisen darauf hin, dass eine mittlere Dosierung die IL-12-Produktion nicht beeinflusste, wohingegen die IFN- α -Antwort signifikant reduziert wurde (Abbildung 2B). Wir schließen aus diesen Resultaten, dass Ver-

bindung **1** spezifisch die IFN- α -Antwort nach einer MVA-Infektion von BM-pDCs hemmt.

Um zu testen, ob die Behandlung mit Verbindung **1** primär die MVA-induzierte IFN- α -Antwort unterdrückt oder ob die IFN- α -Antwort auf andere Stimulanten ebenfalls gehemmt wird, wurden BM-pDC-Kulturen mit drei verschiedenen Stimulantien behandelt, für die beschrieben ist, dass sie IFN- α -Antworten in BM-pDCs auslösen: dem TLR9-Ligand CpG2216,^[21] dem MDA5/TLR3-Ligand poly(I:C)^[22] und der Infektion mit vesikulärem Stomatitisvirus (VSV, Variante M2).^[23] Dabei zeigte sich, dass Verbindung **1** die IFN- α -Antwort, die durch Behandlung mit CpG2216, poly(I:C) und nach Infektion mit VSV-M2 hervorgerufen wurde, inhibierte, wohingegen die IL-12-Produktion unter diesen Bedingungen weniger stark beeinflusst wurde (Abbildung 2D).

Wir setzten Sättigungstransferdifferenz(STD)-NMR-Spektroskopie ein,^[24] um zu untersuchen, ob Verbindung **1** direkt an humanes IFN- α bindet. Protonenreferenzspektren wurden zunächst getrennt für Verbindung **1** und IFN- α aufgenommen (Abbildung 3A,B), ebenso wie die Off-Resonanz-Referenz (Abbildung 3C) und das STD-Spektrum (Abbildung 3D) der Mischung von Verbindung **1** und IFN- α . Sättigungstransfer ist am besten sichtbar für den aromatischen Bereich des Spektrums und das Methyldesignal von **1**. Die Signale der aromatischen Protonen (7.0–8.5 ppm) und der N-Methylgruppe (2.7 ppm) sind im STD-Spektrum klar erkennbar. Dies legt die direkte Bindung von **1** an IFN- α nahe. Um die Spezifität der Bindung von **1** zu untersuchen, wiederholten wir das Experiment mit Methyl- β -D-glucopyranosid als ein vermutlich nicht an IFN- α bindendes Molekül. In den entsprechenden Off-Resonanz- (Abbildung 3E) und STD-Spektren (Abbildung 3F) ist kein Sättigungstransfer zwischen IFN- α und dem Glycosid erkennbar. Zugabe von **1** zur Mischung (Abbildung 3G) und Wiederholung des STD-Experiments brachte den Sättigungstransfer zwischen IFN- α und Verbindung **1** jedoch erwartungsgemäß wieder zum Vorschein (Abbildung 3H). Wir schließen aus diesen Ergebnissen, dass Verbindung **1** seine immunsupprimierende Aktivität durch die direkte Wechselwirkung mit IFN- α entfaltet.

Mittels SPR-Messungen bestimmten wir eine mikromolare Dissoziationskonstante ($K_d = 4 \mu$ M) für die Bindung von **1** an INF- α (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Dynamische Lichtstreuungsexperimente wiesen nicht auf eine Moleküllaggregation hin, die zu Messartefakten hätte führen können. Das niedrige Molekulargewicht von **1** ermöglicht nun die weitere Optimierung der Ligandeneffizienz mit der Perspektive, in die Leitstrukturoptimierung einzutreten.^[25] Unsere Ergebnisse bestätigen, dass die Vorhersage von Protein-Protein-Wechselwirkungsfächern und deren „Hot-Spots“ eine solide Grundlage für Wirkstoffentwicklungsprojekte^[26] darstellt und eine systematische Analyse von phar-

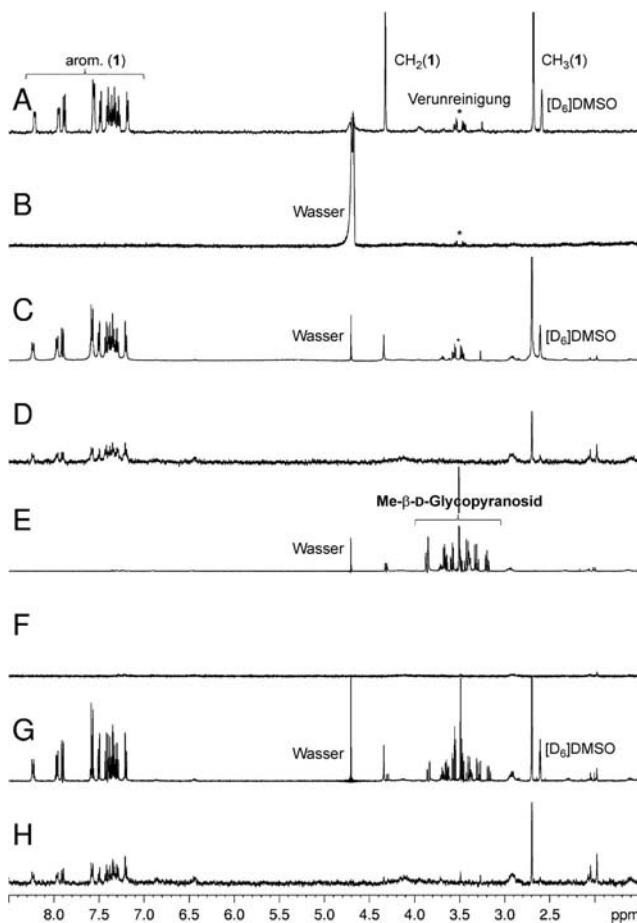


Abbildung 3. Das STD-NMR-Experiment bestätigt die direkte Wechselwirkung zwischen Molekül 1 und IFN- α . A) Protonen-NMR-Spektrum von Molekül 1 (1 mm). B) Protonen-NMR-Spektrum von humanem IFN- α (40 μ M, CYT-204, Prospec Ltd, Ness-Ziona, Israel). C) Off-Resonanzspektrum von Molekül 1 (1 mm) in Anwesenheit von IFN- α (40 μ M). D) STD-NMR-Spektrum von Molekül 1 (1 mm) in Anwesenheit von IFN- α (40 μ M). E) Off-Resonanz-Referenz-NMR-Spektrum von Methyl- β -D-glucopyranosid (1 mm). F) STD-NMR-Spektrum von Methyl- β -D-glucopyranosid (1 mm). G) Off-Resonanzspektrum von Molekül 1 (1 mm) in einer Mischung mit Methyl- β -D-glucopyranosid (1 mm) in Anwesenheit von IFN- α (40 μ M). H) STD-NMR-Spektrum von Molekül 1 (1 mm) in einer Mischung mit Methyl- β -D-glucopyranosid (1 mm) in Anwesenheit von IFN- α (40 μ M). In (A), (B) und (C) wurde neben verbliebenem Wasser und Lösungsmittel ($[D_6]DMSO$) eine Verunreinigung bei 3.52 ppm detektiert. Die Verunreinigung ist im STD-Spektrum (D) nicht sichtbar, was zeigt, dass sie nicht mit IFN- α wechselwirkt. Spektrum (D) zeigt deutlich den Sättigungstransfer von IFN- α zu den aromatischen Protonen von Molekül 1 (7.0–8.5 ppm) und dessen Methygruppe bei 2.7 ppm, wohingegen das Signal der CH_2 -Gruppe (4.3 ppm) nur schwach erscheint. Die Spektren (E) und (F) zeigen, dass kein Sättigungstransfer zwischen IFN- α und Methyl- β -D-glucopyranosid auftritt. Spektrum (H) zeigt den beobachteten Sättigungstransfer zwischen IFN- α und den aromatischen Protonen von Molekül 1 (7.0–8.5 ppm) sowie zur Methygruppe (bei 2.7 ppm, Spektrum (D)) in der Mischung von Molekül 1 und Methyl- β -D-glucopyranosid mit IFN- α . Dies bestätigt den selektiven Sättigungstransfer von Protein zum bindenden Liganden.

makologisch hoch attraktiven Protein-Protein-Wechselwirkungen eröffnet.

Anmerkung: Eine Röntgenstruktur des IFN-(IFNAR2-EC)-Komplexes (PDB ID: 3s9d)^[28] wurde nach Fertigstellung unserer Studie veröffentlicht. Sie bestätigt unsere Berechnung, dass der hydrophobe Bereich, der Phe²⁷ und Leu³⁰ enthält, wichtig für die Bindung von INF- α mit seinem Rezeptor ist und auch Arg¹⁴⁹ eine Schlüsselrolle in dieser Wechselwirkung spielt. Arg¹⁴⁹ bildet im Komplex eine Salzbrücke mit Glu⁷⁷ von IFNAR2-EC.

Eingegangen am 20. August 2011
Online veröffentlicht am 16. November 2011

Stichwörter: Bioinformatik · Interferone · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Virtuelles Screening · Wirkstoffentwicklung

- [1] L. Malmgaard, *J. Interferon Cytokine Res.* **2004**, *24*, 439–454.
- [2] A. Le Bon, D. F. Tough, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2008**, *19*, 33–40.
- [3] M. Swiecki, M. Colonna, *Immunol. Rev.* **2010**, *234*, 142–162.
- [4] K. E. Mogensen, M. Lewerenz, J. Reboul, G. Lutfalla, G. Uzé, *J. Interferon Cytokine Res.* **1999**, *19*, 1069–1098.
- [5] D. Finke, M. L. Eloranta, L. Rönnblom, *Autoimmunity* **2009**, *42*, 349–352.
- [6] L. E. Wilson, D. Widman, S. H. Dikman, P. D. Gorevic, *Semin. Arthritis Rheum.* **2002**, *32*, 163–173.
- [7] a) D. Hober, P. Sauter, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2010**, *6*, 279–289;
b) C. Selmi, A. Lleo, M. Zuin, M. Podda, L. Rossaro, M. E. Gershwin, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2006**, *7*, 451–456.
- [8] a) A. Dömling, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 281–291; b) T. Berg, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2008**, *11*, 666–674; c) D. González-Ruiz, H. Gohlke, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2607–2625.
- [9] W. Klaus, B. Gsell, A. M. Labhardt, B. Wipf, H. Senn, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 661–675.
- [10] S. R. Quadt-Akabayov, J. H. Chill, R. Levy, N. Kessler, J. Anglister, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 2656–2668.
- [11] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [12] F. P. Davis, A. Sali, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, e1000668.
- [13] R. Najmanovich, J. Kuttner, V. Sobolev, M. Edelman, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *39*, 261–268.
- [14] M. Weisel, E. Proschak, G. Schneider, *Chem. Cent. J.* **2007**, *1*, 7.
- [15] T. Geppert, B. Hoy, S. Wessler, G. Schneider, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 344–353.
- [16] J. Piehler, G. Schreiber, *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 57–67.
- [17] J. Piehler, G. Schreiber, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 223–237.
- [18] a) M. Löwer, T. Geppert, P. Schneider, B. Hoy, S. Wessler, G. Schneider, *PLoS One* **2011**, *6*, e17986; b) A. Klenner, M. Hartenfeller, P. Schneider, G. Schneider, *Drug Discovery Today Technol.* **2010**, *7*, e237–e244.
- [19] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- [20] Z. Waibler, M. Anzaghe, H. Ludwig, S. Akira, S. Weiss, G. Sutter, U. Kalinke, *J. Virol.* **2007**, *81*, 12102–12110.
- [21] Z. Waibler, M. Anzaghe, A. Konur, S. Akira, W. Müller, U. Kalinke, *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 3127–3137.
- [22] G. Kochs, S. Bauer, C. Vogt, T. Frenz, J. Tschopp, U. Kalinke, Z. Waibler, *J. Virol.* **2010**, *84*, 12344–12350.
- [23] Z. Waibler, C. N. Detje, J. C. Bell, U. Kalinke, *Immunobiology* **2008**, *212*, 887–894.
- [24] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.

- [25] a) H. Raether, E. Kretschmann, *Z. Naturforsch. A* **1968**, *23*, 2135–2136; b) *Surface Plasmon Resonance* (Hrsg.: N. J. de Mol, M. J. E. Fischer), Humana, New York, **2010**.
- [26] a) A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 430–431; b) C. W. Murray, T. L. Blundell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 497–507; c) E. Feyfant, J. B. Cross, K. Paris, D. H. Tsao, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *685*, 241–252; d) M. Hartenfeller, G. Schneider, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 742–759.
-
- [27] a) N. Tuncbag, O. Keskin, A. Gursoy, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W402–W406; b) L. M. Meireles, A. S. Dömling, C. J. Camacho, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W407–W411; c) A. Shulman-Peleg, M. Shatsky, R. Nussinov, H. J. Wolfson, *BMC Biol.* **2007**, *5*, 43.
- [28] C. Thomas, I. Moraga, D. Levin, P. O. Krutzik, Y. Podoplelova, A. Trejo, C. Lee, G. Yarden, S. E. Vleck, J. S. Glenn, G. P. Nolan, J. Piehler, G. Schreiber, K. C. Garcia, *Cell* **2011**, *146*, 621–632.