

# Synthese und Charakterisierung von modifizierten Peptiden und Glycopeptiden aus der V3-Region des gp120 aus HIV

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Vorgelegt von

**Nadja Haberz**

aus Hamburg

Hamburg, 2016



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie des Departments Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg durchgeführt.

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

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke

Tag der Disputation: 09.12.2016

Druckfreigabe: 19.12.2016



ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	V
AMINOSÄUREN & MONOSACCHARIDE .....	VIII
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3 BIOLOGISCHER HINTERGRUND .....</b>	<b>5</b>
3.1 Das humane Immunschwäche-Virus und die Krankheit AIDS.....	5
3.2 Der Erreger.....	5
3.3 Mechanismus der Infektion .....	7
3.4 Der Corezeptor CCR5 .....	9
3.5 Das virale Glycoprotein gp120.....	11
3.5.1 Struktur und Glycosylierung des gp120 .....	11
3.5.2 Die V3-Region aus gp120.....	13
3.6 Therapieansätze.....	15
3.6.1 Antiretrovirale Therapie .....	15
3.6.2 Impfstoffe.....	17
3.6.3 Heilung .....	18
<b>4 METHODEN.....</b>	<b>19</b>
4.1 Synthese von Peptiden und N-Typ-Glycopeptiden .....	19
4.1.1 Festphasenpeptidsynthese.....	19
4.1.2 Synthese von disulfidverbrückten, zyklischen Peptiden .....	20
4.1.3 N-Typ-Glycopeptidsynthese .....	21
4.2 Oberflächenplasmonenresonanz.....	22
4.3 Durchflusszytometrie.....	24
4.4 Konformationsanalyse von Peptiden .....	26
4.5 <i>Molecular Modeling</i> .....	29
<b>5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>31</b>
<b>6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>33</b>
6.1 Synthese der Peptide und Glycopeptide .....	33
6.1.1 Synthese der Chitobiosylasparaginbausteine .....	33
6.1.2 Übersicht der verschiedenen V3-Peptide und -Glycopeptide.....	36
6.1.3 Glycopeptidsynthese .....	36
6.1.4 Zyklisierung der Peptide .....	44

## II | Inhaltsverzeichnis

---

6.1.5	Isolierung eines Komplextyp-Nonasaccharids .....	47
6.2	SPR-Bindungsstudien der Peptide und Glycopeptide .....	49
6.2.1	SPR-Messungen der Peptide und Glycopeptide P1-P4 .....	50
6.2.2	Bindungskurven der Peptide und Glycopeptide P1-P4 .....	55
6.2.3	Vergleich und Diskussion der Ergebnisse .....	57
6.2.4	Durchflusszytometrische Kontrolle der GHOST(3)-Zellen mit einem Anti-CCR5-Antikörper .....	60
6.3	Strukturelle Analyse der V3-Peptide .....	64
6.3.1	<i>In-silico</i> -Strukturanalyse .....	64
6.3.2	Konformationsanalysen der Peptide P3 und P4 mittels NMR .....	71
6.3.3	Vergleich der experimentellen mit den berechneten Strukturen .....	85
6.3.4	<i>Molecular Modeling</i> der CCR5-V3-Loop-Wechselwirkungen .....	89
7	EXPERIMENTELLER TEIL .....	101
7.1	Verwendete Materialien und Geräte .....	101
7.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	105
7.3	Darstellung der N <sub>γ</sub> -Chitobiosylasparaginbausteine .....	112
7.3.1	Darstellung von kolloidalem Chitin (2) .....	112
7.3.2	Synthese von Chitobioseoctaacetat (3) .....	113
7.3.3	Synthese des <i>t</i> -Butyl-geschützten N <sub>γ</sub> -Chitobiosylasparaginbausteins (7) .....	114
7.3.4	Synthese des N <sub>γ</sub> -Chitobiosylasparaginbausteins (9) .....	115
7.4	Synthese von Fmoc-L-Cys( <i>St</i> Bu)-OPfp (16) .....	116
7.5	Synthese und Charakterisierung der Peptide und Glycopeptide .....	118
7.5.1	Darstellung des offenkettigen V3-Glycopeptids P2 .....	118
7.5.2	Darstellung des zyklischen V3-Peptids P3 .....	124
7.5.3	Darstellung des zyklischen V3-Glycopeptids P4 .....	126
7.6	Isolierung des Nonasaccharids (21) .....	129
7.7	Zellkultur der GHOST(3)-Zellen .....	131
7.7.1	Aussaat und Kultur der GHOST(3)-Zellen .....	131
7.7.2	Zellzählung .....	132
7.8	SPR-Experimente .....	132
7.8.1	pH-Wert- <i>Scouting</i> des Immobilisierungspuffers .....	132
7.8.2	Immobilisierung des Peptids auf dem CMD200M Sensorchip .....	133
7.8.3	Durchführung der Messung .....	133
7.9	Durchflusszytometrischer Nachweis des CCR5-Rezeptors mit einem Anti-CCR5-Antikörper .....	134
7.10	Konformationsanalyse .....	134
7.10.1	NOESY-Experimente und Berechnung der Protonenabstände .....	134
7.10.2	Berechnung der $\phi$ -Winkel .....	135
7.10.3	DG-Rechnungen .....	135

---

7.11	Computergestützte Methoden .....	136
7.11.1	<i>Constrained</i> Energieminimierung und MD-Simulation der CYANA-Strukturen.....	136
7.11.2	MD-Simulationen der V3-Peptide zur Strukturvorhersage .....	137
7.11.3	MD-Simulationen des trunkierten und des nativen gp120 mit dem CCR5-Rezeptor .....	137
8	TOXIKOLOGISCHE DATEN .....	139
9	LITERATURVERZEICHNIS .....	143
10	ANHANG .....	157
10.1	Experimentell bestimmte Protonenabstände von P3.....	157
10.2	Experimentell bestimmte Protonenabstände von P4.....	159
10.3	$\phi$ -Winkel der experimentellen und berechneten Strukturen von P3.....	161
10.4	$\phi$ -Winkel der experimentellen und berechneten Strukturen von P4.....	162
10.5	Kontakte zwischen dem Nonasaccharid-V3-Loop und dem CCR5-Rezeptor .....	163
10.6	Kontakte zwischen dem nativen V3-Loop und dem CCR5-Rezeptor .....	164
10.7	Charakterisierung des Deletionspeptids (13).....	165
11	DANKSAGUNG .....	167
12	ERKLÄRUNGEN.....	169
12.1	Eidesstattliche Erklärung.....	169
12.2	Erklärung über frühere Promotionsversuche .....	169



---

## Abkürzungsverzeichnis

<b>7TM</b>	7-Helixtransmembranprotein
<b>abs.</b>	Absolut
<b>AIDS</b>	<i>Aquired immune deficiency syndrome</i>
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ART</b>	Antiretrovirale Therapie
<b>AS</b>	Aminosäure(n)
<b>bnAb</b>	<i>Broadly neutralizing antibody</i>
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<b>CBA</b>	<i>Carbohydrate-binding agent</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDR</b>	<i>Complementarity determining region</i>
<b>COSY</b>	<i>Correlated spectroscopy</i>
<b>CRF</b>	<i>Circulating recombinant form</i>
<b>CYANA</b>	<i>Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications</i>
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DEPBT</b>	3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
<b>DG</b>	<i>Distance geometry</i>
<b>DHB</b>	2,5-Dihydroxybenzoesäure
<b>DIC</b>	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
<b>DIPEA</b>	Diisopropylethylamin
<b>dsDNA</b>	<i>Double stranded deoxyribonucleic acid</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EIC</b>	<i>Extracted ion chromatogram</i>
<b>Env</b>	<i>Envelope</i>
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>FA</b>	Ameisensäure ( <i>Formic acid</i> )
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>Fmoc</b>	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
<b>FSC</b>	<i>Forwards scatter</i>

<b>Gag</b>	<i>Group antigen</i>
<b>GHOST</b>	<i>Green fluorescent human osteosarcoma</i>
<b>GPCR</b>	<i>G protein coupled receptor</i>
<b>HAART</b>	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
<b>HATU</b>	<i>O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat</i>
<b>HIC</b>	<i>HIV-Controller</i>
<b>HIV</b>	<i>Human immunodeficiency virus / Humanes Immundefizienz-Virus</i>
<b>HOAt</b>	<i>1-Hydroxy-7-azabenzotriazol</i>
<b>MALDI</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MD</b>	<i>Molecular dynamics</i>
<b>MS</b>	<i>Massenspektrometrie</i>
<b>NHS</b>	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
<b>NMM</b>	<i>N-Methylmorpholin</i>
<b>NMP</b>	<i>N-Methyl-2-pyrrolidon</i>
<b>NMR</b>	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>NRTI</b>	<i>Nukleosid-/Nukleotid-analoge-RT-Inhibitoren</i>
<b>NNRTI</b>	<i>Nicht-Nukleosid-/Nukleotid-analoge-RT-Inhibitoren</i>
<b>NOE</b>	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
<b>NRTI</b>	<i>Nukleosid-/Nukleotid-analoge-RT-Inhibitoren</i>
<b>OD</b>	<i>Optische Dichte</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerithrin</i>
<b>PIC</b>	<i>Preintegration complex</i>
<b>Pbf</b>	<i>2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuranyl-5-sulfonyl</i>
<b>Pfp</b>	<i>Pentafluorphenyl</i>
<b>PGC</b>	<i>Porous graphitized carbon</i>
<b>PI</b>	<i>Proteaseinhibitor</i>
<b>PND</b>	<i>Prinzipiell neutralisierende Domäne</i>
<b>PNGase F</b>	<i>N-Glycosidase F</i>
<b>Pol</b>	<i>Polymerase</i>
<b>RMSD</b>	<i>Root-mean-square deviation</i>
<b>RMSF</b>	<i>Root-mean-square fluctuation</i>
<b>RP</b>	<i>Reversed phase</i>
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i>

---

<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>Rt</b>	Raumtemperatur
<b>RTC</b>	<i>Reverse transcription complex</i>
<b>RU</b>	<i>Response unit</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SIV<sub>cpz</sub></b>	<i>Simian immunodeficiency virus chimpanzee</i>
<b>SIV<sub>sm</sub></b>	<i>Simian immunodeficiency virus sooty mangabey</i>
<b>SPPS</b>	<i>Solid phase peptide synthesis</i>
<b>SPR</b>	<i>Surface plasmon resonance</i>
<b>SSC</b>	<i>Sideways scatter</i>
<b>ssRNA</b>	<i>Single stranded ribonucleic acid</i>
<b>StBu</b>	<i>tert</i> -Butylthio
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
<b>TBTU</b>	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Tetrafluoroborat
<b>tBu</b>	<i>tert</i> -Butyl
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TIPS</b>	Triisopropylsilan
<b>TOCSY</b>	<i>Total correlation spectroscopy</i>
<b>TOF</b>	<i>Time of flight</i>
<b>Trt</b>	Trityl (Triphenylmethyl)
<b>Z(2-Cl)OSu</b>	<i>N</i> -(2-Chlorbenzyloxycarbonyloxy)succinimid

## Aminosäuren & Monosaccharide

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

Monosaccharid	Abkürzung	Symbol
D-N-Acetylglucosamin ( $\alpha$ , $\beta$ )	GlcNAc	
D-Mannose ( $\alpha$ , $\beta$ )	Man	
D-Galactose ( $\alpha$ , $\beta$ )	Gal	
L-Fucose ( $\alpha$ )	Fuc	

## 1 Zusammenfassung

Im Jahr 2015 starben noch immer mehr als eine Million Menschen durch das HI-Virus und über zwei Millionen haben sich neu mit HIV infiziert. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe und die Suche nach Impfstoffen sind daher fortwährend Gegenstand der Forschung. Einen möglichen Ansatzpunkt stellen therapeutisch einsetzbare Antikörper gegen das virale Oberflächenprotein gp120 dar, die das Virus langfristig zu neutralisieren vermögen. Die häufig in Infizierten gefundenen Antikörper binden meist das <sup>307</sup>IHIGPGRAF<sup>315</sup>-Motiv in dem V3-Loop des gp120, welches auch prinzipiell neutralisierende Domäne (PND) genannt wird. Diese Antikörper zeigten jedoch keine langfristige und breite Neutralisierung des Virus. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher V3-Peptide und V3-Glycopeptide ohne PND synthetisiert und charakterisiert werden, die zukünftig zur Selektion von Antikörpern gegen die V3-Region dienen können. Jene Antikörper sollen den *loop* an anderen Bereichen als der PND binden und somit möglicherweise zu einer längerfristigen Neutralisation führen.

Dafür wurde zusätzlich zum linearen, unglycosylierten V3-Peptid **P1**, bei dem die PND durch das Aminosäure-Motiv PS ersetzt wurde, das analoge, lineare V3-Glycopeptid **P2** mit einer GlcNAc( $\beta$ 1,4)-GlcNAc-Glycosylierung an N301 synthetisiert. Die beiden linearen Peptide konnten über eine Disulfidbrücke der terminalen Cysteine zyklisiert werden, wodurch die Peptide **P3** und **P4** erhalten wurden. Die Glycopeptidsynthese wurde dabei in insgesamt fünf verschiedenen Varianten mit einem acetylierten und einem ungeschützten Chitobiosylasparagin-Baustein durchgeführt, um die optimalen Synthesebedingungen zu finden. Es zeigte sich, dass die vollständig automatisierte Synthese nach Variante 1 die höchsten Ausbeuten lieferte. Um auch in der Lage sein zu können Glycopeptide mit größeren Komplextyp-Kohlenhydrat-Strukturen herzustellen, wurde das Nonasaccharid **19** aus bovinem Fibrinogen isoliert. Neben dem Nonasaccharid wurde jedoch ebenfalls das fucosylierte Decasaccharid erhalten, welches sich aber nicht vollständig abtrennen ließ.

Anschließend wurden alle vier Peptide und Glycopeptide mit Hilfe von SPR-Experimenten auf ihre Bindung zum humanen CCR5-Rezeptor untersucht. Der Rezeptor wurde in Form von CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen eingesetzt, die  $4 \cdot 10^4$  Rezeptoren auf ihrer Oberfläche präsentieren.<sup>1</sup> Es zeigte sich, dass die Peptide trotz Trunkierung den CCR5-Rezeptor spezifisch binden. Bis auf **P1** entsprachen die Affinitäten der untersuchten V3-Peptide der Annahme, dass V3-Glycopeptide stärker mit CCR5 interagieren als unglycosylierte. Ebenso führte die Zyklisierung über eine Disulfidbrücke der flankierenden Cysteine zu einer höheren Affinität als bei vergleichbaren linearen V3-Peptiden.

## 2 | Zusammenfassung

---

Der Einfluss der Trunkierung auf die Konformation wurde zunächst durch eine Strukturvorhersage mittels *molecular modeling* für die zyklischen V3-Peptide **P3** und **P4** sowie eines zu **P4** analogen Glycopeptids mit einem Nonasaccharid statt Chitobiose untersucht. Die erhaltenen Strukturen zeigten ebenso wie die Röntgenstruktur des nativen V3-Loops eine langgestreckte, aber stärker verdrillte Konformation. Die Glycosylierung hatte dabei einen Einfluss auf die Anzahl intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen. Die reinen *In-Silico*-Strukturen von **P3** und **P4** wurden mit experimentell ermittelten Strukturen einer NMR-Konformationsanalyse verglichen. Aus NOE-Aufbaukurven ließen sich Abstände und aus  $^3J$ -Kopplungskonstanten  $\phi$ -Winkel berechnen, mit denen über einen *Distance-geometry*-Algorithmus Konformationen erhalten wurden. Diese experimentell erhaltenen Konformationen waren ebenfalls langgestreckt, im Fall von **P3** insgesamt aber etwas weiter und offener. **P4** zeigte wie die *In-Silico*-Struktur eine stärkere Verdrillung als **P3**. Somit konnte gezeigt werden, dass Strukturvorhersagen von V3-Peptiden mit *molecular modeling* Tendenzen aufzeigen können.

Zuletzt wurden der trunkierte und der native V3-Loop, jeweils mit Nonasaccharid am N301, in die mit Maraviroc kokristallisierte Röntgenstruktur des CCR5-Rezeptors modelliert. Dabei sollte herausgefunden werden, ob das sterisch anspruchsvolle Glycan, das im Modell von Tan *et al.*<sup>2</sup> fehlt, bei gleicher Orientierung des loops passt. Das Tan-Modell konnte weder für den trunkierten noch für den nativen loop reproduziert werden, jedoch störte das Glycan in keiner getesteten Orientierung. Der native V3-Loop wechselwirkte allerdings weniger mit CCR5 als der trunkierte.

## 2 Abstract

In 2015 still more than a million people died of HIV and over two million new infections were registered. Therefore, the development of new active compounds and the quest for a vaccine are a crucial part of research. A possible approach to long-term neutralization of the virus could be therapeutic antibodies against the viral envelope protein gp120. Antibodies, frequently found in patients, mostly bind the <sup>307</sup>IHIGPGRAF<sup>315</sup> motif in the V3 region of gp120, also called principal neutralizing domain (PND). However, those antibodies show no broad and long-term neutralization of the virus.

Thus, in this thesis V3 peptides and glycopeptides without PND were to be synthesized and characterized, that can be used to select V3-specific antibodies. Those antibodies should bind the V3 loop at a different site than the PND and so might ensure a longer neutralization. To achieve this goal, additional to the linear unglycosylated V3 peptide **P1**, in which the PND is replaced by the amino acid motif PS, the analogous linear V3 glycopeptide **P2** with a GlcNAc( $\beta$ 1,4)-GlcNAc glycosylation at N301 was synthesized. Both linear peptides were also cyclized by a disulfide bond between the flanking cysteines, which gave the peptides **P3** and **P4**. The glycopeptide synthesis was performed in five variants with an acetylated and an unprotected chitobiose-asparagine building block to find the optimal conditions. The best yields were provided by the fully automated synthesis of variant 1.

To be able to synthesize glycopeptides with bigger complex type carbohydrate structure the nonasaccharide **19** was isolated from bovine fibrinogen. As a byproduct of the nonasaccharide the fucosylated deca-saccharide was found, which could not be separated completely from the nonasaccharide.

All four peptides and glycopeptides were analyzed by SPR considering their binding affinity to the human CCR5 receptor. The receptor was available as CCR5 over-expressing GHOST(3) Hi5 cells, which present  $4 \cdot 10^4$  receptors at their surface. The peptides specifically bound the CCR5 receptor despite their truncation. Except for **P1**, the affinities of the analyzed V3 peptides correlated to the assumption that V3 glycopeptides interact stronger with CCR5 than unglycosylated peptides. Also the cyclization via the terminal cysteines led to higher affinities than comparable linear V3 peptides.

The effect of the truncation on the peptide conformation was first examined by an *in silico* prediction of the structures of the cyclic peptides **P3** and **P4** and a glycopeptide analogous to **P4** with chitobiose replaced by a nonasaccharide. Like the crystal structure, the peptide structures showed an oblong and but more twisted conformation. The glycosylation had an impact on the amount of intramolecular hydrogen bonds. The *in Silico* structures of **P3** and

## 4 | Abstract

---

**P4** were also compared to experimental structures from a NMR conformation analysis. Distances were calculated from NOE build-up curves and  $\phi$  angles from  $^3J$  coupling constants, which were both used to calculate conformations by a distance geometry algorithm. Those experimental conformations were also long-stretched. In the case of **P3** the conformation was a bit wider and more open than the *in silico* conformation. **P4** was as well as the *in silico* structure more twisted than **P3**. Therefore, it was demonstrated that structure prediction of V3 peptides by molecular modeling can provide tendencies.

Finally, the truncated and the native V3 loop, each carrying a nonasaccharide at N301, were modeled into the with Maraviroc co-crystallized x-ray structure of CCR5. The model of Tan *et al.*<sup>2</sup> does not include the N301 glycosylation which was to be examined in this study. The orientation of the Tan model could not be reproduced for the truncated or the native V3 loop but the glycan did not disturb or clash into the receptor in any tested orientation. However, the native V3 loop interacted less with CCR5 than the truncated.

### 3 Biologischer Hintergrund

#### 3.1 Das humane Immunschwäche-Virus und die Krankheit AIDS

Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass das humane Immunschwäche-Virus (HIV) die Krankheit AIDS (*aquired immune deficiency syndrome*) verursacht.<sup>3,4</sup> Durch eine HIV-Infektion wird das Immunsystem jahrelang so weit geschwächt, dass es zu opportunistischen Mehrfachinfektionen kommt, die schließlich zum Tod führen. Im Jahr 2014 gab es weltweit 36.9 Millionen HIV-Infizierte (Abbildung 1) und etwa zwei Millionen neue Infektionen, womit die Krankheit noch immer das Ausmaß einer Pandemie hat.<sup>5,6</sup> Neben dem gesundheitlichen Schaden hat die Krankheit besonders in den stark betroffenen Ländern niedrigen und mittleren Einkommens volkswirtschaftliche und soziale Auswirkungen.<sup>7,8</sup> Bisher gibt es weder eine Heilungsmöglichkeit noch einen Impfstoff. Der Krankheitsverlauf kann aber durch die antiretrovirale Therapie (ART) verlangsamt werden, sodass viele Betroffene gar kein AIDS entwickeln.<sup>5,9</sup>

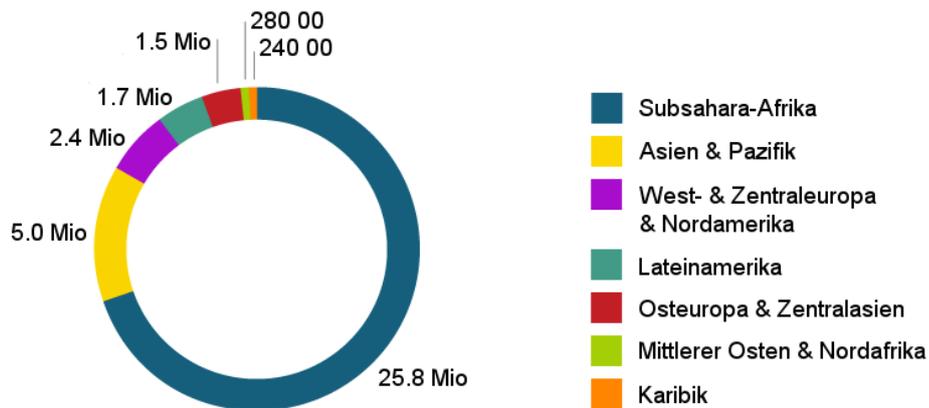


Abbildung 1: Globale Verbreitung der HIV-Infizierten im Jahr 2014.<sup>5</sup>

#### 3.2 Der Erreger

Es gibt zwei verschiedene Arten des Virus, HIV-1 und HIV-2, wobei HIV-2 seltener und weniger infektiös ist und vor allem in Westafrika auftritt.<sup>10</sup> HIV-1 ist weltweit verbreitet und verantwortlich für die Mehrheit aller HIV-Infektionen. HIV-1 lässt sich in die vier Untergruppen M (major), N (new), O (outlier) und P einteilen, von denen Gruppe M 90% aller HIV-Infektionen ausmacht.<sup>11</sup> In der M-Gruppe werden neun Subtypen (A-D, F-H, J, K) sowie verschiedene Hybride aus anderen Subtypen (CRF, *circulating recombinant form*) unterschieden. Sowohl die verschiedenen Untergruppen als auch Subtypen treten in

## 6 | Biologischer Hintergrund

---

unterschiedlichen Häufigkeiten und Regionen auf. Während die M-Gruppe weltweit vorkommt, findet sich die einige Zehntausend Infizierte umfassende O-Gruppe dominant in West- und Zentralafrika. Die wenigen Infizierten der N- und P-Gruppen kommen aus Kamerun. Subtyp B der Gruppe M findet sich vor allem in Industrienationen wie den amerikanischen Kontinenten, Westeuropa und Australien, während Subtyp C hauptsächlich in den stark betroffenen Ländern Subsahara-Afrikas und Indien auftritt und etwa 50% aller HIV-Infektionen ausmacht. Subtyp A findet sich hauptsächlich in Zentralafrika sowie Osteuropa.<sup>11</sup>

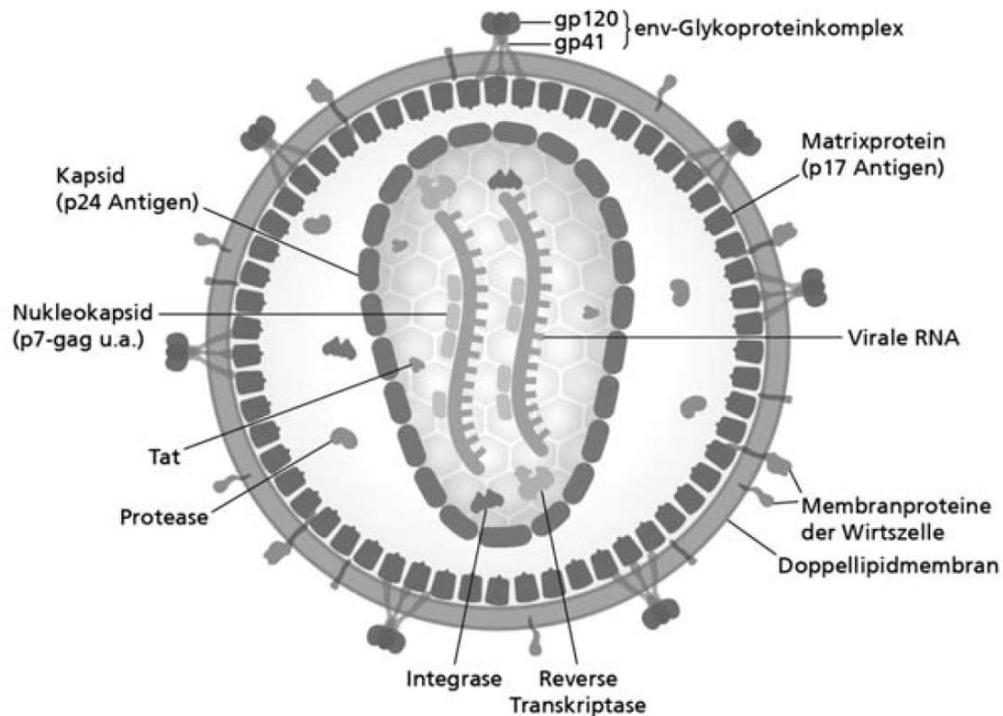
Phylogenetische Analysen sehen den Ursprung von HIV-1 in dem ähnlichen SIV<sub>cpz</sub> (*simian immunodeficiency virus chimpanzee*) aus Schimpansen.<sup>12</sup> Die M-Gruppe scheint dabei die älteste Form zu sein und die Übertragung vom Tier auf den Menschen wird auf die 1920er Jahre geschätzt.<sup>13,14</sup> HIV-2 hingegen stammt wahrscheinlich von SIV<sub>sm</sub> aus Mangaben ab.<sup>15</sup>

Das HI-Virus ist ein Retrovirus der Gattung der Lentiviren und weist somit eine lange Latenzzeit auf.<sup>16</sup> Das Genom von Retroviren liegt als RNA vor und muss vor der Replikation durch eine Wirtszelle in DNA umgeschrieben werden. Das etwa 9 kb umfassende Genom besitzt mehrere Leseraster und hat neben den drei Genen *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), die für strukturelle Proteine kodieren, weitere regulatorische (*tat*, *rev*) und akzessorische Gene (*vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*).<sup>9</sup>

Das Gen *gag* kodiert für die Proteine p17, p24, p7 und p6 der Virushülle. Das Matrixprotein p17 ist mit der Innenseite der Lipiddoppelschicht verbunden, die die äußere Hülle des ungefähr 100 nm großen Virions bildet (Abbildung 2). In der Membran sind neben den etwa  $14 \pm 7$  Env-Glycoproteinkomplexen auch verschiedene zelluläre Membranproteine enthalten.<sup>17,18</sup>

Im Inneren des Viruspartikels befinden sich in einem konischen Kapsid, aufgebaut aus p24-Proteinen, zwei Kopien einzelsträngiger, Sinnstrang-RNA (ssRNA) sowie die Pol-Proteine Integrase und Reverse Transkriptase (RT). Die RNA ist an das Nukleoprotein p7 und Integrase gebunden. Für die erfolgreiche Vermehrung des Virus ist außerdem das Pol-Protein Protease nötig, welches für die Reifung des Virus eine entscheidende Rolle spielt.<sup>9,17</sup>

Die Env-Glycoproteinkomplexe auf der Virusoberfläche setzen sich aus drei Heterodimeren zusammen, die wiederum aus den beiden hochglycosylierten Proteinen gp41 und gp120 bestehen. Das gp41 ist transmembran verankert und nicht kovalent an gp120 gebunden. Gp120 kann spontan freigesetzt werden, was als *shedding* bezeichnet wird. Env ist für die Bindung an die Wirtszellrezeptoren und somit für eine erfolgreiche Infektion essentiell.<sup>19</sup>



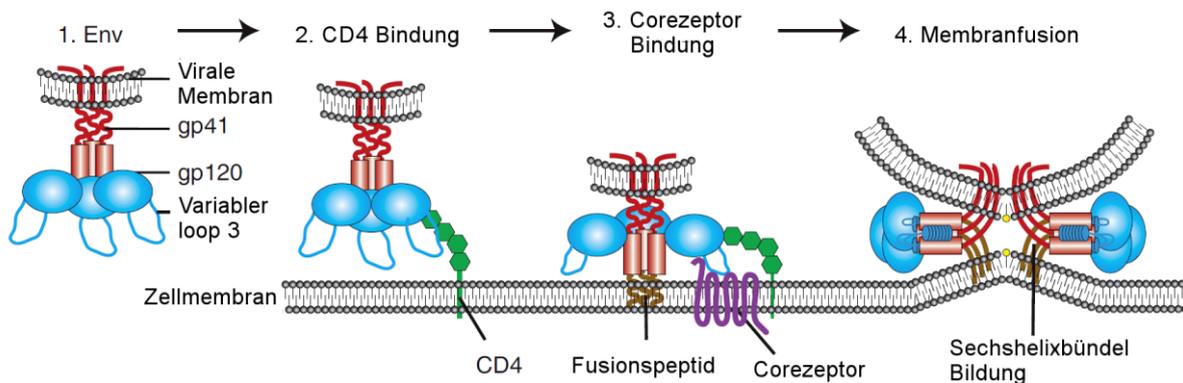
**Abbildung 2:** HI-Viruspartikel: Die Hülle des Virions besteht aus dem Matrixprotein p17 und einer Lipiddoppelschichtmembran, in der sich die Env Spikes, bestehend aus gp41 und gp120, sowie verschiedene Membranproteine der Wirtszelle befinden. Zwei Kopien des viralen Genoms und die viralen Proteine Integrase und Reverse Transkriptase sind von einem konischen Kapsid umgeben.<sup>9</sup>

### 3.3 Mechanismus der Infektion

Der erste Schritt der Infektion ist die Assoziation des Virus an die Zelle. Diese Bindung kann, durch Env vermittelt, spezifisch an den Primärrezeptor CD4 oder unspezifisch an z.B. Proteoglycane oder  $\alpha 4\beta 7$  Integrin auf der Zelloberfläche erfolgen. Ebenfalls möglich ist eine unspezifische Assoziation über verschiedene Wirtszellmembranproteine, die sich ebenfalls in der Virushülle befinden.<sup>17,20</sup> Essentiell für die Infektion ist aber nur die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor, der sich auf verschiedenen Zellen des Immunsystems, wie T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten befindet.<sup>21</sup> Für einen erfolgreichen *entry* benötigt HIV neben dem CD4-Rezeptor einen Corezeptor aus der Chemokinfamilie. Die Epitope für die Interaktion mit dem Corezeptor werden aber erst mit Bindung an CD4 durch eine konformelle Änderung im gp120 freigelegt (Abbildung 3).<sup>22</sup> Bei dem benötigten Chemokin-Corezeptor handelt es sich entweder um CCR5 oder CXCR4.<sup>23,24</sup> Nach Bindung des Corezeptors findet eine weitere strukturelle Änderung statt, die das N-terminale, hydrophobe Fusionspeptid, des gp41 entfaltet, welches sich dann in die Zellmembran insertieren kann. Durch Rückfaltung bildet sich ein Sechshelixbündel, das beide

## 8 | Biologischer Hintergrund

Membranen in räumliche Nähe und somit zum Verschmelzen bringt. Statt durch Fusion kann das Virus auch endozytotisch von der Zelle aufgenommen werden.<sup>20</sup>

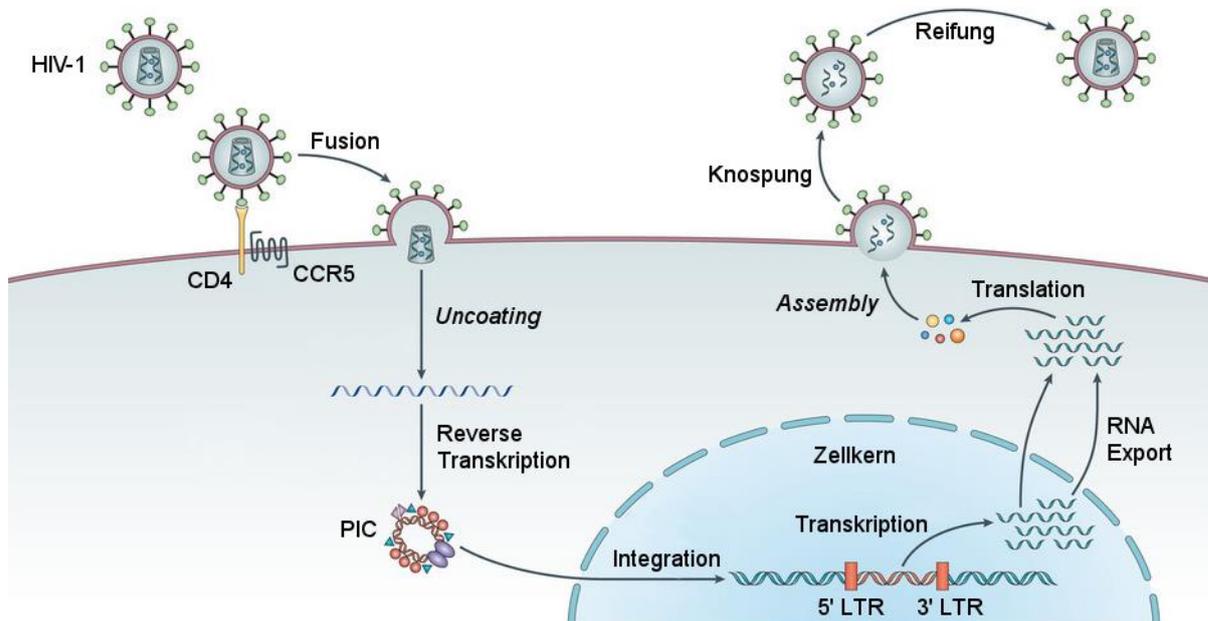


**Abbildung 3:** Entry des HIV: Nach Bindung von gp120 an CD4 werden durch Konformationsänderungen Bindungsepitope freigelegt, die die Bindung an den Chemokin-Corezeptor ermöglichen. Nach weiteren Strukturänderungen inseriert das transmembrane gp41 seine N-terminale Domäne in die Wirtszelle und bringt die Membranen durch Bildung eines Sechshelixbündels in räumliche Nähe, wodurch die Fusion möglich wird.<sup>20</sup>

Anschließend findet das *uncoating* statt, bei dem der Kapsidininhalt ins Zytoplasma entlassen wird. Die RT kann dann direkt mit dem Umschreiben der viralen ssRNA über ein RNA-DNA-Hybrid in doppelsträngige DNA (dsDNA) beginnen (Abbildung 4). Dafür wird der *reverse transcription complex* (RTC) gebildet, dessen Struktur nicht genau bekannt ist, aber in dem zusätzlich zu RT und RNA auch Matrix-, Kapsid- und Nucleoproteine sowie Integrase und Vpr nachgewiesen wurden. Ebenso können zelluläre Restriktionsfaktoren, die der Virusabwehr dienen sollen, Teil des RTC werden und während der DNA-Synthese Mutationen einbauen. Nach neuesten Befunden<sup>25</sup> sind diese Restriktionsfaktoren damit wohl hauptverantwortlich für die große Variabilität des HI-Virus.<sup>26</sup>

Der RTC entwickelt sich im Laufe der reversen Transkription zum Präintegrationskomplex (PIC), der die dsDNA in den Zellkern transportiert. Im Zellkern baut die virale Integrase die dsDNA an einer willkürlichen Stelle ins Wirtsgenom ein, sodass im nächsten Schritt die Transkription durch die zelleigene RNA-Polymerase II erfolgen kann. RNA-Polymerase II hat keine Korrekturfunktion und ist mitverantwortlich für die hohe Variabilität des HIV. Es werden unterschiedlich gespleißte und ungespleißte mRNAs produziert, die für die verschiedenen viralen Proteine kodieren sowie als neues RNA-Genom dienen. Nachdem zunächst Env im Endoplasmatischen Reticulum (ER) translatiert, glycosyliert und über den Golgi-Apparat in die Zellmembran eingebaut wurde, werden die restlichen viralen Vorläuferproteine produziert. Je nach Zelltyp bilden sich an der Zytoplasmamembran oder an intrazellulären Membranen im *assembly* neue Virionen, die durch Exozytose abgeschnürt oder als Virusreservoir ins Lumen des ER gelangen. Die Protease wird erst im entlassenen

Partikel aktiv und prozessiert die Vorläuferproteine, sodass die unreifen Virionen zu infektiösen Viruspartikeln reifen. Nach der Produktion der Virionen stirbt schließlich die Zelle, wodurch das Immunsystem geschwächt wird.<sup>9,17,27</sup>



**Abbildung 4:** HIV-Replikationszyklus: Nach Bindung der beiden Rezeptoren CD4 und CCR5 fusioniert die Virusmembran mit der Zellmembran und entlässt das Kapsid. Im Zytoplasma schreibt RT die ssRNA in dsDNA um, die durch Integrase in das Wirtsgenom eingebaut wird. Nach Expression viraler Vorläuferproteine knospen neue Viruspartikel aus, die sich durch Proteaseaktivität zu reifen Partikeln entwickeln.<sup>28</sup>

### 3.4 Der Corezeptor CCR5

Der 40 kDa schwere Chemokinrezeptor CCR5 ist ein 7-Helixtransmembranprotein (7TM) aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Teil des Immunsystems.<sup>2,29</sup> CCR5 findet sich ebenso wie CD4 auf verschiedenen Leukozyten, wie z.B. Makrophagen, Monozyten oder dendritischen Zellen. Zu den natürlichen Liganden zählen die Chemokine MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  und RANTES, die zu den CC-Chemokinen gehören.<sup>30,31</sup> Es gibt vier Arten der Chemokinrezeptoren, deren Benennung sich aus der Klasse der jeweiligen Chemokin-Liganden (CC, CXC, C, CX3C), einem R für Rezeptor und einer fortlaufenden Nummer ergibt.<sup>32</sup> Chemokine werden als inflammatorisches Warnsignal ausgeschüttet und binden an Chemokinrezeptoren, deren gekoppeltes G-Protein aktiviert wird. Das G-Protein wiederum induziert eine Migration der Leukozyten entlang des Chemokingradienten zur Entzündungsstelle.<sup>33</sup>

Das HI-Virus nutzt den CCR5-Rezeptor vorwiegend in der asymptotischen Phase als Sekundärrezeptor (R5- bzw. M-trop). In der späteren Phase der Erkrankung treten dann vermehrt X4- bzw. T-trope Virusstämme auf, die den CXCR4-Rezeptor bevorzugen. Es gibt



Kurz nachdem 1996 bekannt wurde, dass CCR5 einer der für die HIV-Infektion notwendigen Corezeptoren ist<sup>23</sup>, wurde eine natürliche Mutation im CCR5-Gen entdeckt, die dazu führt, dass homozygote Träger dieses Gens immun gegen M-trope HI-Viren sind.<sup>39</sup> Der Grund ist eine 32 bp Deletion (CCR5 $\Delta$ 32), die ein vorzeitiges Stop-Codon verursacht und wodurch eine verkürzte Form exprimiert wird, die nicht auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Diese Mutation tritt zu 10-20% heterozygot und zu 1-2% homozygot in Kaukasiern auf. In Asiaten und Afrikanern ist CCR5 $\Delta$ 32 praktisch nicht zu finden.<sup>31</sup> Menschen mit dieser Mutation sind gesundheitlich nicht eingeschränkt, haben aber bei Heterozygotie ein deutlich geringeres Risiko einer HIV-Infektion. Homozygote sind immun gegen M-trope Stämme.

Diese Tatsache wurde 2009 in dem einzigartigen Fall des „Berliner Patienten“ dazu genutzt, die bisher einzige Heilung einer HIV-Infektion zu vollbringen.<sup>40</sup> Dem HIV-infizierten Patienten, der ebenfalls an Leukämie erkrankte, wurden Stammzellen eines homozygoten CCR5 $\Delta$ 32 Träger transplantiert. Auch nach Absetzen der ART blieb die Viruslast bisher unter einem detektierbaren Level, womit der Berliner Patient der bisher einzige Mensch ist, der von einer HIV-Infektion geheilt wurde.<sup>41</sup> In einem ähnlichen Fall ließ sich dies Ergebnis aber nicht reproduzieren.<sup>42</sup>

### 3.5 Das virale Glycoprotein gp120

#### 3.5.1 Struktur und Glycosylierung des gp120

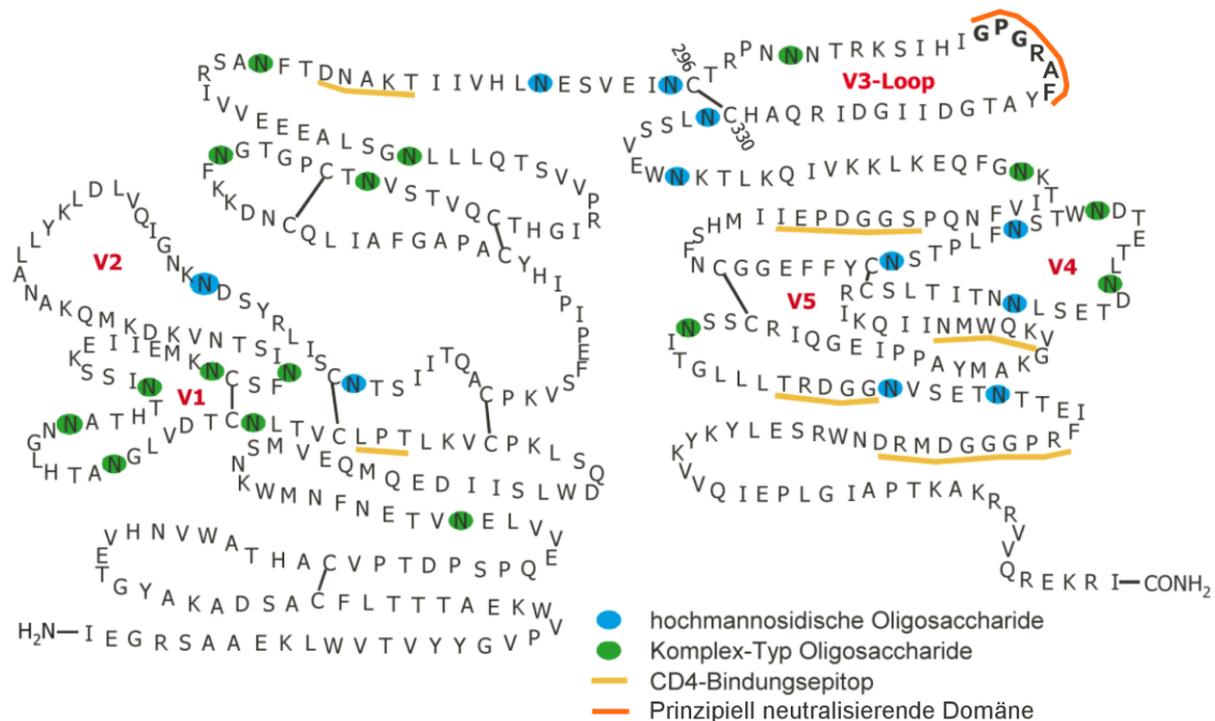
Das Glycoprotein gp120 bildet durch lose Assoziation an gp41 Heterodimere, die wiederum das trimere Protein Env auf der HIV-Oberfläche ausbilden. Beide Env-Untereinheiten werden durch proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins gp160 gebildet. Gp120 weist eine Masse von 120 kDa auf und ist mit 50% Glycosylierungsgrad, bezogen auf die Masse, stark glycosyliert. Je nach Virusstamm hat gp120 eine Länge von 470-500 AS mit durchschnittlich 24 (18 bis 33) Glycosylierungsstellen, die sowohl hochmannosidische als auch Komplextyp-Glycane tragen.<sup>43,44</sup> Im funktionalen Env-Trimer wurde im Vergleich zum rekombinanten, monomeren gp120 ein ungewöhnlich großer Anteil hochmannosidischer Glycane nachgewiesen.<sup>45</sup>

Es handelt sich bei gp120 um *N*-Glycane, die *N*-glycosidisch mit der Seitenkette von Asparaginen (N) verknüpft sind. Die Asparagine sind Teil der Sequenzfolge N-X-S/T, bei der X für eine beliebige Aminosäure, außer Prolin, steht und S/T für Serin oder Threonin. *N*-Glycane lassen sich in hochmannosidische, komplexe und hybride Oligosaccharide einteilen und weisen alle dieselbe *Core*-Struktur auf, die aus zwei *N*-Acetylglucosaminen und

drei Mannosen gebildet wird. Je nach Glycantyp sind noch weitere Mannosen, Galactosen, Fucosen oder Sialinsäuren mit dem Grundgerüst verknüpft.<sup>46</sup>

Die Glycosylierung des gp120 ist u.a. für den viralen *escape*, also dem Ausweichen vor dem Immunsystem, von Bedeutung, indem die Glycane als dynamischer Kohlenhydrat-Schutzschild (*glycan shield*) wirken und die hochkonservierten Bindungsepitope vor neutralisierenden Antikörpern (AK) maskieren.<sup>47,48</sup> Besonders hilfreich für den *escape* ist, dass die Glycane durch zelluläre Mechanismen gebildet werden und somit möglicherweise vom Immunsystem nicht so einfach als fremd erkannt werden.<sup>47</sup> Weiterhin scheinen die Glycane auch einen Einfluss auf die korrekte Faltung des gp160 und somit auf die Infektiosität und Transmission zu haben.<sup>48,49</sup> Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Glycan an N197 Teil des CD4-Bindungsepitops ist.<sup>50</sup>

Wie Abbildung 6 zeigt, weist gp120 fünf hypervariable *loops* (V1-5) auf, die durch fünf konservierte Regionen (C1-5) voneinander getrennt sind. Weiterhin finden sich neun Disulfidbrücken, häufig an der Basis der hypervariablen *loops*, die maßgeblich für die richtige Faltung des Proteins sind.<sup>48</sup>



**Abbildung 6:** Sekundärstruktur von gp120: Fünf hypervariable Regionen (V1-5) sind durch fünf konservierte Domänen (C1-5) voneinander getrennt. Neun Disulfidbrücken bestimmen die räumliche Struktur und außergewöhnlich viele Glycane (blau: hochmannosidisch, grün: komplex) dienen als *glycan shield*. Die CD4-bindenden Epitope sind gelb und die prinzipiell neutralisierende Domäne (s. Abschnitt 3.5.2) ist orange gekennzeichnet.

Die konservierten Bereiche bilden eher den Proteinkern, während die variablen Bereiche die Oberfläche bilden, sodass die Oberflächenvariabilität vermutlich ebenfalls zur Immunevasion beiträgt.<sup>22</sup>

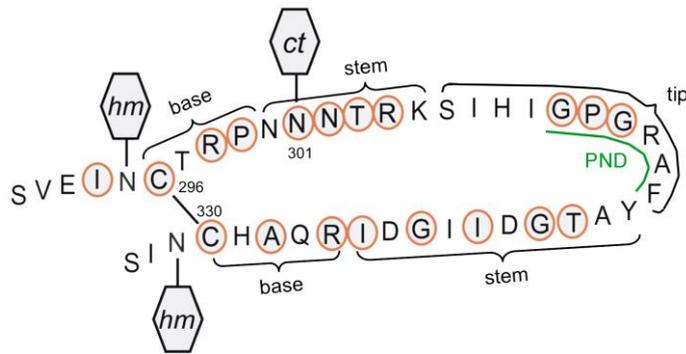
Aus Röntgenstrukturen ist bekannt, dass gp120 eine innere und eine äußere Domäne hat, die durch eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, das *bridging sheet*, miteinander verbunden sind. Die Domänen sind benannt nach der Orientierung im Env-Trimer.<sup>51-54</sup> Während der *V3-Loop* im Env-Trimer in der *Pre-fusion*-Konformation mit dem V1/V2-Bereich des benachbarten Protomers interagiert<sup>53</sup>, ragt er nach Bindung von CD4 und struktureller Änderung etwa 30 Å in Richtung Zellmembran heraus.<sup>51</sup> Die Bindung an den Primärrezeptor CD4 erfolgt über ein diskontinuierliches Epitop (Abbildung 6), das über die Bereiche C1 bis C4, V4 und V5 verteilt ist.<sup>52</sup> Für die Corezeptor-Interaktion sind das *bridging sheet*, gebildet aus C4- und V1/V2- $\beta$ -Faltblättern, sowie die V3-Region von Bedeutung.<sup>2,17,38</sup>

### 3.5.2 Die V3-Region aus gp120

Der *V3-Loop* nimmt im gp120 eine besondere Stellung ein, da die meisten neutralisierenden AK, die das Immunsystem HIV-Infizierter zur Abwehr des Virus bildet, gegen die V3-Region gerichtet sind.<sup>55</sup> Außerdem vermittelt der *V3-Loop* die Bindung an den Corezeptor, was aufgrund der hohen Sequenzvariabilität dieser Region überraschend ist. V3 hat eine Länge von 31 bis 39 AS (im Subtyp B meist 33 AS) und weist in verschiedenen Isolaten Insertionen und Deletionen auf.<sup>51</sup> Dennoch ist diese Region in der Lage, auch nach vielen Mutationen noch an den Corezeptor zu binden. Das ist nur dadurch erklärbar, dass es konservierte Domänen und strukturell konservierte Bereiche geben muss, denn Mutanten ohne V3 sind nicht replikationsfähig.<sup>55-58</sup>

Die Struktur des *V3-Loops* wird durch eine Disulfidbrücke der Cysteine C296 und C330, konservierte, antiparallele  $\beta$ -Stränge sowie ein  $\beta$ -*Hairpin*-Motiv in der Spitze bestimmt (Abbildung 7).<sup>51</sup> Es existieren drei funktionelle Bereiche, *base* (296-299 und 326-330), *stem* (300-305 und 316-325) und *tip* (306-315), von denen die *base* vermutlich an den N-terminalen Teil des CCR5 bindet. *Stem* und *tip* bestimmen den Corezeptortropismus und binden wahrscheinlich an ECL2 aus CCR5.<sup>36,59</sup> Weiterhin finden sich im *loop* an N301 ein komplexes Glycan und flankierend zwei hochmannosidische Glycane (N295 und N331).<sup>60</sup> Diese Glycane sowie jenes an N197 verdecken den *V3-Loop* und dienen so vermutlich als *glycan shield*.<sup>53,61</sup> Bestärkt wird diese Vermutung durch den Umstand, dass Mutanten ohne das N301-Glycan stärker durch neutralisierende AK inhibiert werden.<sup>37</sup> Vom Glycan an N301 ist außerdem bekannt, dass es die Corezeptorspezifität, die Affinität zum CCR5-Rezeptor und

die Infektiosität beeinflusst.<sup>37,61-65</sup> Auch die Disulfidbindung in der V3-Region hat eine wichtige Funktion. Ohne sie wird das Vorläuferprotein gp160 nicht prozessiert, die Faltung von gp120 ist gestört und es finden weder die Bindung an CD4 noch die Fusion mit der Zellmembran statt.<sup>48,58</sup> Weiterhin binden zyklische V3-Peptide den CCR5-Rezeptor mit höherer Affinität.<sup>65</sup>

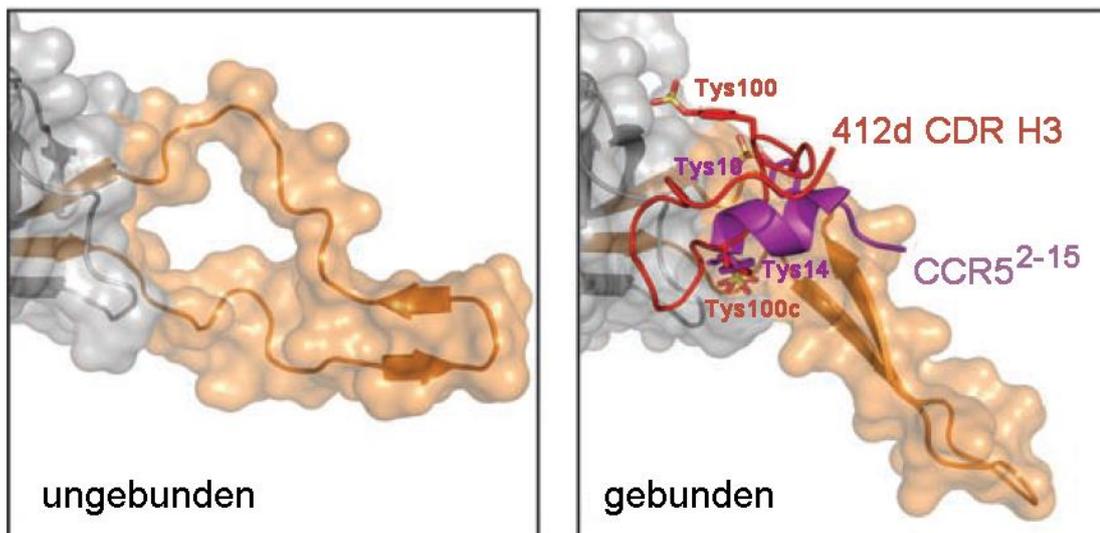


**Abbildung 7:** Konsensussequenz der V3-Region: Gekennzeichnet sind die funktionellen Bereiche *base*, *stem* und *tip*, die prinzipiell neutralisierende Domäne (PND), die Disulfidbrücke, die die *Loop*-Struktur bildet sowie zwei flankierende hochmannosidische (hm) und ein komplexes (ct) Glycan.<sup>51</sup> Die eingekreisten AS sind zu mindestens 94% konserviert.<sup>64,66</sup>

Neben der hoch konservierten Glycosylierungsstelle (NNT) im *stem* gibt es eine weitere hochkonservierte Domäne in der Spitze des V3-Loops, die auch in verschiedenen Subtypen nur wenig variiert.<sup>67</sup> Dieses Motiv wird auch prinzipiell neutralisierende Domäne (PND, Abbildung 7) genannt, da die meisten der neutralisierenden Antikörper, die in Patientenseren gefunden wurden, die PND als Bindungsepitop nutzen.<sup>68,69</sup> Eine langfristige Inhibierung durch diese neutralisierenden AK ist bisher nicht möglich, da sich sehr schnell neue Virusmutanten bilden, um den neutralisierenden AK zu entgehen.<sup>55,69,70</sup> Nicht nur die Sequenz der PND ist hoch konserviert, auch strukturell gibt es wenige Unterschiede zwischen verschiedenen Virusisolaten, was möglicherweise die wichtige Rolle bei der Corezeptorbindung erklärt.<sup>56,71</sup>

Die V3-Region ist metastabil und kann entsprechend verschiedene Konformationen einnehmen.<sup>57</sup> So wechselt der V3-Loop im Env-Trimer vermutlich häufig von der Konformation, die mit der V1/V2-Region interagiert und teilweise durch Glycane verdeckt ist zu der Konformation, die etwa 30 Å aus dem gp120 herausragt und mit dem Corezeptor interagieren kann.<sup>51,53,57</sup> Durch die Bindung an den Corezeptor CCR5 bzw. an ein Fragment aus der *complementarity determining region* (CDR) der schweren Kette 3 (H3) des Antikörpers 412d ändert sich die V3-Konformation ebenfalls drastisch (Abbildung 8). Die *Stem*-Region ist im gebundenen Zustand 7 Å schmaler und bildet eine konservierte

Bindungstasche für das sulfatierte Tyrosin (Tys) des CCR5-Rezeptors. Zudem ist die  $\beta$ -Haarschleife rigider als im ungebundenen Zustand.<sup>38</sup>



**Abbildung 8:** Die V3-Region im ungebundenen Zustand und gebunden an ein 14 AS CCR5-Peptid des N-Terminus (violett) bzw. an das Antikörperfragment 412d CDR H3. Im gebundenen Zustand ist der V3-Stem 7 Å schmäler als im ungebundenen Zustand und bildet eine Bindungstasche für die sulfatierten Tyrosine (Tys).<sup>38</sup>

### 3.6 Therapieansätze

#### 3.6.1 Antiretrovirale Therapie

HIV-Infizierte können mittlerweile dank der antiretroviralen Therapie (ART), die früher als *highly active antiretroviral therapy* (HAART) bezeichnet wurde, fast ein normales Lebensalter erreichen. Momentan gibt es 25 von der FDA (*US Food and Drug Administration*) zugelassene Wirkstoffe gegen vier virale und ein zelluläres Protein, die in Kombination verabreicht werden.<sup>72</sup> Nukleosid-/Nukleotid-analoge-RT-Inhibitoren (NRTI) und Nicht-Nukleosid-/Nukleotid-analoge-RT-Inhibitoren (NNRTI) inhibieren die RT durch Strangabbruch oder allosterisch. Proteaseinhibitoren (PI) binden kompetitiv an der aktiven Stelle der viralen Protease und verhindern die Reifung. Den *entry* verhindern Inhibitoren, die entweder gp41 binden und somit die Fusion verhindern oder welche, die den zellulären Rezeptor CCR5 blockieren. Zuletzt gibt es noch Integraseinhibitoren, die die Integrase am Strangtransfer hindern. Seit 2012 wird die ART für alle Infizierten empfohlen.<sup>73</sup> Wichtig ist jedoch, dass die Medikamente ein Leben lang und sehr regelmäßig eingenommen werden, weil sonst deren Wirkung vermindert wird und neue Resistenzen auftreten können.<sup>74</sup>

Da immer wieder neue resistente Virusstämme entstehen, wird auch weiterhin an der Entwicklung neuer Wirkstoffe geforscht. Viele Studien versuchen z.B. durch neue

Kombinationspräparate bekannter Wirkstoffe die Wirkung zu verbessern und Resistenzen zu minimieren.<sup>75</sup>

Prinzipiell sind alle Proteine und Enzyme des Replikationszyklus potenzielle Angriffspunkte für Inhibitoren, weshalb sich viele Forschergruppen nicht nur auf die Entwicklung weiterer Inhibitoren von RT, Protease, Integrase und CCR5, sondern auch auf neue Ziele, wie z.B. das Gag-Vorläuferprotein oder das Nukleokapsidprotein konzentrieren.<sup>75-77</sup> Es laufen bereits Phase-II-Studien zum Maturationsinhibitor BMS-955176, der das Gag-Protein bindet und somit die Prozessierung durch die virale Protease verhindern soll.<sup>76</sup>

Ein offensichtliches, aber schwierig zu treffendes Ziel zur Inhibierung ist das sehr variable Oberflächenprotein gp120, das den Erstkontakt mit der Zelle vermittelt. Da es sich bei gp120 um ein hochglycosyliertes Protein handelt, dessen Proteinoberfläche stark von Glycanen abgeschirmt wird, gibt es Versuche Wirkstoffe zu finden, die speziell gegen die Kohlenhydrate von gp120 gerichtet sind. Solche *carbohydrate-binding agents* (CBAs) richten sich häufig gegen die ungewöhnlichen, im Menschen sonst nicht vorkommenden, mannosereichen Glycane, führen aber bisher schnell zu Resistenzen. Abhilfe könnte hier, wie bei der ART, eine Kombination mehrerer Wirkstoffe schaffen.<sup>44</sup>

Eine andere Variante das gp120 ins Visier zu nehmen, bietet die passive Immunisierung mit breit neutralisierenden Antikörpern (bnAbs), die den Großteil aller zirkulierenden HIV-Stämme zu neutralisieren vermögen. Fast alle HIV-Infizierten bilden neutralisierende AK gegen das virale Hüllprotein, aber nur sehr wenige, als *HIV-Controller* (HIC) bezeichnete Individuen, sind durch Bildung von bnAbs auch ohne ART in der Lage die Infektion jahrelang zu kontrollieren. Die meisten bnAbs sind gegen vier Epitope gerichtet: die CD4-Bindungsstelle, ein Bereich aus V1/V2 und dem Glycan N160, der *V3-Loop* und das Glycan N332 sowie der membran-nahe Bereich von gp41. Es werden jedoch immer wieder bnAbs gegen weitere Epitope entdeckt.<sup>78</sup> Zuletzt konnten verschiedene bnAbs gegen Env aus HIC-Patienten isoliert und in Studien mit humanisierten Mäusen und Menschen getestet werden.<sup>78-81</sup> Dabei zeigte sich, dass einzeln verabreichte bnAbs in humanisierten Mäusen schnell zu Fluchtmutationen führten, während eine einzelne Injektion einer Kombination aus mindestens drei bnAbs eine Reduktion der Viruslast unter die Nachweisgrenze für 60 Tage ermöglichte.<sup>80</sup> Ein ähnliches Ergebnis konnte mit dem einzeln verabreichten bnAb 3BNC117 in einer Phase-I-Studie in Menschen erzielt werden. Dort wurde die Viruslast durch eine Einzel-Injektion für 28 Tage signifikant reduziert.<sup>79</sup> Somit könnte die Immunotherapie mit einer monatlichen Spritze bald eine Alternative bzw. Ergänzung zur ART mit täglicher Tabletteneinnahme sein.

### 3.6.2 Impfstoffe

Dank der ART ist die HIV-Infektion mittlerweile keine zwangsläufig tödliche, aber doch noch immer eine chronische Krankheit. Bislang ist wenig bekannt zu Langzeit-Nebenwirkungen der ART.<sup>9</sup> Außerdem hat auch noch nicht jeder Zugang zur ART. Daher ist die Entwicklung eines Impfstoffes noch immer das oberste Ziel der HIV-Forschung.

Klassisch wird mit Virusbestandteilen geimpft, wodurch das Immunsystem aktiviert und AK und spezifische zytotoxische T-Zellen produziert werden. Zwei große Phase-III-Studien konnten durch Injektionen von rekombinantem gp120 die Rate der Neuinfektionen nicht senken.<sup>82,83</sup> Das liegt zum Teil daran, dass die konservierten und immunogenen Bereiche, wie z.B. der *V3-Loop* sowohl durch das *glycan shield* als auch durch inaktive Konformationen verdeckt sind. An CD4 gekoppelte, aktive Konformationen hatten eine gesteigerte, aber noch nicht ausreichende Immunogenität.<sup>9</sup>

Die in Thailand durchgeführte Studie RV144 zeigt jedoch, dass die Entwicklung eines Impfstoffes möglich sein sollte. 16000 Thailänder wurden mit Vektoren geimpft, die Gag, Protease und gp120 verschiedener Subtypen exprimieren. Nach einem Jahr gab es in der Versuchsgruppe 60% weniger Neuinfektionen als in der Kontrollgruppe und nach drei Jahren lag die Zahl immerhin noch bei 31%.<sup>84</sup>

Für eine erfolgreich wirkende Immunisierung wird es nötig sein bnAbs zu induzieren, was jedoch schwierig ist, da diese sehr ungewöhnliche, stark mutierte Strukturen im Vergleich zu anderen AK aufweisen.<sup>78,85</sup> Eine Variante bnAbs zu erzeugen wäre, den Weg, den ein AK bis zur Entwicklung zum bnAb zurücklegt, zu reproduzieren. Die bisher einzige Studie zur Coevolution von Virus und bnAb zeigt jedoch, dass das am Ende stark mutierte Hüllprotein den AK zur häufigen Anpassung durch somatische Mutationen zwingt, bevor er zu einem potenten bnAb wird.<sup>86</sup> Somit ist es nötig, die Env-Epitop-Evolution durch sequenzielle Immunisierung zu mimikrieren und so möglicherweise jene B-Zellen zu aktivieren, die für die Keimbahn-Produktion der bnAb-Vorläufer erforderlich sind.<sup>81</sup>

Die zweite Variante wäre das rationelle Design von Immunogenen, die auf Strukturen bereits bekannter bnAbs und deren Ligandepitope basieren. Diese sollen B-Zellen der Keimbahn aktivieren und vermehren, die bnAb-Vorläufer produzieren können.

Zuletzt gelang die Erzeugung eines Immunogens, das in menschlichen B-Zellen bnAb-Vorläufer der VRC01-Klasse induzieren konnte und somit einen möglichen Impfstoffkandidaten darstellt.<sup>87,88</sup>

### 3.6.3 Heilung

Bisher gibt es mit dem Berliner Patient (s. Abschnitt 3.4) erst einen wissenschaftlich bestätigten geheilten Menschen. Da eine Stammzelltherapie mit 50% Mortalitätsrate und auch viel zu wenig verfügbaren Spendern moralisch nicht vertretbar ist, werden andere Methoden der Heilung erforscht.<sup>31,89</sup> Zu unterscheiden sind dabei die Eradikation, also die Entfernung aller latenten Virusreservoirs und die funktionelle Heilung, bei der das Immunsystem soweit gestärkt wird, dass die Infektion auch ohne lebenslange ART unter Kontrolle gehalten wird.

Als zumindest zum Teil funktionell geheilt gelten z.B. der Hamburg-Patient und die VISCONTI-Patienten, die sehr früh nach der Infektion für einige Jahre antiviral behandelt wurden. Nach Absetzen der ART blieb die Viruslast beim Hamburg-Patient bis zuletzt und bei den VISCONTI-Patienten für fast 10 Jahre unter der Nachweisgrenze.<sup>74,90,91</sup>

Die *Kick-and-Kill*-Strategie hat den Ansatz, latent infizierte Zellen anzustoßen, damit sie das Virus aktiv replizieren, um es dann z.B. durch therapeutische Impfungen oder ART zerstören zu können. In einigen Studien wurde bereits getestet, ob durch Gabe von Histone-Deacetylase-Inhibitoren die Transkription des viralen Genoms in latenten Reservoirs aktiviert werden kann. Bisherige Ergebnisse zeigen nur einen moderaten Erfolg, weitere Studien sind im Gange.<sup>89,92</sup> Andere mögliche Wirkstoffe, die z.T. bereits in klinischen Studien getestet werden, sind z.B. Interleukine, Toll-like-Rezeptor-Agonisten oder Protein-Kinase-C-Aktivatoren.<sup>76,92</sup>

Verschiedene Methoden der Gentherapie werden ebenfalls untersucht, sind aber zum Teil noch weit von einer klinischen Anwendung entfernt. Dabei wird einerseits versucht das virale Genom durch veränderte Nukleasen zu entfernen.<sup>93-95</sup> Eine andere Variante versucht mit Zinkfingernukleasen das CCR5-Gen zu beschneiden und so den *entry* des Virus dauerhaft zu verhindern.<sup>31,96,97</sup> Bei all diesen Varianten besteht aber das Problem darin, die Nukleasen in die infizierten Zellen zu bekommen. Dazu werden CD4-T-Zellen entnommen, genetisch verändert und wieder injiziert. Diese veränderten Zellen sollen im Rückenmark anwachsen und sich vermehren.<sup>98</sup> In einer ersten Studie zu Zinkfingernukleasen mit zwölf Personen zeigte sich jedoch kein dauerhafter Effekt.<sup>97</sup>

## 4 Methoden

### 4.1 Synthese von Peptiden und N-Typ-Glycopeptiden

#### 4.1.1 Festphasenpeptidsynthese

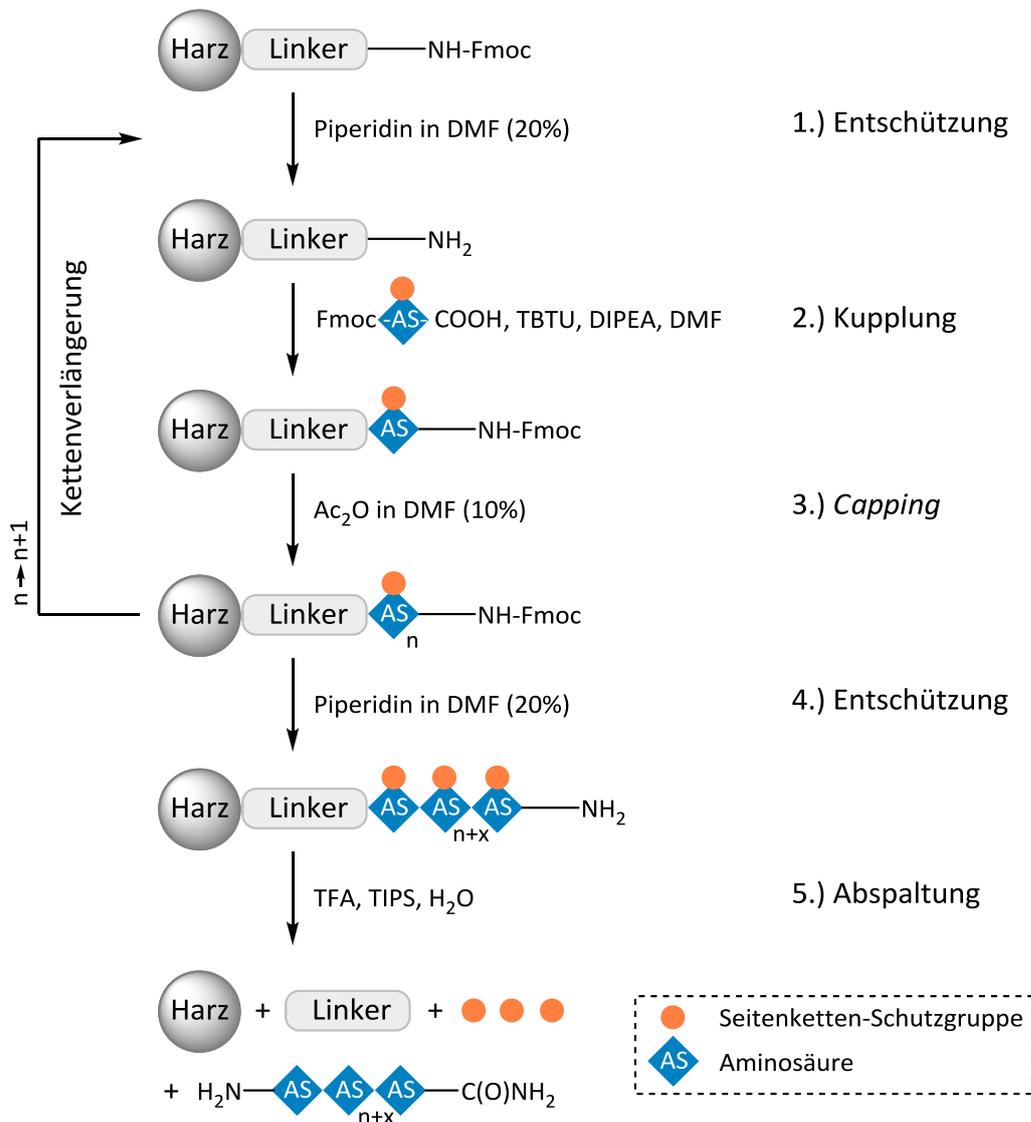
Bei Peptiden handelt es sich um Oligomere, die aus mehreren Aminosäuren bestehen und auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden können. Eine Möglichkeit ist es, die Peptide rekombinant über Expressionssysteme synthetisieren zu lassen. Eine andere Möglichkeit bietet die Verwendung von Peptidasen, die Peptide enzymatisch herstellen können.<sup>99</sup> Die rein chemische Synthese hat den Vorteil, dass die Verknüpfungen der Aminosäuren unter kontrollierten Bedingungen ablaufen und somit auch Glycopeptide oder andere modifizierte Peptide dargestellt werden können.

Bei Aminosäuren handelt es sich um multifunktionale Moleküle, weshalb eine sorgfältig ausgewählte Schutzgruppenstrategie essenziell ist, um unkontrollierte Oligomerisierungen zu vermeiden. Die Seitenketten benötigen Schutzgruppen, die unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil sein müssen, während die  $\alpha$ -Funktionalitäten temporäre, orthogonal abspaltbare Schutzgruppen erfordern. Es ist außerdem nötig, die Carboxylfunktion zu aktivieren, um die Kupplung unter milden Bedingungen durchführen zu können.

Im Labormaßstab findet vor allem die von R. B. Merrifield entwickelte<sup>100</sup> automatisierte Festphasensynthese Anwendung. Sie hat den großen Vorteil, dass überschüssige Reagenzien nach jedem Schritt einfach gewaschen werden können, während das wachsende Peptid an der festen Phase gebunden bleibt. Die Synthese erfolgt dabei vom C- zum N-Terminus und somit gegenläufig zur biologischen Peptidsynthese. Die Festphasenpeptidsynthese der Fmoc-Schutzgruppenstrategie ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Die feste Phase besteht aus einem funktionalisierten Polystyrol-Harz und einem *Linker*, an dem das wachsende Peptid gebunden ist. Zu Beginn müssen die Aminofunktionen entschützt werden, an die die erste Aminosäure gekuppelt werden soll. Die Aminogruppen sind durch die basenlabile Fmoc-Gruppe geschützt. Das bei der Entschützung entstehende Metylenfluoren ist UV-aktiv und lässt die Bestimmung der Rohausbeute zu. Im zweiten Schritt wird die erste aktivierte Aminosäure verknüpft. Als Aktivierungsreagenzien bieten sich Uroniumsalze wie TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium Tetrafluoroborat) oder HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) an, die die Carboxylfunktion *in situ* in Aktivester überführen.<sup>101-103</sup> Nicht vollständig umgesetzte Aminofunktionen werden anschließend durch Acetylierung

blockiert, um Deletionspeptide zu vermeiden. Diese Schritte werden wiederholt, bis das Peptid die gewünschte Länge und Sequenz aufweist. Zuletzt wird das Peptid nach einem letzten Entschützungs Schritt mittels wässriger Trifluoressigsäure (TFA) und unter Zusatz des *scavengers* Triisopropylsilan (TIPS) vom Harz abgespalten. Die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten (Trt-, Pbf, *t*Bu- und Boc-Gruppen) werden dabei ebenfalls entfernt.<sup>103</sup>



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese mit den Schritten 1.) Fmoc-Abspaltung, 2.) Kupplung der Aminosäure ans Harz, 3.) *Capping* freier Aminogruppen, 4.) Fmoc-Abspaltung, 5.) Abspaltung vom Harz und gleichzeitige Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen.

#### 4.1.2 Synthese von disulfidverbrückten, zyklischen Peptiden

Disulfidbrücken spielen in der Natur eine wichtige Rolle bezüglich Aktivität und Struktur von Proteinen und Peptiden.<sup>104,105</sup> Synthetisch können Disulfidbindungen auf verschiedenen Wegen erhalten werden. Entschützung und Oxidation der Cysteine können bei Verwendung

der gleichen Schutzgruppe entweder schrittweise oder simultan erfolgen. Bei Verwendung unterschiedlicher Cystein-Schutzgruppen kann die Bindung durch selektive Entschützung und Aktivierung mit anschließender Disulfidaustauschreaktion gebildet werden. Die letztgenannte Methode ist die aufwendigste der drei Möglichkeiten, die sich vor allem für komplexe Peptide mit mehreren intramolekularen oder Peptide mit intermolekularen Disulfidbindungen anbietet.<sup>106</sup> Die simultane Zyklisierung hat den Vorteil, dass ein Schritt gespart wird, aber den Nachteil, dass die Konzentration so hoch ist, dass es zu Polymerisierungen kommen kann.<sup>107</sup> Die schrittweise Entschützung und Oxidation hat den Vorteil, dass das Peptid vor der Oxidation gegebenenfalls gereinigt werden kann. Alle Methoden unterliegen allerdings der Gefahr von Di-, Oligo- und Polymerisierung. Durch hohe Verdünnung bzw. Pseudoverdünnung lassen sich diese Nebenreaktionen verringern. Pseudoverdünnung bedeutet dabei, dass bei Reaktion an der festen Phase mit einer geringen Belegungsdichte gearbeitet wird.<sup>108,109</sup> Je länger die zu zyklisierenden Peptide sind, umso schwieriger wird allerdings die Vermeidung von intermolekularen Nebenreaktionen.<sup>107</sup> Es können verschiedenste Oxidationsmittel wie z.B. Iod, DMSO oder Sauerstoff genutzt werden. Luftsauerstoff ist dabei eine sehr milde Variante, die keine unerwünschten Rückstände hinterlässt.<sup>106</sup> Als Schutzgruppe der Cysteine stehen ebenfalls viele unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Die Trityl-Schutzgruppe hat den Vorteil, dass die Entfernung zusammen mit der Abspaltung vom Harz in wässriger TFA erfolgt und die Zyklisierung direkt aus dem verdünnten Rohprodukt möglich ist. Allerdings muss dabei streng unter Inertgasatmosphäre gearbeitet werden, um die Polymerisierung zu vermeiden. Einfacher ist da die Verwendung einer orthogonal abspaltbaren Schutzgruppe, wie der *tert*-Butylthio-Gruppe (StBu). So ist die Reinigung des Peptids mittels HPLC möglich, bevor die StBu-Gruppen reaktiv durch niedermolekulare Dithiole wie z.B. Dithiothreitol oder  $\beta$ -Mercaptoethanol entfernt werden.<sup>110,111</sup>

#### 4.1.3 N-Typ-Glycopeptidsynthese

Glycosylierungen stellen eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und Peptiden dar.<sup>46,112</sup> Synthetisch lassen sich N-Typ-Glycopeptide ebenso wie Peptide enzymatisch, biochemisch oder chemisch herstellen. Die enzymatische Synthese erfordert jeweils spezifische Glycosyltransferasen, die nicht immer zur Verfügung stehen.<sup>113</sup> Bei der Synthese mit Hilfe von Expressionssystemen tritt keine heterogene Glycosylierung auf, da diese spezie- und zelltypspezifisch ist.<sup>114,115</sup> Eine gute Alternative bietet daher die

chemische Synthese, mit der ein einheitliches Glycosylierungsmuster bei definierter Sequenz erzielt werden kann.

Es lassen sich zwei grundsätzliche Synthesestrategien unterscheiden. Entweder kann das Glycan in einer konvergenten Synthese mit dem fertigen Peptid verknüpft werden oder ein glycosylierter Asparaginbaustein wird in einer sequenziellen bzw. Blocksynthese eingesetzt. Für die konvergente Synthese werden Aspartate mit orthogonalen Schutzgruppen (z.B. Allyl) verwendet, die im Anschluss an die Peptidsynthese mit Glycosylaminen umgesetzt werden.<sup>116</sup> Dies hat den Vorteil, dass weniger vom wertvollen Glycan benötigt wird, da es erst am Ende der Synthese zum Einsatz kommt. Der Nachteil an diesem Vorgehen ist jedoch, dass es vorkommen kann, dass eine vorliegende Sekundärstruktur den Zugang zur Glycosylierungsstelle erschwert. In diesem Arbeitskreis wurden in der Vergangenheit keine guten Erfahrungen mit dieser Methode gemacht.<sup>117,118</sup>

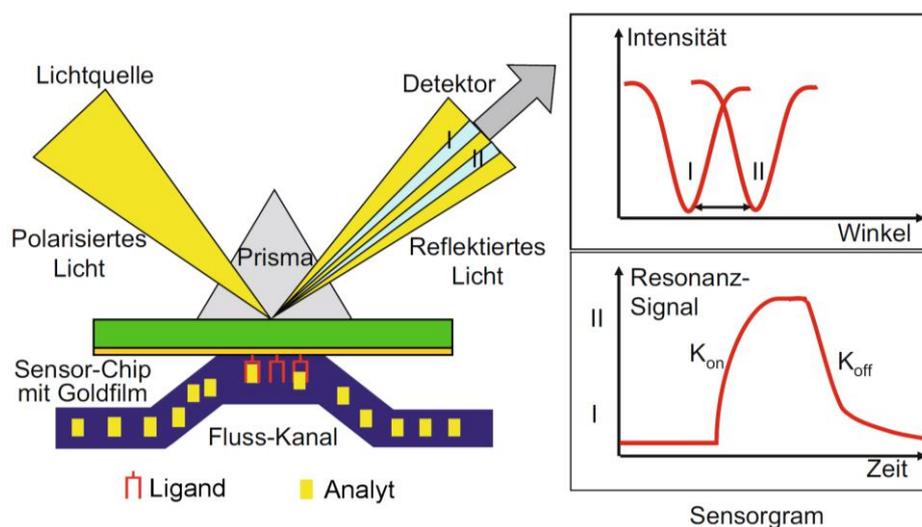
Die alternative Methode mit glycosylierten Asparaginbausteinen erfordert eine weniger aufwendige Schutzgruppenstrategie und ermöglicht die Synthese von mehrfach glycosylierten Peptiden. Sie hat allerdings den Nachteil, dass eine größere Menge Saccharid benötigt wird. Zunächst muss nämlich der Baustein in mehreren Schritten synthetisiert werden und weiterhin gibt es unvermeidlich Ausbeuteverluste durch nicht quantitativ verlaufende, nachfolgende Aminosäurekupplungen. Das Glycan muss zudem die restlichen Kupplungen sowie die Abspaltung vom Harz überstehen, weshalb meist Hydroxyl-geschützte Glycosylbausteine eingesetzt werden.<sup>119</sup> Mit diesem Verfahren lassen sich auch weiterhin hochreaktive Aktivierungsreagenzien wie TBTU und HATU einsetzen. Die sterisch anspruchsvollen saccharidischen Schutzgruppen scheinen jedoch einen negativen Einfluss auf die Kupplungsdauer zu haben.<sup>120</sup> Die Verwendung ungeschützter Kohlenhydrate ist ebenfalls möglich, bedarf dann aber des Einsatzes weniger reaktiver Reagenzien wie z.B. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder Pentafluorphenyl-aktivierte (Pfp) Aminosäuren.<sup>121-123</sup> Bei letzterer Vorgehensweise muss zusätzlich das *Capping* unreaktiver Aminogruppen angepasst werden.<sup>124,125</sup>

Ein Problem bei der chemischen Glycopeptidsynthese stellt die Aspartimidbildung dar.<sup>126</sup> Dabei kann es unter basischen Bedingungen zur Bildung eines Succinimidringes kommen, was zur Racemisierung des Peptids führt.<sup>127</sup>

## 4.2 Oberflächenplasmonenresonanz

Seit 1983 die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) zum ersten Mal für Biosensoren genutzt wurde<sup>128</sup>, hat sich die Methode zu einem Standardwerkzeug für

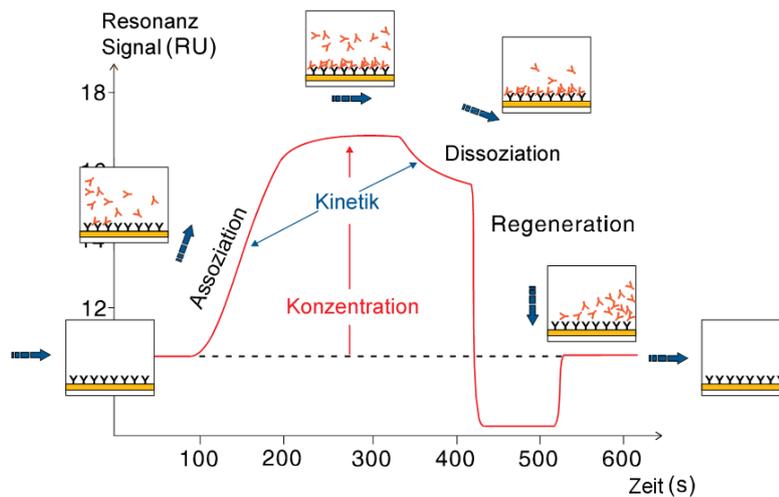
die Detektion von (bio)molekularen Interaktionen entwickelt. Dabei wird ausgenutzt, dass angeregte Oberflächenplasmonen extrem sensitiv auf Änderungen des Brechungsindex im umgebenden Medium reagieren.<sup>129,130</sup> Der prinzipielle instrumentelle Aufbau moderner Geräte ist in Abbildung 10 gezeigt.<sup>131</sup> Eine Lichtquelle strahlt p-polarisiertes Licht durch ein Prisma unter Totalreflexion auf eine Goldschicht, wodurch die freien Elektronen im Metall mit den Photonen interagieren und Oberflächenplasmonen angeregt werden. Im Metall entsteht ein Evaneszenzfeld, welches auch noch über die Goldschicht hinaus, bis in das vorbeifließende wässrige Medium, wirkt. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes liegt bei etwa der Hälfte der Wellenlänge der Lichtquelle, also ca. 200 nm. Die Anregung der Oberflächenplasmonen ist winkelabhängig, wobei das reflektierte Licht beim Resonanzwinkel ein Intensitätsminimum aufweist (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** SPR-System bestehend aus einer Lichtquelle, die polarisiertes Licht durch ein Prisma auf den Sensor-Chip strahlt. Das Licht wird an der Goldoberfläche reflektiert und die Intensität detektiert. Durch immobilisierte Liganden auf der anderen Seite der Goldschicht, an die vorbeiströmende Analyten binden können, ändert sich der Brechungsindex des Mediums, was eine Intensitätsänderung zur Folge hat.<sup>131</sup>

Auf die Goldschicht ist eine funktionalisierte Dextran-Matrix aufgebracht, an die einer der zu untersuchenden Bindungspartner gekuppelt wird. Am immobilisierten Liganden wird ein gelöster bzw. suspendierter Analyt vorbeigeleitet. Ändert sich in direkter Umgebung der Goldschicht der Brechungsindex, wie im Falle einer Massenzunahme durch Wechselwirkung von Analyt und Ligand, verschiebt sich das Intensitätsminimum und es ist ein Anstieg des Resonanzsignals beobachtbar.<sup>132</sup> Das Signal entspricht dabei der zeitlichen Veränderung des Resonanzwinkels in *response unit* (RU), wobei die Änderung nahezu proportional zur Massenzunahme ist.<sup>133</sup> Ein Anstieg um 1 RU entspricht in etwa einer gebundenen Masse von  $1 \text{ pg/mm}^2$ .<sup>132</sup> Der zeitliche Verlauf des Resonanzsignals wird Sensorgramm (Abbildung 11) genannt und beginnt nach der Injektion des Analyten mit der Assoziation und dem Anstieg

der Kurve. Nach Ende der Injektion dissoziiert ein Teil des gebundenen Analyten, wodurch das Signal wieder abfällt. Um vollständig zur Basislinie zurückzukehren, wird mit einer geeigneten Lösung regeneriert.



**Abbildung 11:** Verlauf eines idealen SPR-Sensorgramms: Während der Assoziation wird der Analyt vom Liganden gebunden und das Resonanzsignal steigt bis zu einer Sättigung an. Nach Ende der Injektion dissoziiert ein Teil der Analyten, während bei der Regeneration sämtliche Analytmoleküle dissoziieren. Im Anschluss wird die anfängliche Basislinie wieder erreicht.<sup>134</sup>

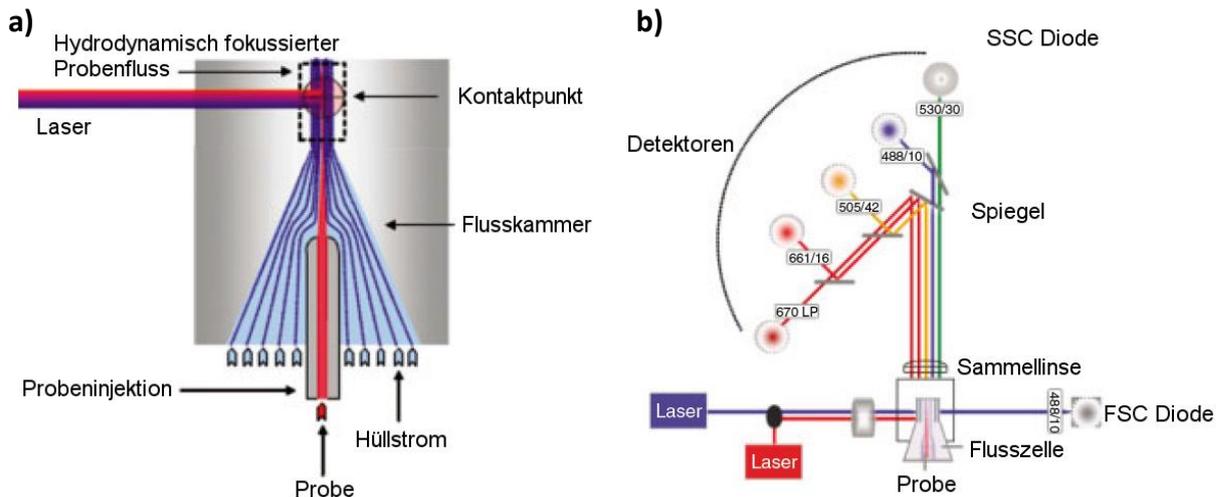
Durch Aufnahme der Sensorgramme mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen lässt sich die thermodynamische Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmen. Dazu werden die Sättigungswerte  $RU_{max}$  gegen die jeweiligen Konzentrationen  $c_B$  der Analytlösung aufgetragen. Eine Anpassung an das *One-site-binding*-Modell aus Gleichung (1) liefert die Dissoziationskonstante.

$$RU(c_B) = \frac{RU_{max} \cdot c_B}{K_D + c_B} \quad (1)$$

### 4.3 Durchfluszytometrie

Bei der Durchfluszytometrie handelt es sich um ein optisches Verfahren zur Charakterisierung, Quantifizierung und Sortierung einzelner Zellen.<sup>135</sup> Ein oder mehrere Laser bestrahlen vorbei fließende Zellen, die durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt vorliegen. Die hydrodynamische Fokussierung wird, wie in Abbildung 12a erkennbar ist, durch einen Hüllstrom gewährleistet. Dieser Hüllstrom weist andere Werte für Druck, Geschwindigkeit und Dichte auf als der Probenfluss, wodurch verhindert wird, dass beide Flüssigkeiten sich mischen.<sup>136</sup> Das eingestrahelte Licht wird an der Zelle gestreut und gleichzeitig kann ein vorhandener Fluoreszenzfarbstoff angeregt werden, sodass

verschiedene Emissionen gleichzeitig detektiert werden können (Abbildung 12b). Dabei werden zwei verschiedene Arten der Streuung detektiert. In einem flachen Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $10^\circ$  wird die Vorwärtsstreuung (FSC, *forwards scatter*) und senkrecht zum Laserstrahl das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideways scatter*) detektiert. FSC liefert Informationen über Größe und Form der Zellen, während SSC abhängig von komplexer Mehrfachstreuung an intrazellulären Kompartimenten ist und somit Auskunft über die Granularität der Zellen gibt.<sup>137</sup>



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers: **a)** Hydrodynamische Fokussierung der Probe durch umgebenden Hüllstrom mit anderem Druck und anderer Geschwindigkeit und Dichte. **b)** Aufbau eines Durchflusszytometers. Ein oder mehrere Laser treffen senkrecht in dem hydrodynamisch fokussierten Probenfluss auf die vereinzelt Zellen. Dabei werden sowohl mögliche Fluoreszenzfarbstoffe angeregt als auch das Licht gestreut (FSC und SSC) und die jeweiligen Emissionen detektiert.<sup>136</sup>

Zellen können, je nach Fragestellung, mit verschiedenen Typen von Fluorochromen markiert werden, sodass zusätzlich zur Streuung ihre Fluoreszenz gemessen werden kann. Dabei ist es möglich, dass sowohl mehrere Zelltypen als auch unterschiedliche Farbstoffe gleichzeitig in einer Probe vorliegen und nebeneinander mittels *photomultiplier* (FL1, FL2, FL3...) detektiert werden können.

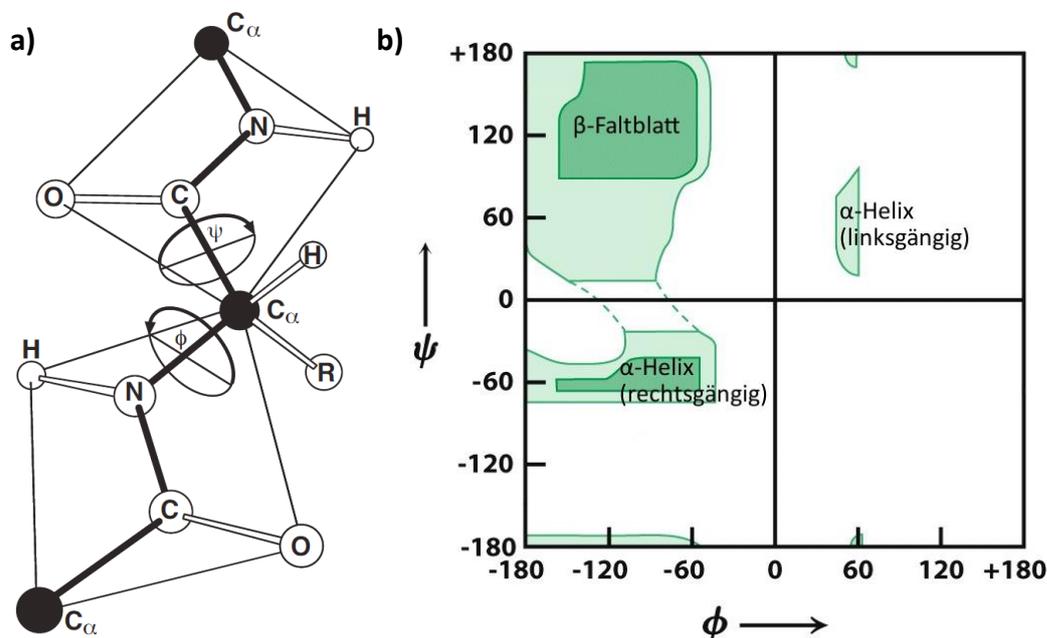
Zur Untersuchung des Phänotyps bieten sich beispielsweise Fluorochrom-gelabelte Antikörper an, die spezifisch ein Antigen auf der Zelloberfläche binden. Ein Beispiel für ein Fluorochrom, das an einen Antikörper gekoppelt werden kann, ist das Phycoerithrin (PE) aus Algen, das grün-blaues Licht absorbiert.<sup>138</sup> Es können natürlich nur Farbstoffe verwendet werden, die durch die Wellenlänge des vorhandenen Lasers angeregt werden können.

Die Ergebnisse lassen sich entweder eindimensional als Histogramm oder zweidimensional als *Dotplot* darstellen. Dabei werden zwei Intensitäten gegeneinander aufgetragen, wobei jeder Punkt einer Zelle entspricht. Es können alle gemessenen Emissionen (FSC, SSC, FL1

usw.) gegeneinander aufgetragen werden, wodurch Bereiche bestimmter Eigenschaften ermittelt werden, die zur Zellsortierung genutzt werden können.<sup>137,138</sup>

#### 4.4 Konformationsanalyse von Peptiden

Peptide haben viele frei drehbare Bindungen und somit viele mögliche Konformationen. Diese lassen sich durch die Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$  beschreiben, die in Abbildung 13a gezeigt sind. Neben der Röntgenkristallstrukturanalyse bietet die NMR-Spektroskopie eine weitere Möglichkeit zur Strukturaufklärung von Peptiden. Aus NMR-Daten können Diederwinkel sowie Abstände von Protonen ermittelt werden, mit denen sich Konformationen berechnen lassen.<sup>131</sup>



**Abbildung 13:** Peptidkonformationen lassen sich mit Hilfe der Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$  beschreiben: **a)** Der Winkel  $\phi$  beschreibt die Drehung um die N-C $\alpha$ -Bindung, der Winkel  $\psi$  die Drehung um die C $\alpha$ -C(O)-Bindung. **b)** Im Ramachandran-Plot sind beide Diederwinkel gegeneinander aufgetragen, erkennbar sind verschiedene erlaubte Bereiche.<sup>131,139</sup>

Da die Größe von  $^3J$ -Kopplungskonstanten winkelabhängig ist, lassen sich aus experimentell bestimmten  $^3J$ -Kopplungskonstanten entsprechende Diederwinkel berechnen. Den mathematischen Zusammenhang zwischen Torsionswinkel  $\phi$  und der Kopplungskonstante  $J$  liefert die Karplus-Gleichung (2). Bei A, B und C handelt es sich um empirische Karplus-Koeffizienten, die abhängig von den beteiligten Kernen und deren Substituenten sind.<sup>140</sup>

$$^3J = A \cdot \cos^2 \phi + B \cdot \cos \phi + C \quad (2)$$

Eine Lösung der Karplus Gleichung (2) für Peptide wird durch Parametrisierung und quantenmechanische Rechnungen erhalten und ist in Gleichung (3) gezeigt.<sup>141</sup>

$${}^3J_{H_N H_\alpha}(\phi) = 6.7 \cdot \cos^2(\phi - 60^\circ) - 1.3 \cdot \cos(\phi - 60^\circ) + 1.5 \quad (3)$$

Durch Auflösung von Gleichung (3) nach  $\phi$  wird Gleichung (4) erhalten, welche bis zu vier mögliche Lösungen hat. Die erhaltenen Winkel sollten in den erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots (Abbildung 13b) liegen. Ramachandran *et al.*<sup>142</sup> haben durch *Hard-sphere*-Modelrechnungen Winkelbereiche ermittelt, bei denen die Van-der-Waals-Radien der einzelnen Atome nicht miteinander kollidieren.

$$\phi = 60^\circ \pm \arccos \left[ \frac{1.3}{13.4} \pm \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)} \right] \quad (4)$$

Zusätzlich zu Winkeln können auch Abstände aus NMR-Experimenten erhalten werden. Durch den *nuclear Overhauser effect* (NOE) ist es möglich, interatomare Abstände aus der dipolaren Kopplung zweier Protonen zu ermitteln. Der NOE nutzt den Umstand, dass ein Kern S, der durch einen Sättigungspuls aus seinem thermodynamischen Gleichgewicht gebracht wurde, zum Gleichgewichtszustand zurückkehren will. Dabei kann es zu Null- und Zweiquantenübergängen kommen, die einen benachbarten Kern I in seiner Signalintensität beeinflussen. Die Wahrscheinlichkeit solcher Übergänge ist abhängig von dem Abstand zum benachbarten Kern, den gyromagnetischen Verhältnissen der Kerne I und S, der Korrelationszeit sowie der Spektrometerfrequenz. Im 2D-NOESY-Experiment werden die Kreuzrelaxationen für alle Protonen gleichzeitig detektiert.<sup>143</sup> Die Verstärkung der Intensität von Kern I durch Sättigung von Kern S wird durch die Solomon-Gleichung (5) beschrieben.<sup>144,145</sup>

$$f_I(S) = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} \equiv \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1 + W_2} \right] \quad (5)$$

Wobei:  $f_I(S)$  = Verstärkung der Intensität des NOE-Signals von Kern I bei Sättigung von S,  $W_0$  = Nullquantenübergangswahrscheinlichkeit,  $W_1$  = Einquantenübergangswahrscheinlichkeit,  $W_2$  = Zweiquantenübergangswahrscheinlichkeit,  $\sigma_{IS}$  = Kreuzrelaxationsrate,  $\rho_{IS}$  = Eigenrelaxationsrate,  $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis

Die Kreuzrelaxationsrate  $\sigma_{IS}$  beschreibt den Aufbau des NOEs, während die Eigenrelaxationsrate  $\rho_{IS}$  den Abfall der Signalintensität und damit den Abbau des NOEs beschreibt. Die Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate vom Abstand  $r_{IS}$  zweier Kerne ist in Gleichung (6) zu sehen.<sup>144</sup>

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0 \propto \frac{\gamma^4}{r_{IS}^6} \cdot \left[ \frac{6 \cdot \tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - \tau_c \right] \quad (6)$$

Wobei:  $\omega_0$  = Larmorfrequenz,  $\tau_c$  = Korrelationszeit,  $r_{IS}$  = Abstand der Kerne I und S

Um interatomare Abstände bestimmen zu können, müssen mehrere NOESY-Experimente mit unterschiedlichen Mischzeiten durchgeführt werden. Die erhaltenen Kreuzpeakvolumina lassen sich gegen die Mischzeit auftragen und ergeben so eine NOE-Aufbaukurve, deren Kinetik im Idealfall der doppel-exponentiellen Funktion (7) entspricht.<sup>146</sup> Der NOE steigt an bis im Maximum Kreuz- und Eigenrelaxationsrate denselben Wert haben und fällt dann schließlich ab, sobald die Eigenrelaxation überwiegt (Gleichung (5)).

$$V_{Kreuzpeak} = P_0 \cdot e^{-P_2 \tau_m} \cdot (1 - e^{-P_1 \tau_m}) \quad (7)$$

Wobei:  $V_{Kreuzpeak}$  = Kreuzpeakvolumen,  $\tau_m$  = Mischzeit,  $P_0, P_1$  und  $P_2$  = dimensionslose Parameter

Die Kreuzrelaxationsrate entspricht der Anfangssteigung der Kurve, die aus der Ableitung von Gleichung (7), dem Produkt der Parameter  $P_0$  und  $P_1$ , erhalten wird. Die Abstände werden anschließend mittels eines Referenzabstandes berechnet (Gleichung (8)), da die Korrelationszeit meist unbekannt ist. Als Referenzabstand können geminale oder vicinale, aromatische Protonen mit konstantem Abstand genutzt werden.<sup>144</sup>

$$r_{IS} = r_{ref} \cdot \left( \frac{\sigma_{ref}}{\sigma_{IS}} \right)^{-6} \quad (8)$$

Wobei:  $r_{IS}$ ,  $r_{ref}$  = Abstand der Kerne I und S sowie der Referenzprotonen,  $\sigma_{IS}$ ,  $\sigma_{ref}$  = Kreuzrelaxationsrate der Kerne I und S sowie der Referenzprotonen

Mit Hilfe der berechneten Winkel und Abstände lassen sich 3D-Strukturen generieren, die der zeitlich gemittelten Konformation des Peptids entsprechen. Zur Berechnung solcher Strukturen werden *Distance-geometry*-Algorithmen (DG) verwendet, die die NMR-Daten als Beschränkungen nutzen und in räumliche Koordinaten übersetzen. Das verwendete Programm CYANA (*combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications*) nutzt das ECEPP-Kraftfeld<sup>147,148</sup> zur Berechnung von Konformationen. CYANA variiert die Torsionswinkel statt der kartesischen Koordinaten, wodurch die Rechnungen sehr viel effizienter ablaufen als bei Moleküldynamik-Simulationen. Die Konformationen werden in mehreren Zyklen den vorgegebenen Beschränkungen der NMR-Daten angepasst, wobei realistische Winkel und Abstände eingehalten werden. Das Programm gibt für jede Konformation *Target-function*-Werte aus, die angeben, wie gut die ursprünglichen

Beschränkungen eingehalten werden. Je kleiner der Wert, desto besser werden die Vorgaben erfüllt. DG-Rechnungen berücksichtigen bei der Berechnung der Konformere allerdings keine energetischen Aspekte.<sup>149,150</sup>

#### 4.5 Molecular Modeling

Das Verhalten von Molekülen, die Darstellung und Bearbeitung von dreidimensionalen Molekülstrukturen sowie deren physikochemischen Eigenschaften lassen sich mit Hilfe des *molecular modeling* berechnen. Heutzutage findet *molecular modeling* besonders im rationalen Wirkstoffdesign Anwendung, bei dem Wirkstoffe anhand von bekannten Strukturmodellen gefunden werden. Die benötigten Strukturen werden entweder experimentell mittels NMR oder Röntgenkristallstrukturanalyse oder mit Hilfe von Homologiemodellen ähnlicher Strukturen erhalten.

Zur Modellierung größerer Moleküle wie Proteine und Peptide sind quantenmechanische Rechnungen, die auf der Gesamtheit der beteiligten Elektronen basieren, nicht mehr geeignet. Stattdessen werden Kraftfelder verwendet, die die Energien des Systems abhängig von Atompositionen berechnen und dafür die klassische Mechanik benutzen.<sup>151</sup>

In die potenzielle Energie eines Systems fließen kovalente Interaktionen wie Bindungslängen, -winkel und Rotationen um Bindungen (Torsionswinkel) ebenso ein wie nicht kovalente elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen (Gleichung (9)).<sup>152</sup>

$$E_{Total} = E_{Bindung} + E_{Winkel} + E_{Torsion} + E_{Coulomb} + E_{vdW} \quad (9)$$

Kraftfelder sind empirisch ermittelt und nutzen Standardwerte für Atomabstände und -winkel und bestrafen Abweichungen von diesen Werten durch erhöhte Energiewerte. Einige Kraftfelder nutzen weitere Terme, die z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder die Planarität von aromatischen Systemen berücksichtigen.

Mit Hilfe eines Minimierungsalgorithmus wird die Molekülgeometrie schrittweise verändert, um die Energie eines Systems zu verringern. Bindungswinkel und -längen werden variiert, um lokale Energieminima zu finden. Das globale Energieminimum eines Systems kann so nicht gefunden werden, weil zu große Energiebarrieren überwunden werden müssten.<sup>151</sup>

Eine Möglichkeit, mit der das globale Energieminimum möglicherweise gefunden werden kann, ist eine Moleküldynamik-Simulation (MD, *molecular dynamics*). MD-Simulationen simulieren das dynamische Verhalten eines Moleküls und liefern so viele verschiedene

Konformationen und deren Energien im zeitlichen Verlauf. In diskreten Zeitabschnitten werden mit Hilfe der Newtonschen Bewegungsgleichungen Trajektorien berechnet, die die Geschwindigkeiten und Raumkoordinaten jedes Atoms beschreiben.<sup>151,153,154</sup> Wie das Molekül sich bewegt, ist abhängig vom gewählten Kraftfeld. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das OPLS-2005-Kraftfeld verwendet.<sup>155,156</sup> Vor der MD-Simulation werden zur Ausgangsstruktur noch Lösungsmittel-Moleküle, hier Wasser, sowie Ionen hinzugefügt, um den physischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen.

## 5 Zielsetzung der Arbeit

Einer der essenziellen Bestandteile von HIV-1 ist die V3-Region des gp120. Trotz hoher Sequenzvariabilität ist diese Region für die Bindung an den Corezeptor CCR5 verantwortlich und damit für die erfolgreiche Infektion des Virus. Dementsprechend muss es neben den variablen auch konservierte Bereiche bzw. Strukturmerkmale geben, die die Bindung an CCR5 garantieren. HIV-Infizierte entwickeln häufig Antikörper, die hauptsächlich gegen die hochkonservierte prinzipiell neutralisierende Domäne (PND) des V3-Loops gerichtet sind. Diese Art der Antikörper vermögen jedoch nicht, das Virus langfristig zu neutralisieren.

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Analyse von V3-Peptiden und -Glycopeptiden, denen die PND fehlt. Zukünftig sollen diese Peptide zur Selektion von Antikörpern genutzt werden, welche die V3-Region an anderer Stelle als der PND erkennen, binden und inhibieren könnten. Statt der immundominanten PND sollte eine Sequenz aus zwei Aminosäuren (P und S) eingefügt werden, deren Prolin das natürliche  $\beta$ -turn-Motiv gewährleisten sollte.<sup>157</sup> Die Peptide und Glycopeptide sollten auf der von J. Dojahn beschriebenen Konsensussequenz basieren und über eine Disulfidbrücke der endständigen Cysteine zyklisiert werden.<sup>64</sup> Die dominanten Bindungseffekte des Saccharids an N301 zum CCR5-Rezeptor gehen vermutlich von den ersten beiden N-Acetylglucosaminen des N-Typ-Glycans aus. Aus diesem Grund sollte Chitobiose für die Glycopeptidsynthese verwendet werden, da sie den ersten beiden Monosaccharideinheiten des natürlichen Glycans entspricht.

Weiterhin sollte die Bindung der V3-Peptide und -Glycopeptide an den CCR5-Rezeptor mit Hilfe von SPR-Experimenten charakterisiert werden. Dabei ist vor allem interessant, ob die Trunkierung einen negativen Effekt auf die Affinität zu CCR5 ausübt. Der membranständige Rezeptor steht in Form von CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Zellen zur Verfügung, die dafür kultiviert werden sollten.

Neben dem Einfluss der Trunkierung auf die Bindung ist auch der Einfluss auf die Struktur relevant. Daher sollten sowohl Strukturvorhersagen mittels *molecular modeling* als auch Konformationsanalysen der synthetisierten zyklischen Peptide mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden. Außerdem sollten mit der ersten veröffentlichten CCR5-Röntgenstruktur *In-silico*-Studien mit dem trunkierten und dem nativen V3-Loop durchgeführt werden.

Für die zukünftige Selektion von Antikörpern wären V3-Glycopeptide, die ein Nonasaccharid als Glycan tragen ebenfalls interessant, weshalb Vorversuche zur Optimierung der Synthese von V3-Glycopeptiden, die Isolierung des Nonasaccharids und eine Strukturvorhersage des Nonasaccharid-V3-Peptids mittels *molecular modeling* durchgeführt werden sollten.



## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Synthese der Peptide und Glycopeptide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden trunkierte Peptide und Glycopeptide des *V3-Loops* aus HIV synthetisiert und charakterisiert, denen die prinzipiell neutralisierende Domäne (PND) fehlt. Als Glycan an der Glycosylierungsstelle N301 wurde Chitobiose gewählt, da die dominanten Bindungseffekte bezüglich des CCR5-Rezeptors vermutlich hauptsächlich von den ersten zwei Monosaccharideinheiten des natürlichen Glycans ausgehen. Während der Synthese des für diese Arbeit wichtigen Chitobiose-Glycopeptids wurden verschiedene literaturbekannte Synthesestrategien getestet, um die Glycopeptidsynthese im Hinblick auf eine zukünftig interessante Synthese von V3-Glycopeptiden mit einem Nonasaccharid als Glycan zu optimieren. Das entsprechende Nonasaccharid muss aufwändig isoliert werden und wird in geringeren Mengen erhalten als Chitobiose, weshalb es unerlässlich ist die optimalen Synthesebedingungen der V3-Glycopeptidsynthese zu kennen.

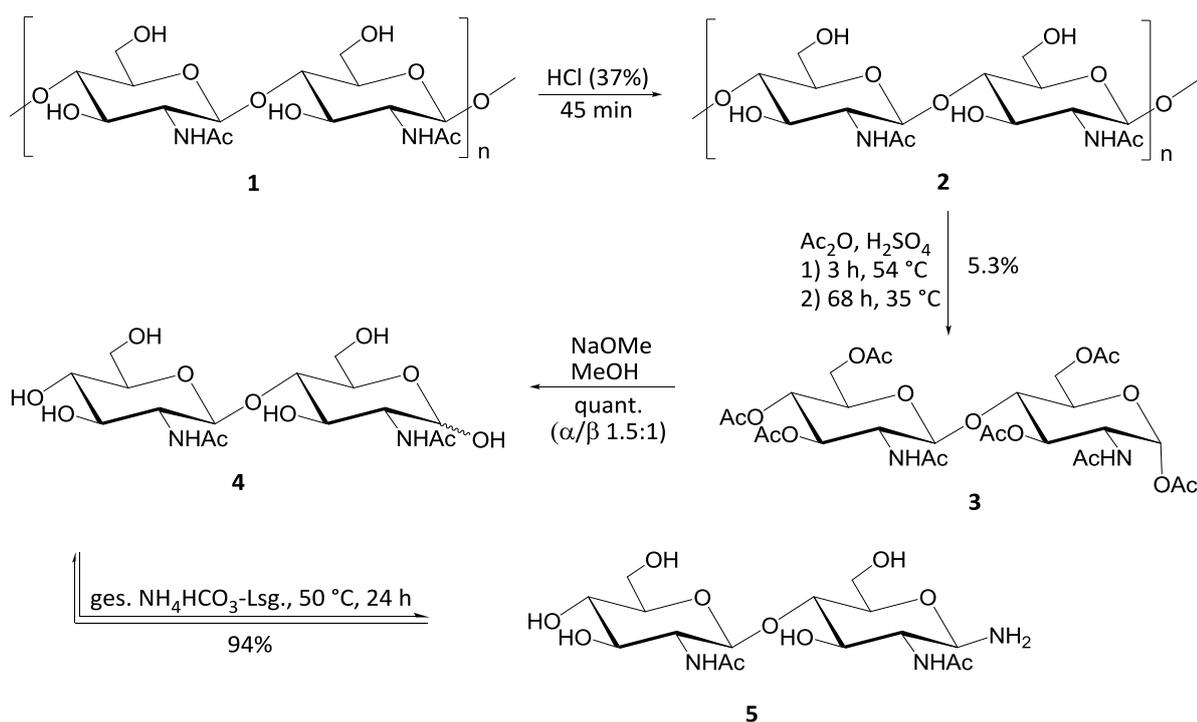
Die Synthese des V3-Glycopeptids erfolgte mit Hilfe der Baustein-Methode (s. Abschnitt 4.1), für die zunächst zwei verschiedene Chitobiosylasparaginbausteine hergestellt wurden.

#### 6.1.1 Synthese der Chitobiosylasparaginbausteine

Für die Isolierung der für den Chitobiosylbaustein benötigten Chitobiose wurde preiswertes Chitin aus Krabbenchalen verwendet. In der Vergangenheit mussten die Chitinflakes dafür mühsam gemahlen und anschließend in einer Apparatur aus Ultraschallbad, KPG-Rührer und Kryostat umgesetzt werden. Zur Verminderung des zeitlichen und apparativen Aufwands wurde eine andere Synthesestrategie verwendet, bei der die Chitinflakes zunächst in kolloidales Chitin überführt werden und die nachfolgende Synthese ohne größere Apparaturen auskommt. Dafür wurden Chitinflakes **1** analog zu Nishimura *et al.*<sup>158</sup> durch Behandlung mit konzentrierter Salzsäure und Ultraschall in kolloidales Chitin **2** überführt (Abbildung 14). Größere Bestandteile wurden durch Sieben entfernt. Die chemische Spaltung von **2** in Chitobioseoctaacetat **3** wurde mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt.<sup>158</sup> Hierbei musste eine präzise Temperaturkontrolle eingehalten werden, um weder eine Ringöffnung bei zu hoher, noch die Bildung längererkettiger Oligomere bei zu niedriger Temperatur zu begünstigen. Das Produkt wurde durch Säulenfiltration sowie anschließender Umkristallisation aus Ethanol gereinigt und konnte als reines  $\alpha$ -Anomer erhalten werden.

Das Octaacetat **3** wurde nach J. Tost<sup>65</sup> unter Zemplén-Bedingungen<sup>159</sup> mit Natrium-methanolatlösung bei pH 9.0 deacetyliert und lieferte ein  $\alpha/\beta$ -Anomerengemisch (1.5:1) der Chitobiose **4**. Die Reaktion zum  $\beta$ -Amin **5** erfolgte ebenfalls nach J. Tost<sup>65</sup> mit gesättigter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und Gefriertrocknung zur Gewichtskonstanz.

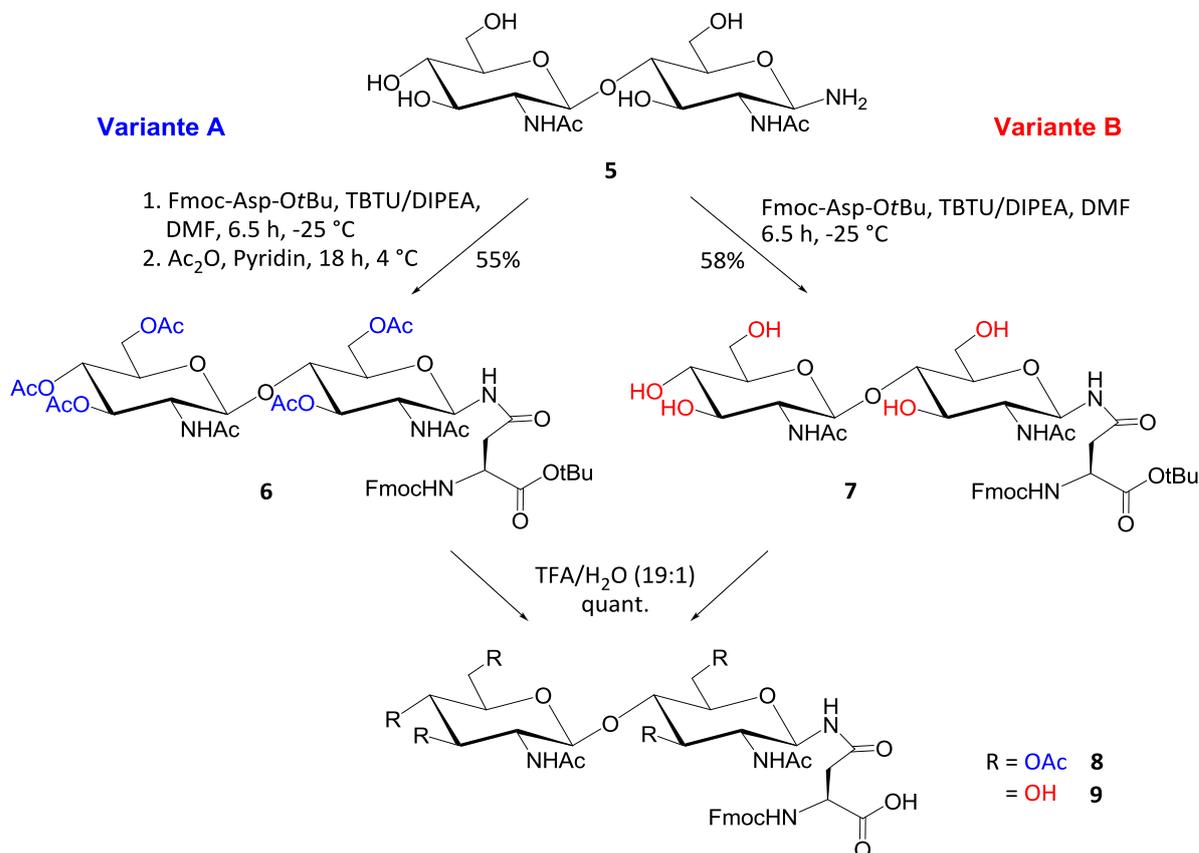
Bei der Glycopeptidsynthese nach der Baustein-Strategie ist es möglich acetylierte oder ungeschützte Bausteine einzusetzen (s. Abschnitte 4.1.3 und 6.1.3). Beides hat gewisse Vor- wie Nachteile. Acetylierte Glycosylbausteine sind in Anwesenheit der reaktiven Aktivierungsreagenzien (TBTU, HATU) stabil, machen aber einen weiteren Deacetylierungsschritt notwendig, der nicht immer quantitativ abläuft. Dieser Schritt entfällt beim Einsatz der ungeschützten Bausteine, dafür sind die freien Hydroxylgruppen anfällig für die Reaktion mit TBTU, sodass andere Aktivierungsreagenzien nötig sind. Für die nachfolgenden Glycopeptidsynthesen wurden beide Varianten getestet, weshalb die beiden Chitobiosylasparaginbausteine **8** und **9** synthetisiert wurden (Abbildung 15).



**Abbildung 14:** Isolierung der Chitobiose ausgehend von Chitin **1** mit *In-situ*-Acetylierung zum Chitobioseoctaacetat **3**.<sup>158</sup> Die basische Deacetylierung liefert ein Anomerengemisch der Chitobiose **4**.<sup>65</sup> Mit Hilfe einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung wurde das Chitobiosylamin **5** mit einer Ausbeute von 94% dargestellt.<sup>65</sup>

Das Amin **5** wurde nach J. Tost<sup>65</sup> unter Einsatz von TBTU und DIPEA mit der Seitenkette von Fmoc-L-Asp-OtBu verknüpft. Die Amidbildung wurde bei niedrigen Temperaturen durchgeführt und die Aminosäure wurde mit einem leichten Unterschuss (0.9 Äq.) eingesetzt, um unerwünschte Reaktionen mit den Hydroxylgruppen des Kohlenhydrats zu

vermeiden. Anschließend wurde der Ansatz geteilt, wobei die eine Hälfte *in situ* durch Essigsäureanhydrid acetyliert wurde und den Baustein **6** ergab (Variante A). Nach Reinigung an Kieselgel wurde die  $\alpha$ -Carboxylgruppe Trifluoressigsäure-sauer (TFA) entschützt und der acetylierte Chitobiosylasparaginbaustein **8** erhalten.<sup>65</sup>



**Abbildung 15:** Darstellung des acetylierten (**8**) und des ungeschützten (**9**) Chitobiosylasparaginbausteins. Bei Variante B wurde die Acetylierung, im Gegensatz zu Variante A, nach der Kupplung von **5** an Aspartat weggelassen. Die anschließende TFA-saure Entschützung der Carboxylgruppe wurde bei beiden Varianten unter gleichen Bedingungen durchgeführt.<sup>65</sup>

Die zweite Hälfte des Kupplungsansatzes wurde direkt aufgearbeitet und lieferte den ungeschützten Baustein **7** (Abbildung 15, Variante B). Problematisch dabei war, dass **7** nur in DMF und DMSO löslich war, was eine säulenchromatographische Reinigung zunächst ausschloss. In der Hoffnung, dass **9** durch die freie Carboxylgruppe polarer und somit möglicherweise wasserlöslich ist, wurde das Rohprodukt im ersten Versuch direkt mit TFA zum endgültigen Baustein **9** umgesetzt. Dadurch wäre eine Reinigung mittels HPLC möglich. Allerdings war **9** auch nur in DMF und DMSO löslich. Eine Literaturrecherche ergab, dass Bejugam *et al.*<sup>160</sup> bereits die Vorstufe **7** über *Flash*-Chromatographie mit 23% Methanol in Chloroform gereinigt hatten. Daher wurde versucht **9** über eine Säulenfiltration zu reinigen. Das Rohprodukt ließ sich nicht vollständig in Methanol lösen, weshalb der unlösliche Rückstand durch Filtration entfernt wurde. Massenspektrometrisch konnte das Produkt

jedoch weder im Positiv- noch im Negativionenmodus nachgewiesen werden, weshalb der unlösliche Rückstand untersucht wurde. Es zeigte sich, dass der Rückstand den fast reinen Baustein **9** darstellte.

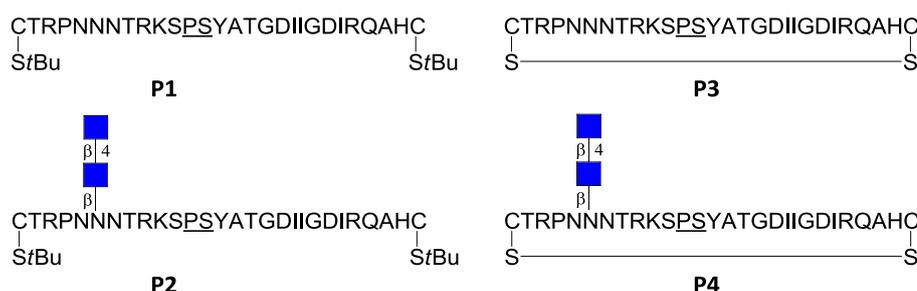
In einem weiteren Ansatz wurde schließlich das Rohprodukt **7** mehrfach mit Methanol und Ultraschall behandelt und auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet. Das reine Produkt konnte in einer Ausbeute von 58% erhalten werden. Die anschließende Umsetzung mit TFA zum Baustein **9** erfolgte quantitativ.<sup>65</sup>

### 6.1.2 Übersicht der verschiedenen V3-Peptide und -Glycopeptide

Abbildung 16 gibt eine Übersicht der verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten bzw. untersuchten V3-Peptide und V3-Glycopeptide. Die Sequenz der Peptide basiert auf der von Dojahn<sup>64</sup> ermittelten Konsensussequenz des Subtyps B. Die PND der V3-Region wurde entfernt, um Peptide zu synthetisieren, die zukünftig als Template für die Antikörpergenerierung dienen könnten, ohne weitere PND-spezifische, nicht langfristig neutralisierende Antikörper zu produzieren. Statt der PND wurde eine PS-Sequenz eingefügt, um die natürliche *Loop*-Struktur zu gewährleisten.<sup>157</sup>

Die Cysteine liegen in der offenkettigen Form StBu-geschützt vor, da die Peptide so besser handhabbar waren. Als Minimalmotiv der Glycosylierung am N301 diente Chitobiose.

Das Peptid **P1** wurde bereits in der Masterarbeit<sup>161</sup> synthetisiert, konnte damals aber aus Zeitgründen nicht vollständig untersucht werden.



**Abbildung 16:** Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten offenkettigen und zyklisierten V3-Peptide und -Glycopeptide mit verkürzter Sequenz. Unterstrichen ist die PS-Sequenz, die statt der PND eingefügt wurde, um die *Loop*-Struktur zu gewährleisten. Die Cysteine liegen der besseren Handhabbarkeit wegen StBu-geschützt vor und die Chitobiose ist mit N301 verknüpft.

### 6.1.3 Glycopeptidsynthese

Es gibt mittlerweile zahlreiche Strategien zur Darstellung von Glycopeptiden (s. Abschnitt 4.1.3), allerdings treten immer wieder individuelle Syntheseprobleme auf, die stark von der Sequenz der Glycopeptide abhängig sind. Daher wurde **P2** in fünf verschiedenen Varianten

mit unterschiedlichen Synthesebedingungen hergestellt, um die optimalen Bedingungen für V3-Glycopeptide zu finden. Tabelle 1 und Abbildung 17 sowie Tabelle 2 und Abbildung 19 zeigen die verschiedenen verwendeten Strategien für die Synthesen mit dem acetylierten und dem ungeschützten Baustein **8** bzw. **9**. Die verschiedenen Reaktionsbedingungen für die Glycopeptidsynthese wurden in einer ausgiebigen Literaturrecherche ermittelt und im Hinblick auf die höchsten erzielten Ausbeuten ausgewählt. Bei allen Synthesevarianten wurde zunächst das Peptid bis zur Glycosylierungsstelle mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) entweder an einem mikrowellengestützten Syntheseroboter (Varianten 1 bis 3, Tabelle 1) oder manuell (Varianten 4 und 5, Tabelle 2) synthetisiert. Als feste Phase diente ein Fmoc-Rink-Amid-Polystyrolharz, von dem die vollständigen Peptide als C-terminale Amide abgespalten wurden. Der N-Terminus lag als freies Amin vor. Die Synthesen wurden alle nach der Fmoc-Strategie durchgeführt und die verwendeten Aminosäuren lagen Seitenketten-geschützt vor. Die Seitenkettenschutzgruppen wurden zusammen mit der Peptidabspaltung vom Harz unter TFA-sauren Bedingungen entfernt. Lediglich die Cystein-Schutzgruppe StBu ist bei saurem pH-Wert stabil und wurde später selektiv für die Zyklisierung unter reduktiven Bedingungen entfernt. Die Fmoc-Schutzgruppe ist basenlabil und wurde mit Piperidin entfernt. Das dabei entstehende Methylenfluoren wurde dazu genutzt, die Kupplungsreaktionen zu verfolgen, indem die Absorption bei 301 nm gemessen wurde (*Fmoc-Monitoring*). Die Absorptionswerte weisen allerdings einen Fehler von mindestens 20% auf, da Methylenfluoren in Lösung instabil ist und durch Lichteinwirkung zerfällt. Die Reinigung erfolgte für alle Glycopeptide über eine Etherfällung sowie über eine *Reversed-phase*-Säule (RP) an einer HPLC. Anschließend wurden sämtliche Peptide mittels ESI-MS und/oder MALDI-MS und NMR charakterisiert.

#### **6.1.3.1 Synthesen mit dem acetylierten Chitobiosylasparaginbaustein **8****

In der Vergangenheit hatte sich die Glycopeptidsynthese unter Nutzung des acetylierten Glycosylbausteins bewährt.<sup>65,162-164</sup> Die Varianten 1 und 2 (Tabelle 1 und Abbildung 17) entsprechen dieser „klassischen“ Strategie und unterscheiden sich hauptsächlich darin, dass nach der Kupplung des Bausteins **8** die restlichen Aminosäuren entweder automatisiert oder manuell verknüpft wurden. Bei der Synthese nach Variante 3 wurden analog zu Cai *et al.*<sup>165</sup> andere Aktivierungsreagenzien für die Bausteinkupplung sowie eine leicht veränderte Zusammensetzung der Lösung zur Abspaltung vom Harz verwendet (Tabelle 1 und Abbildung 17).

Bei allen drei Synthesen wurde zunächst das Peptid bis zur Glycosylierungsstelle mit Hilfe eines mikrowellengestützten Peptidsynthesizers synthetisiert (Tabelle 1). Nach jedem Kupplungsschritt wurden freie Aminofunktionen mit Essigsäureanhydrid acetyliert, um Abbruch- statt Deletionspeptide zu erhalten. Nach vollständiger Peptidsynthese erfolgte die Deacetylierung der Chitobiose entweder am Harz durch Hydrazinhydrat oder nach Abspaltung des Peptids in Lösung durch Natriummethanolat in Methanol. Das Peptid wurde durch ein Gemisch aus TFA, TIPS und Wasser im Verhältnis 95:5:2 bei gleichzeitiger Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen vom Harz abgespalten.

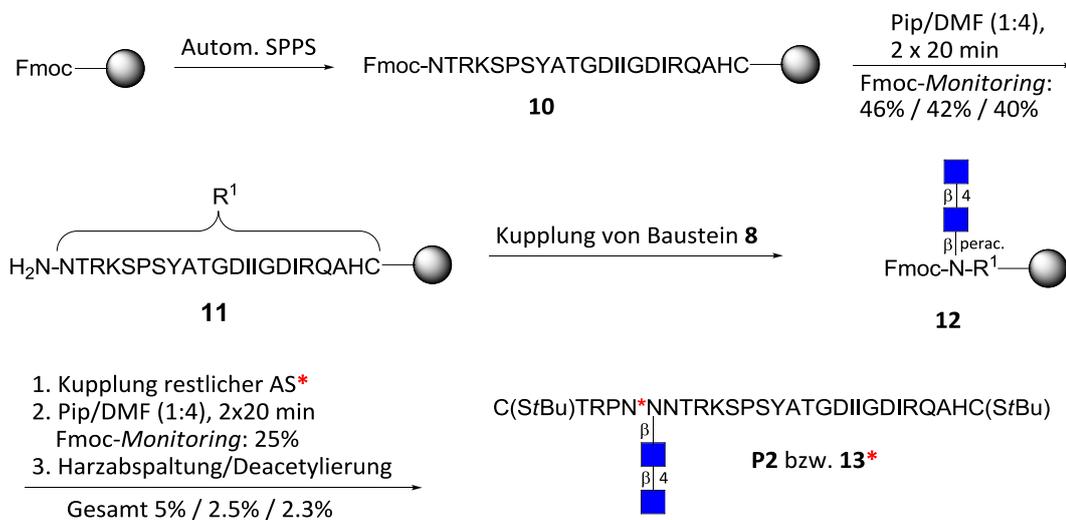
**Tabelle 1:** Verschiedene Strategien für die Synthese des Glycopeptids **P2** unter Verwendung des acetylierten Bausteins (**8**). DIPEA: Diisopropylethylamin, DMF: *N,N*-Dimethylformamid, NMM: *N*-Methylmorpholin, NMP: *N*-Methyl-2-pyrrolidon, TIPS: Triisopropylsilan, HOAt: 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol.

	Variante 1	Variante 2	Variante 3
<b>Synthese bis N301</b>	Automatisiert, zweifach, je 10 Äq. AS und TBTU, 20 Äq. DIPEA in DMF	Automatisiert, zweifach, je 5 Äq. AS und TBTU, 10 Äq. DIPEA in DMF	
<b>Bausteinkupplung</b>	Manuell, zweifach, 24 h, 40 °C, 1 Äq. Baustein, je 1.5 Äq. TBTU und DIPEA in DMF <sup>65</sup>	Manuell, zweifach, 24 h, 50 °C, 1 Äq. Baustein, je 1.5 Äq. TBTU und DIPEA in DMF <sup>65</sup>	Manuell, zweifach, 18 W, 50 °C, 15 min, 2 Äq. Baustein, 2.5 Äq. HATU, je 5 Äq. HOAt und NMM in NMP <sup>165</sup>
<b>Kupplung restlicher AS</b>	Automatisiert	Manuell	Manuell
<b>Deacetylierung der Chitobiose</b>	1% NaOMe/MeOH <sup>159</sup>	H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O, MeOH	1% NaOMe/MeOH <sup>159</sup>

Bei der Synthese nach Variante 1 (Tabelle 1) wurde für das peptidische Zwischenprodukt (**10**) mittels *Fmoc-Monitoring* eine Ausbeute von 46% erreicht (Abbildung 17). Ausgehend von der so bestimmten Stoffmenge wurde der Chitobiosylasparaginbaustein **8** äquimolar für die Kupplung eingesetzt, um den wertvollen Baustein zu sparen. Die im Vergleich zu sonstigen Aminosäurekupplungen niedrigere Temperatur wurde gewählt, um unerwünschte Nebenreaktionen wie z.B. die Aspartimidbildung zu vermeiden.

Nach der letzten Kupplung wurde mittels *Fmoc-Monitoring* eine Ausbeute von 25% erhalten. Zuletzt wurde **P2** über eine RP-Säule mit Hilfe einer HPLC gereinigt und mit einer

Gesamtausbeute von 5% erhalten, was einer durchschnittlichen Kupplungsausbeute von 90% entspricht.



**Abbildung 17:** Allgemeines Schema der Synthese von **P2** nach den Varianten 1 bis 3: Die Synthese bis zur Glycosylierungsstelle erfolgte automatisiert. Die Kupplung von Baustein **8** erfolgte zweifach und anschließend wurden die nachfolgenden AS entweder manuell oder automatisiert gekuppelt. Je nach Variante wurde zuerst vom Harz abgespalten und anschließend die Chitobiose deacetyliert oder umgekehrt. Die Ausbeuten sind in der Reihenfolge Variante 1/ Variante 2 / Variante 3 angegeben. Das Peptid aus Variante 3 ist eine Aminosäure kürzer, da versehentlich ein Fmoc-Entschützungsschritt ausgelassen wurde (markiert mit \*)

Für die Synthesen nach Variante 2 und 3 (Tabelle 1) wurde zunächst ein gemeinsamer Ansatz genutzt, der nach der Synthese von Peptid **10** geteilt und Fmoc-entschützt wurde. Beim Fmoc-Monitoring ergaben sich Ausbeuten von 42% für die Synthese nach Variante 2 und 40% für den Ansatz nach Variante 3 (Abbildung 17). Die noch fehlenden fünf Aminosäuren wurden jeweils manuell verknüpft, wobei ähnliche Bedingungen gewählt wurden, wie bei der automatisierten Peptidsynthese. So erfolgte die Kupplung z.B. bei einer Temperatur von 50 °C, um die Reaktion zu beschleunigen. Dabei wurde jedoch bei Variante 3 versehentlich die erste Fmoc-Entschützung ausgelassen, weshalb im Endprodukt **13** das N300 fehlt. Da der Vergleich der Ausbeuten der verschiedenen Varianten dennoch möglich ist, wurde das Peptid weiter aufgearbeitet. Nach Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab sich beim Fmoc-Monitoring eine Rohausbeute von 19% nach Variante 2 und 32% nach Variante 3. Das Glycopeptid **P2** wurde nach Variante 2 mit einer Gesamtausbeute von 2.5% erhalten, was bei 28 AS einer durchschnittlichen Kupplungsausbeute von 88% entspricht. Das Peptid **13** wurde nach Variante 3 mit einer Gesamtausbeute von 2.3% erhalten. Bei einer Länge von 27 AS entspricht das einer durchschnittlichen Ausbeute von 87% pro Kupplungsschritt.

Beim Vergleich von Variante 1 und 2 zeigt sich, dass die unterschiedlichen Äquivalente der automatisierten Synthese von Peptid **10** zu keinen nennenswerten Unterschieden der Fmoc-

*Monitoring*-Ausbeuten führten. Weiterhin wird deutlich, dass die automatisierte Peptidsynthese der restlichen fünf Aminosäuren nach der Bausteinkupplung zu einer besseren Ausbeute führte als die manuelle Synthese. Dies liegt vermutlich an der höheren Temperatur von 75 °C, welche bei der Kupplung im Peptidsynthesizer mittels Mikrowellenstrahlung erreicht wird. Die unterschiedlichen Methoden der Deacetylierung haben jeweils ihre Vor- und Nachteile. Die Deacetylierung am Harz hat den Vorteil, dass ein Reinigungsschritt im Vergleich zur Deacetylierung in Lösung gespart wird. Dafür wird das im Vergleich zu Natriummethanolat gesundheitsschädlichere Hydrazinhydrat verwendet. Da acetylierte Glycopeptide sich bei der Detektion durch Massenspektrometrie (MS) besser ionisieren lassen, kann es von Vorteil sein, die Glycopeptide erst nach der Reinigung mittels HPLC in Lösung zu deacetylieren. Im Falle von **P2** traten jedoch keine Probleme bei der Detektion durch ESI- oder MALDI-MS auf. Es wurden während der HPLC auch keine unvollständig deacetylierten Peptide detektiert, was dafür spricht, dass durch beide Methoden sämtliche Acetylgruppen entfernt werden konnten.

Bei Variante 3 erwies sich die Bausteinkupplung in der Mikrowelle als problematisch, da das Harz zweimal von der Fritte in einen Kolben und wieder zurück umgefüllt werden musste. Dabei kam es zu nennenswerten Ausbeuteverlusten, da jedes Mal ca. 3-5% Harz in Fritte, Kolben und Pipette zurück blieb.

Letztlich ist im Vergleich von Variante 3 zu Variante 2 trotz der Ausbeuteverluste beim Umfüllen des Harzes kein Unterschied in der Gesamtausbeute (2.3% bzw. 2.5%) zu verzeichnen. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Bausteinkupplung mit Hilfe der Mikrowelle und der veränderten Aktivierungsreagenzien eine höhere Kupplungsausbeute aufweist als die in Variante 1 und 2 genutzten Bedingungen und die Ausbeuteverluste ausgleicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Variante 1 mit der vollständig automatisierten Peptidsynthese bei manueller Bausteinkupplung mit 5% die beste Ausbeute lieferte.

### **6.1.3.2 Synthesen mit dem ungeschützten Chitobiosylasparaginbaustein 9**

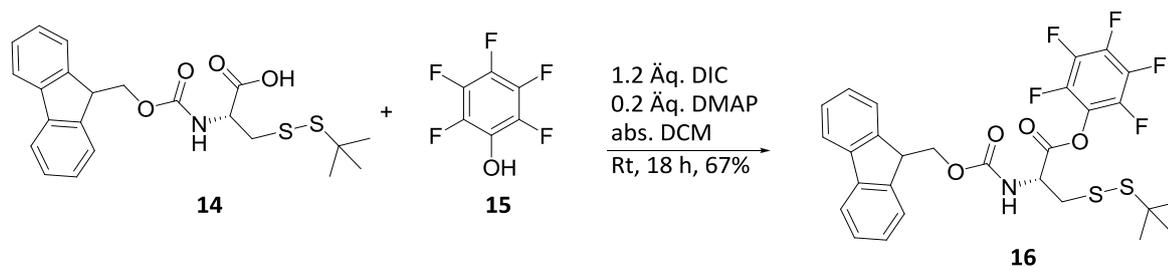
Bei der Synthese von Glycopeptiden kann es von Vorteil sein, ungeschützte Glycosylbausteine einzusetzen, um den Schritt der Deacetylierung zu sparen. Außerdem kann es vorkommen, dass die Deacetylierung nur unvollständig verläuft. Deshalb wurden zwei weitere Varianten der Glycopeptidsynthese getestet, bei denen der ungeschützte Chitobiosylasparaginbaustein **9** eingesetzt wurde. Unglücklicherweise hat der Syntheseroboter in der Zeit zwischen Variante 3 und 4 seine Funktion eingestellt und ließ

sich nicht reparieren. Daher wurden die Synthesen nach Variante 4 und 5 (Tabelle 2 und Abbildung 19) vollständig manuell durchgeführt. Die beiden Varianten unterscheiden sich ab der Bausteinverknüpfung nur in der Kupplung der letzten fünf Aminosäuren grundlegend.

**Tabelle 2:** Verschiedene Strategien für die Synthese des Glycopeptids **P2** unter Verwendung des ungeschützten Bausteins **9**. DIC: *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid, DEPBT: 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on, Pfp: Pentafluorphenyl.

	Variante 4	Variante 5
<b>Synthese bis N301</b>	Manuell, dreifach, 4 Äq. AS, je 5 Äq. TBTU und DIPEA in DMF, 60 °C	Manuell, zweifach, 4 Äq. AS, je 5 Äq. TBTU und DIPEA in DMF, 65 °C
<b>Bausteinkupplung</b>	Manuell, zweifach, 24 h, 35 °C, 2 Äq. Baustein, 3 Äq. DEPBT und 1.5 Äq. DIPEA in DMF <sup>123</sup>	Manuell, zweifach, 24 h, 50 °C, 2 Äq. Baustein, 3 Äq. DEPBT und 1.5 Äq. DIPEA in DMF <sup>123</sup>
<b>Kupplung restlicher AS</b>	Manuell, je 5 Äq. AS, DIC, HOAt <sup>123</sup>	Manuell, Pfp-Ester in NMP <sup>121,122</sup>
<b>Capping nach Bausteinkupplung</b>	<i>N</i> -(2-Chlorbenzyloxycarbonyloxy)-succinimid (Z-(2-Cl)OSu) <sup>103,124</sup>	<i>N</i> -(2-Chlorbenzyloxycarbonyloxy)-succinimid (Z-(2-Cl)OSu) <sup>103,124</sup>
<b>Harzabspaltung</b>	a) TFA/TIPS/H <sub>2</sub> O (94:2.5:2.5), 2 h b) TFA/TIPS (95:5), 1h <sup>166</sup>	a) TFA/TIPS/H <sub>2</sub> O (94:2.5:2.5), 2 h b) TFA/TIPS (95:5), 1h <sup>166</sup>

Bei Variante 4 fand das weniger reaktive *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in Verbindung mit HOAt Anwendung, während bei Variante 5 voraktivierte Pentafluorphenylester-Aminosäuren (Pfp-Ester) verwendet wurden. Der Pfp-Ester des *StBu*-geschützten Cysteins **16** war kommerziell nicht erhältlich, weshalb er im Vorfeld synthetisiert werden musste. Die allgemeine Veresterungsprozedur nach Twibanire *et al.*<sup>167</sup> unter Nutzung von TBTU und DIPEA führte jedoch zu keinem mittels MS oder NMR nachweisbaren Produkt (Abbildung 18). Stattdessen wurde die Aminosäure Fmoc-L-Cys(*StBu*)-OH **14** analog zu Geiermann *et al.*<sup>168</sup> unter Nutzung von DIC und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) mit Pentafluorphenol **15** in einer Steglich-Veresterung<sup>169</sup> umgesetzt. Der Pfp-Ester **16** konnte mittels ESI-MS und NMR nachgewiesen werden und wurde mit einer Ausbeute von 67% erhalten. Aufgrund der Gefahr der Hydrolyse der Esterbindung wurde das Produkt **16** bei -80 °C gelagert.

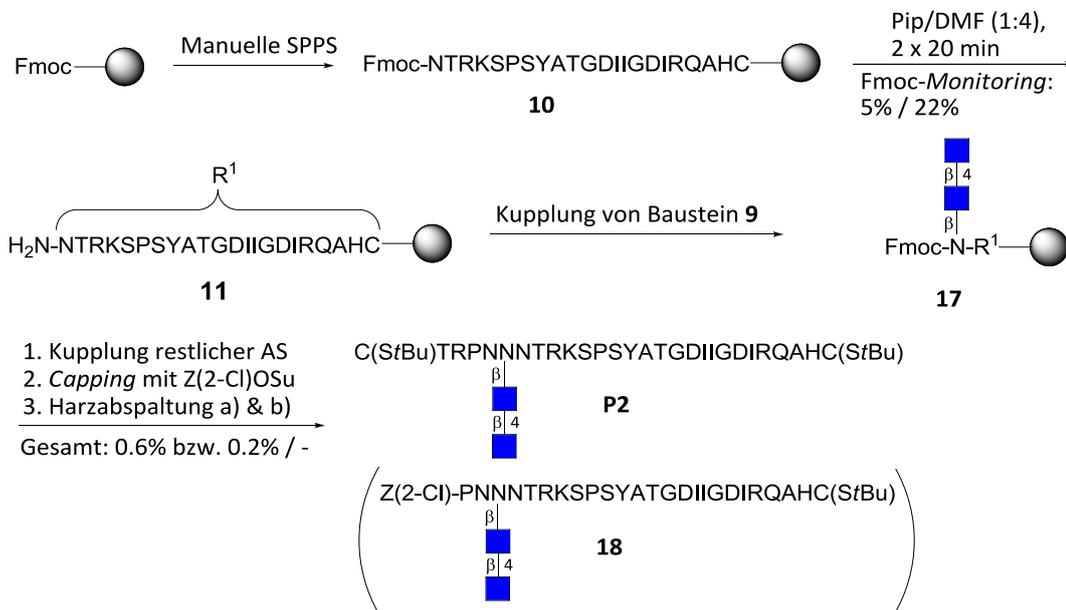


**Abbildung 18:** Durch eine Steglich-Veresterung konnte Fmoc-L-Cys(StBu)-OPfp (**16**) mit einer Ausbeute von 67% erhalten werden.<sup>168</sup> Die zuerst versuchte Reaktion mit 1 Äq. TBTU und 2 Äq. DIPEA für 3 h bei Rt führte nicht zum gewünschten Produkt **16**.<sup>167</sup>

Für die Verknüpfung des Chitobioseasparaginbausteins **9** wurde der Aktivator DEPBT verwendet, der zu weniger Aspartimidbildung führen soll als andere bekannte Aktivatorreagenzien.<sup>123</sup> Nach Kupplung des ungeschützten Glycosylbausteins mussten nicht nur die Kupplungsbedingungen der noch folgenden Aminosäuren, sondern auch das *Capping* angepasst werden, um die unerwünschte Acetylierung des Kohlenhydrates zu verhindern. Statt die freien Aminogruppen zu acetylieren, wurden sie mit Hilfe von *N*-(2-Chlorbenzyloxy-carbonyloxy)succinimid blockiert.<sup>103,124</sup> Die Bestimmung der Ausbeute mittels *Fmoc-Monitoring*, die etwa nach jeder fünften Kupplung durchgeführt wurde, war nach den veränderten *Capping*-Bedingungen leider nicht mehr möglich. Nach Zugabe zum Harz färbte sich die Piperidin-Lösung trotz ausgiebiger Waschschrte sofort neongelb, wodurch fehlerhafte Absorptionswerte erhalten wurden. Zuletzt wurden die Ansätze beider Varianten geteilt, um zwei unterschiedliche Methoden der Abspaltung zu testen. Laut Urge *et al.*<sup>166</sup> führt ein Wasseranteil von 5% in der TFA-sauren Abspatlösung zur Spaltung der glycosidischen Bindung, weshalb die Abspaltung vom Harz ebenfalls wasserfrei durchgeführt werden sollte.

Nach der Synthese des Peptids **11** (Tabelle 2) wurde nach Variante 4 eine Ausbeute von 5% und nach Variante 5 eine Ausbeute von 22% im *Fmoc-Monitoring* erhalten (Abbildung 19). Nach Teilung der Ansätze in zwei Teile wurden zwei Arten der Harzabspaltung getestet (Tabelle 2). Bei Variante 4 wurden mit Abspaltmethode b) 20% mehr Rohprodukt erhalten als mit Methode a), wobei jedoch keine Aussage über den wahren Anteil des gewünschten Glycopeptids **P2** getroffen werden kann. Bei der Reinigung mittels RP-Säule hat sich gezeigt, dass der größte Teil des Rohprodukts aus Abbruchpeptiden besteht und nur geringe Mengen des Glycopeptids **P2** vorhanden waren. Entsprechend schwierig gestaltete sich die Reinigung. Bis zuletzt ließen sich nicht alle Abbruchpeptide vollständig entfernen. Letztlich wurde das leider noch leicht verunreinigte Glycopeptid **P2** nach Variante 4a) mit einer Ausbeute von 0.6% und nach Variante 4b) mit einer Ausbeute von 0.2% erhalten. Es ist

jedoch anzumerken, dass es bei der Reinigung des Peptids nach Variante 4b) zu partiellen Verlusten von etwa 25% kam, weshalb die Gesamtausbeuten nicht miteinander verglichen werden können.



**Abbildung 19:** Allgemeines Schema der Synthese von **P2** nach den Varianten 4 und 5: Die Synthese bis zur Glycosylierungsstelle erfolgte manuell. Die Kupplung von Baustein **9** geschah zweifach und anschließend wurden die nachfolgenden AS gekuppelt, wobei Z(2-Cl)OSu als *Capping*-Reagenz verwendet wurde. Zuletzt wurde das Peptid auf zwei verschiedene Arten vom Harz abgespalten. Die Ausbeuten sind in der Reihenfolge Variante 4 (a bzw. b) / Variante 5 (a bzw. b) angegeben. Mit Variante 5 konnte kein **P2** erhalten werden, als längstes Abbruchpeptid wurde stattdessen **18** identifiziert.<sup>103,121-124,166</sup>

Bei Variante 5 wurde mit Abspaltmethode b) ebenfalls 33% mehr Rohprodukt erhalten als mit Methode a), jedoch ließ sich das Glycopeptid **P2** weder mittels NMR noch mit ESI-MS oder MALDI-MS nachweisen. Nach Trennung über eine RP-Säule wurde mit Hilfe von MALDI-MS **18** als längstes Abbruchpeptid identifiziert.

Die vollständig manuelle Synthese des Peptids **11** liefert mit 5% und 22% im Vergleich zur automatisierten Synthese mit 40% bis 46% deutlich schlechtere *Fmoc-Monitoring*-Ausbeuten. Das legt einerseits den Schluss nahe, dass höhere Temperaturen (automatisiert: 75 °C, manuell: 60 °C bzw. 65 °C) zu einer deutlich verbesserten Kupplungsausbeute führen. Andererseits scheint eine Dreifach- (Variante 4) im Vergleich zur Zweifach-Kupplung (Variante 5) keine große Verbesserung der Kupplungsausbeute zu bewirken. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass im Gesamtvergleich Variante 1 die besten Ausbeuten lieferte, bei der bis auf die Bausteinverknüpfung, alle Kupplungsreaktionen bei 75 °C abliefen.

Im Vergleich der beiden Varianten, die den ungeschützten Baustein **9** nutzen, zeigt sich, dass nur Variante 4 zum Produkt **P2** führte. Allerdings lieferte Variante 4 eine deutlich schlechtere Ausbeute und Reinheit des Glycopeptids als die Varianten 1 bis 3 unter Nutzung von Baustein **8**.

Variante 5 führte zu keinem Produkt, was vermutlich daran liegt, dass die Aktivität der Pfp-Ester und somit die Kupplungsausbeuten zu niedrig sind, um das nur in moderater Ausbeute vorhandene **11** in detektierbarer Menge zu **P2** zu verlängern.

Der Einfluss des verwendeten Bausteins **9** lässt sich letztendlich nicht vergleichen, da die Synthesen des acetylierten Bausteins **8** mit Hilfe des Peptidsynthesizers durchgeführt werden konnten, während die Synthesen mit dem ungeschützten Baustein **9** zwangsweise manuell erfolgten. Für einen aussagekräftigeren Vergleich sollten die Varianten 4 und 5 mit einem Peptidsynthesizer wiederholt werden.

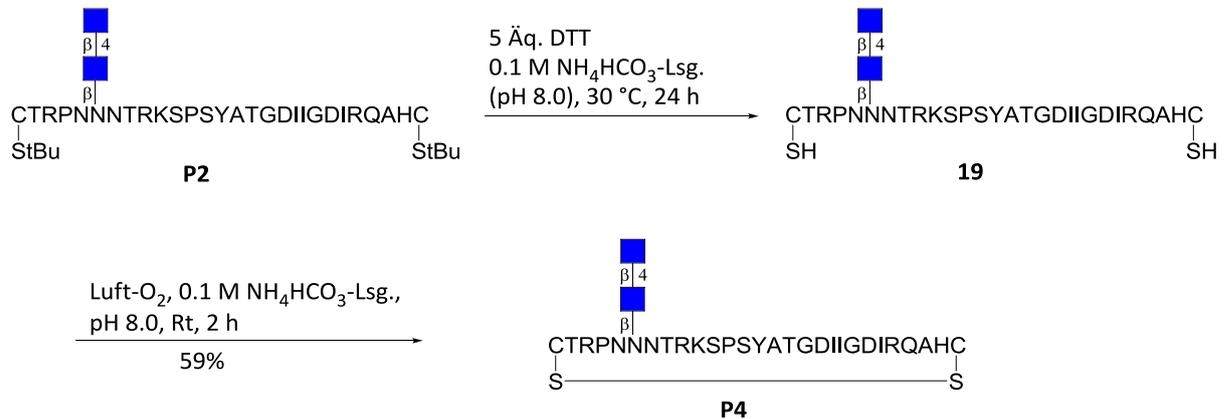
### 6.1.4 Zyklisierung der Peptide

Um eine größere Übereinstimmung mit dem natürlichen *V3-Loop* zu erreichen, wurden die linearen Peptide **P1** und **P2** durch Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den terminalen Cysteinen zyklisiert. Die Thiofunktionen der Cysteine beider Peptide lagen *StBu*-geschützt vor, sodass die Entfernung der Schutzgruppen nach der Reinigung der Peptide unter reduktiven Bedingungen erfolgen konnte. Im Rahmen der Masterarbeit<sup>161</sup> wurde dafür bereits erfolgreich Dithiothreitol (DTT) in einer 0.1 molaren Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung verwendet. Allerdings war nach der Reduktion ein Entsalzungsschritt notwendig, um die Lösung gefriertrocknen zu können. Außerdem muss überschüssiges DTT entfernt werden, welches sonst zur Reduktion der frisch gebildeten intramolekularen Disulfidbrücke führen würde. Durch unspezifische Wechselwirkungen der Peptide mit der Celluloseacetatmembran kam es bei diesem Entsalzungsschritt zu nennenswerten Ausbeuteverlusten.

Daher wurde zunächst mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), welches an Agarose gebunden ist, ein anderes Reduktionsmittel zur Entfernung der *StBu*-Schutzgruppen verwendet. Durch die Bindung an das Harz sollte das Reagenz im Anschluss an die Reduktion mittels Filtration entfernt werden. Laut Herstellerangaben soll TCEP außerdem ein doppelt so hohes Reduktionspotential wie DTT aufweisen und bereits innerhalb von fünf Minuten stabile Disulfidbindungen reduzieren.<sup>170</sup> Da TCEP im Gegensatz zu DTT keine stabile oxidierte Form aufweist, hat es den Nachteil, dass die Reduktion der Disulfide reversibel ist.

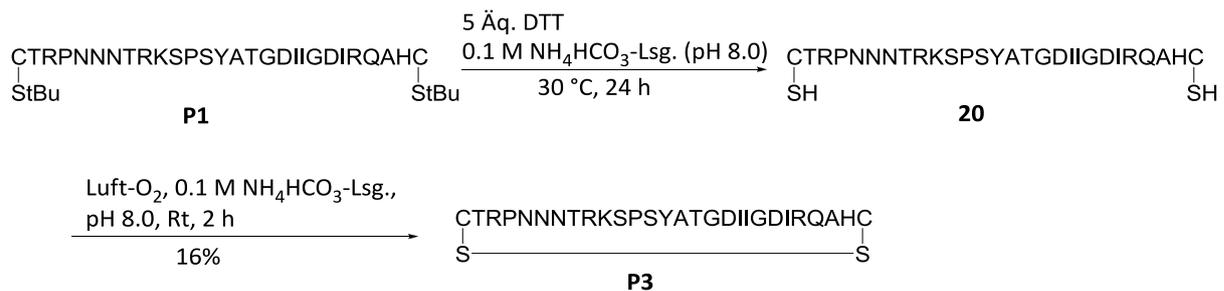
Das Peptid wurde entsprechend der Herstellerangaben unter Inertgasatmosphäre mit einem dreifachen Überschuss des TCEP-Agaroseharzes bei Raumtemperatur versucht zu

reduzieren. Nach acht Stunden konnte mittels LC-ESI-MS jedoch keine Umsetzung zum entschützten Peptid **19** detektiert werden (Abbildung 20).<sup>170</sup> Ferner führten auch die Entfernung des TCEP-Harzes und die Zugabe von zunächst fünf und später weiteren fünf Äquivalenten DTT bei 30 °C zum selben Ansatz nicht zum ungeschützten Peptid (**22**). TCEP erwies sich dementsprechend als ungeeignet zur Entschützung der V3-Peptide.



**Abbildung 20:** Synthese des zyklischen Glycopeptids **P4**. Die Verwendung von 3 Äq. Agarose-gebundenem TCEP (in H<sub>2</sub>O, pH 8.4, Rt, 8 h) führte nicht zur Bildung von **19**.<sup>170</sup> Stattdessen wurden die StBu-Schutzgruppen mit DTT in Ammoniumhydrogencarbonat-Lsg. entfernt und nach Verdünnung wurden die Thiole durch Luftsauerstoff oxidiert. Das zyklische Glycopeptid **P4** konnte mit einer Ausbeute von 59% erhalten werden.

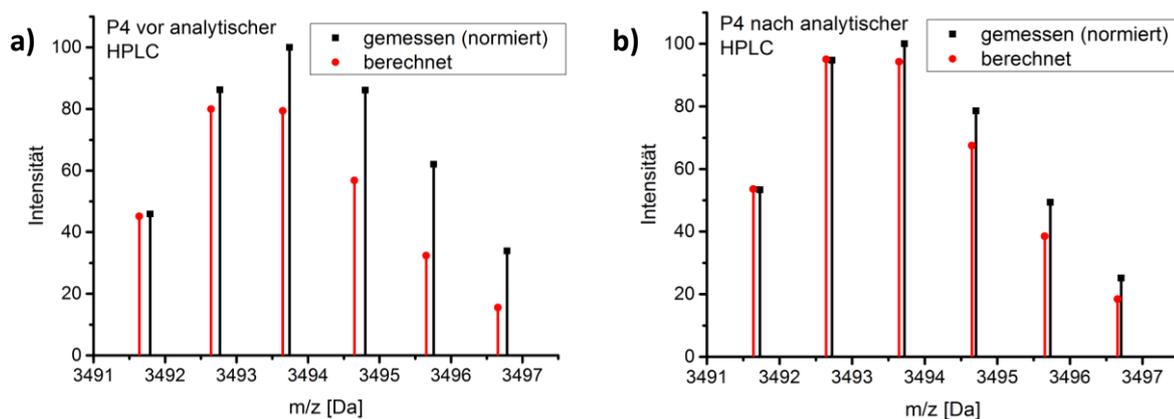
Stattdessen wurden die beiden Peptide **P1** und **P2** in neuen Reaktionsansätzen wie zuvor mit Hilfe eines fünffachen Überschusses DTT in einer Inertgasatmosphäre entschützt (Abbildung 20 und Abbildung 21).<sup>161</sup>



**Abbildung 21:** Synthese des zyklischen Peptids **P3**. Die Cysteine wurden mit DTT in Ammoniumhydrogencarbonat-Lsg. entschützt und nach Verdünnung durch Luftsauerstoff zu Cystinen oxidiert. Das zyklische Peptid **P3** konnte mit einer Ausbeute von 16% erhalten werden.

Während der Entschützung wurde die Reaktion mittels MALDI-MS verfolgt, um erst nach vollständiger Entfernung der StBu-Schutzgruppen mit der Oxidation zur Disulfidbindung zu beginnen.

Die Oxidation der Thiolgruppen zu Disulfidbindungen erfolgte mit Luftsauerstoff in verdünnter Lösung (Abbildung 20 und Abbildung 21). Die Verdünnung ist nötig, um die Bildung intramolekularer statt intermolekularer Disulfidbrücken zu begünstigen und somit Oligo- und Polymerisierungen zu vermeiden. In mehreren Versuchen hat sich gezeigt, dass eine kurze Oxidationszeit von zwei Stunden zu bevorzugen ist, da sich bei längerer Reaktionszeit (bis zu 96 h getestet) vermehrt Nebenprodukte bildeten. Dazu gehörten zum einen mehrfach oxidierte Spezies mit einer Massendifferenz von +32 Da, bei denen es sich vermutlich um Thiosulfonate handelt. Zum anderen ließ sich die Bildung eines Nebenproduktes mit einer Massendifferenz von +1 Da nicht vermeiden, durch die kurze Reaktionszeit aber verringern. Wahrscheinlich findet während der Oxidation ein Austausch einer Amidgruppe zur Säurefunktion ( $\text{NH}_2 \rightarrow \text{OH}$ ) statt, wodurch sich dieser Massenunterschied erklären lässt. Dieses Austausch-Nebenprodukt trat sowohl bei der Synthese von **P3** als auch bei **P4** auf und ließ sich im präparativen Maßstab nicht durch eine RP-Säule an der HPLC abtrennen, da Produkt und Nebenprodukt coeluierten. Die Anwesenheit des Nebenproduktes fiel dadurch auf, dass die Isotopenverhältnisse im MALDI-Spektrum nicht zu den berechneten Verhältnissen passten (Abbildung 22a). Durch Verwendung einer analytischen RP-Säule konnte das unerwünschte Nebenprodukt schließlich abgetrennt und die Produkte mit passendem Isotopenmuster (Abbildung 22b) erhalten werden.



**Abbildung 22:** Isotopenmuster der gemessenen MALDI-Spektren (schwarz) im Vergleich mit dem berechneten Isotopenverhältnis (rot) von **P4** **a)** direkt nach der zweistündigen Oxidation und **b)** nach der Reinigung mittels HPLC gezeigt. Die absoluten Intensitäten der gemessenen Signale wurden auf das höchste Isotopensignal normiert, um es mit dem berechneten Isotopenmuster vergleichen zu können. Das Nebenprodukt konnte auf weniger als ein Drittel seines ursprünglichen Anteils reduziert werden und macht weniger als 10% des Produkts aus.

Aufgrund der geringen erhaltenen Mengen wurden die Ausbeuten von **P3** und **P4** durch Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von NMR ermittelt. Dazu wurden isolierte Signale ausgewählt, integriert und die Integrale mit dem Integral einer Sucrose-Probe bekannter

Konzentration ins Verhältnis gesetzt (s. AAV17, Gleichung (11)). Ein Faktor zur Korrektur der zu niedrigen Integrale bei unvollständiger Relaxation konnte durch Aufnahme mehrerer Spektren mit unterschiedlich langen Relaxationsdelays bestimmt und mit einbezogen werden.

Die deutlich schlechtere Ausbeute bei der Synthese von **P3** (Abbildung 21, 16%) im Vergleich zu **P4** (Abbildung 20, 59%) ist dadurch zu erklären, dass die Ultrafiltration wegen zwei defekter Membranen dreimal durchgeführt und die Lösung somit mehrfach umgefüllt werden musste. Dabei kam es jedes Mal zu Verlusten des Produkts durch unspezifische Adsorption an der Membran.

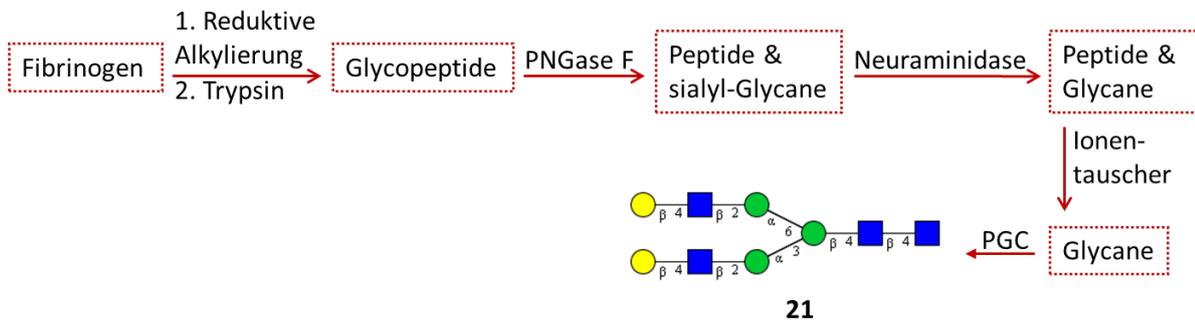
Abschließend lässt sich sagen, dass die Peptide und Glycopeptide **P2** bis **P4** erfolgreich synthetisiert werden konnten und zusammen mit dem bereits vorhandenen Peptid **P1** für weitere Studien zu ihren Bindungseigenschaften (Abschnitt 6.2) und ihren räumlichen Strukturen (Abschnitt 6.3) eingesetzt wurden.

#### 6.1.5 Isolierung eines Komplextyp-Nonasaccharids

Die V3-Region ist an Position N301 glycosyliert und weist im natürlichen *loop* ein Komplextyp-N-Glycan auf. Um den Einfluss dieses Glycans zu untersuchen, wäre es zukünftig interessant V3-Glycopeptide zu synthetisieren, die ein biantennäres Komplextyp-Nonasaccharid tragen. Solche Nonasaccharid-V3-Glycopeptide könnten ebenfalls als Template genutzt werden, um Antikörper zu generieren. Auf diese Weise erzeugte Antikörper würden möglicherweise auch das sterisch anspruchsvolle Glycan als Epitop nutzen, von dem bekannt ist, dass es den *loop* gegen das Immunsystem abschirmt.<sup>37</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Schritte zur Isolierung eines solchen Oligosaccharids aus bovinem Fibrinogen durchgeführt. Rinderfibrinogen hat den Vorteil, dass seine vier Glycosylierungsstellen eine einheitliche Glycosylierung aufweisen, bei denen es sich vor allem um biantennäre, sialylierte Komplextyp-Glycane handelt.<sup>171-173</sup> Außerdem soll bovines im Gegensatz zu porcinem Fibrinogen am ersten *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) keine  $\alpha$ 1-6-verknüpften Fucosen (Fuc) aufweisen, welche in vorangegangenen Arbeiten wiederholt zu Problemen bei der Glycopeptidsynthese führten.<sup>162,174,175</sup>

Die Isolierung der Glycane aus Fibrinogen wurde nach Kötzler *et al.* durchgeführt und erweitert.<sup>176,177</sup> Zunächst wurde das Fibrinogen mittels DTT, Guanidiniumchlorid und Iodacetamid denaturiert und alkyliert, um es für den enzymatischen Verdau durch Trypsin zugänglich zu machen (Abbildung 23). Die Spaltung des Fibrinogens durch Trypsin in kleinere

Glycopeptide und Peptide war nötig, da die Glycane sonst nicht durch N-Glycosidase F (PNGase F) abgespalten werden konnten. Der Versuch die Glycane direkt nach der reduktiven Alkylierung mit PNGase F vom Fibrinogen abzuspalten und durch Ethanol-Fällung vom Protein abzutrennen, führte zu keinem mittels MALDI- oder ESI-MS nachweisbaren Oligosaccharid.



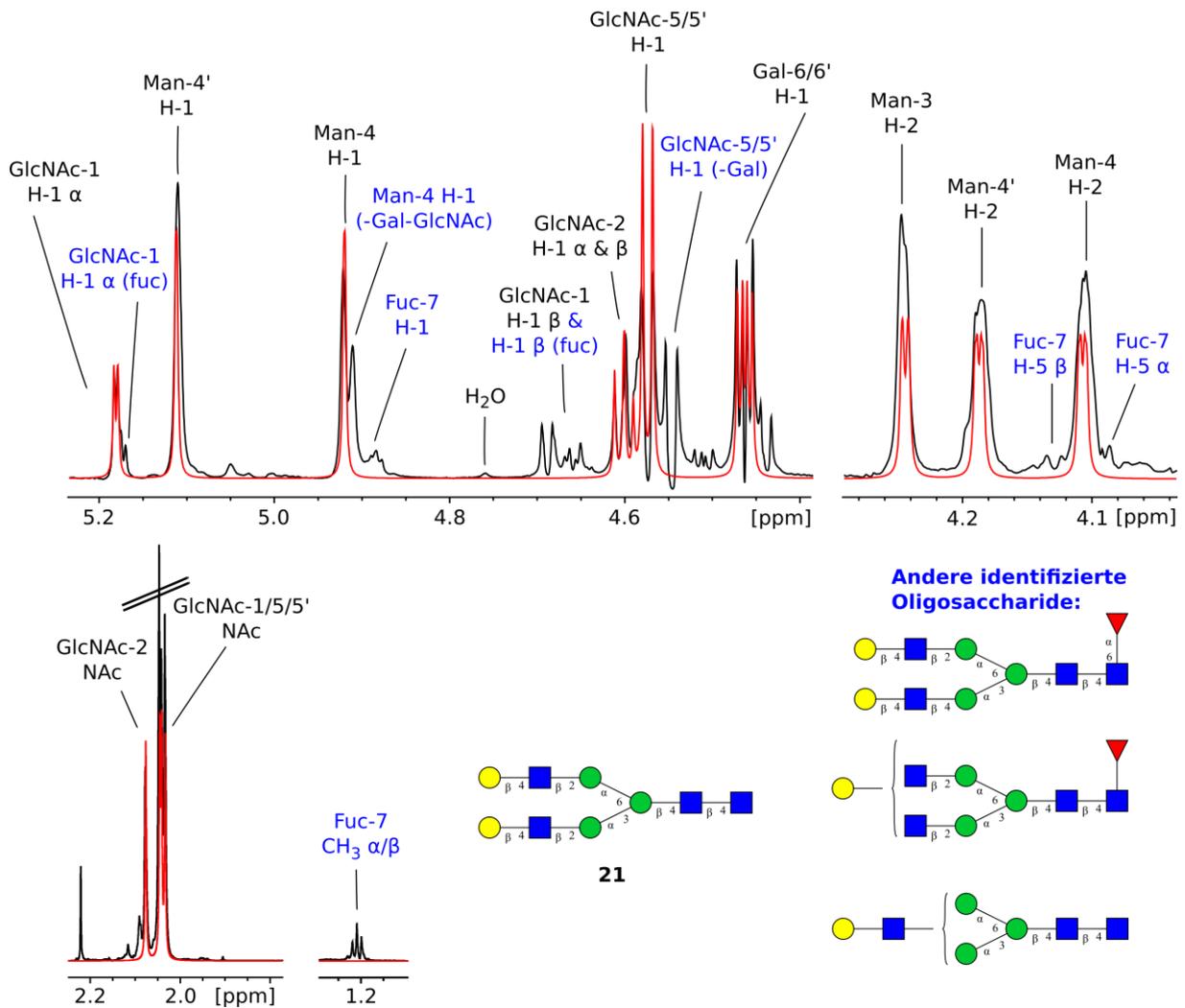
**Abbildung 23:** Workflow der Isolierung des Nonasaccharids **21** aus Rinderfibrinogen. Reduktive Alkylierung macht das Fibrinogen zugänglich für das Enzym Trypsin, das es in Glycopeptide spaltet. Durch PNGase F werden die Sialyl-Glycane abgespalten und Neuraminidase entfernt die terminalen Neuraminsäuren. Die Reinigung der Glycane erfolgte durch eine gemischte Ionentauscher-Säule sowie eine *Porous-graphitized-carbon*-Säule.<sup>177</sup> Der Versuch die Glycane durch direkte Inkubation des Fibrinogens mit PNGase F und anschließender Ethanol-fällung, ohne vorherige Spaltung durch Trypsin, zu erhalten war nicht erfolgreich.

Beim Trypsinverdau hat es sich bewährt, zweimal die halbe Menge statt einmal die gesamte Menge Trypsin einzusetzen, um Ausbeuteverluste durch den Selbst-Verdau des Enzyms zu vermeiden. Außerdem reichte es aus, Trypsin im Verhältnis 1:20 zum Fibrinogen einzusetzen statt wie beschrieben im Verhältnis 1:7. Auch beim PNGase F-Verdau konnte die Menge des benötigten Enzyms auf die Hälfte dessen gesenkt werden, was in der Literatur angegeben ist.<sup>177</sup> Nach Inkubation mit PNGase F wurde ein Gemisch aus Peptiden und sialylierten Glycanen erhalten, welches im nächsten Schritt mit Neuraminidase behandelt wurde. So wurde schließlich ein Gemisch aus Peptiden und asialo-Glycanen erhalten, die mit Hilfe einer gemischten Ionentauscher-Säule getrennt wurden. Die Reinigung des Nonasaccharids **21** erfolgte im letzten Schritt durch eine *Porous-graphitized-carbon*-Säule (PGC) an der HPLC. Das Nonasaccharid **21** wurde mit Hilfe des *Structural-reporter-groups*-Konzepts und der Datenbank *Sugabase* eindeutig mittels NMR identifiziert. Im NMR-Spektrum (Abbildung 24) zeigten sich jedoch noch andere trunkierte bzw. fucosylierte Oligosaccharide.<sup>178,179</sup> Aus etwa 7 g Rinderfibrinogen wurden ca. 4 mg des Produktgemischs erhalten, was gut mit der Literatursausbeute übereinstimmt.<sup>177</sup> In einer zweiten Fraktion wurden weitere 4 mg fast reines Decasaccharid, d.h. fucosyliertes **21**, erhalten.

Der Anteil der fucosylierten Glycane im Produktgemisch wurde aus dem Verhältnis der Integrale bestimmt und beträgt etwa 30%. Eine Erklärung für diese anderen vorhandenen Oligosaccharide könnte sein, dass im Gegensatz zu früheren Arbeiten<sup>162,173,175,177</sup> aus

Kostengründen (700 € statt >8000 € je 100 g) bovines Fibrinogen eines anderen Herstellers verwendet wurde. Möglicherweise ist dieses Fibrinogen anders glycosyliert.

Die Verwendung einer Fucosidase könnte die Reinheit und Ausbeute des Nonsaccharids erhöhen, indem die Fucosen des Decasaccharids abgespalten werden und entsprechend mehr Nonsaccharid **21** erhalten wird.



**Abbildung 24:** Experimentelles (schwarz) und berechnetes (rot)  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Nonsaccharids **21**. Die Signale wurden mit Hilfe des *Structural-reporter-group*-Konzepts und der Datenbank *Sugabase* zugeordnet.<sup>178,179</sup> Neben den Signalen des Nonsaccharids (schwarze Beschriftung) ließen sich weitere Signale den gezeigten fucosylierten und trunkeierten Oligosacchariden (blaue Beschriftung) zuordnen.

## 6.2 SPR-Bindungsstudien der Peptide und Glycopeptide

Die synthetisierten Peptide und Glycopeptide **P1** bis **P4** wurden im Hinblick auf ihre Bindungsaffinität zum CCR5-Rezeptor mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) untersucht (s. Abschnitte 4.2). Als Bindungspartner dienen CCR5-überexprimierende GHOST(3)-Hi5-Zellen, die den Rezeptor auf ihrer Oberfläche präsentieren. Als

Negativkontrolle wurden die entsprechenden Parentalzellen verwendet. Die GHOST(3)-Zellen (*green fluorescent human osteosarcoma*), die vom NIH Aids Reagent Program erhalten wurden, stammen von humanen Osteosarkomzellen ab und exprimieren bei Infektion mit HIV das *green fluorescent protein* (GFP). Weiterhin tragen sowohl die Hi5- als auch die Parentalzellen den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche.<sup>180</sup>

### 6.2.1 SPR-Messungen der Peptide und Glycopeptide P1-P4

Für die SPR-Messungen musste einer der Bindungspartner immobilisiert werden. Da es sich bei dem CCR5-Rezeptor um einen Transmembranrezeptor handelt, ist es nicht möglich ihn zu immobilisieren ohne seine Funktion zu zerstören. Daher wurden die Peptide und Glycopeptide **P1-P4** immobilisiert. Nachteilig hierbei ist, dass die verhältnismäßig kleinen Peptide durch die Dextranmatrix abgeschirmt werden können. Somit ist es möglich, dass dem CCR5-Rezeptor nicht immer die vollständigen Bindungsmotive der Peptide zugänglich sind.

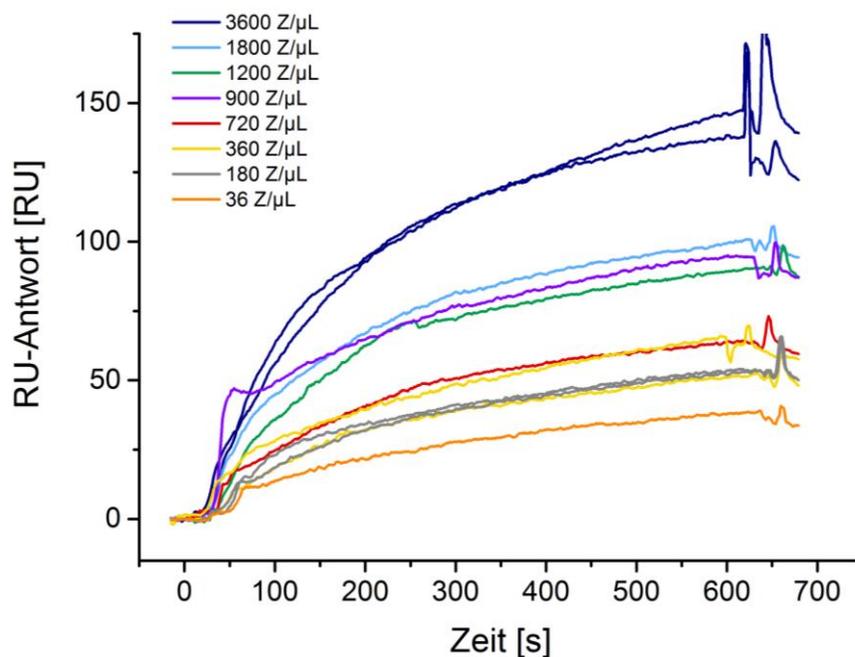
Die Immobilisierung der Liganden erfolgte auf einem CMD200-Sensorchip durch Amidkupplung. Da die Sequenz der peptidischen Liganden ein Lysin aufweist, gibt es zwei Aminofunktionen, also auch zwei mögliche Bindungsarten an den Sensorchip – über den N-Terminus oder die Seitenkette des Lysins. Die Amidkupplungen wurden aus diesem Grund bei leicht sauren Bedingungen durchgeführt, um die reaktivere Aminofunktion des Lysins in die unreaktivere Ammoniumform zu überführen. Der N-Terminus sollte möglichst unprotoniert vorliegen.

Die GHOST(3)-Zellen wurden als Suspensionen in PBS-Puffer mit den Konzentrationen 3600, 1800, 1200, 900, 720, 360, 180 und 36 Zellen/ $\mu\text{L}$  über die immobilisierten Peptide und Glycopeptide geleitet. Alle SPR-Messreihen wurden mehrfach wiederholt, um Fehler durch zerstörte Zellen auszumitteln. Auch innerhalb einer SPR-Messreihe wurden teilweise Messungen einzelner Zellkonzentrationen zu Beginn und zum Ende des Experiments wiederholt. Die Dissoziation der Zellen von den peptidischen Liganden war so langsam, dass ein Regenerationsschritt unumgänglich war. Die Regeneration wurde mit 0.5%iger Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) durchgeführt und musste teilweise bis zu neunmal wiederholt werden, um eine vollständige Rückkehr zur Basislinie zu erreichen.

Bei der Verwendung von ganzen Zellen als Bindungspartner sind theoretisch sehr hohe Massenzunahmen zu erwarten. Die SPR-Geräte detektieren jedoch nur bis zu einer Entfernung von 200 bis 300 nm Entfernung von der Chipoberfläche.<sup>181</sup> Das hängt mit der Reichweite des Evaneszenzfeldes zusammen, die etwa die Hälfte der verwendeten

Wellenlänge beträgt (s. Abschnitt 4.2). Dies hat wiederum zur Folge, dass der größte Teil der etwa 17  $\mu\text{m}$  großen Zellen aus dem Messbereich herausragt und folglich auch nicht bei der Massenzunahme erfasst wird.

Es wurden ca. 513 fmol des linearen, unglycosylierten Peptids **P1** auf dem Sensorchip immobilisiert. Die Sensorgramme lieferten maximale RU-Antworten von 40 bis 150 RU (Abbildung 25) und zeigten einen konzentrationsabhängigen Verlauf, der für eine spezifische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor spricht. Allerdings erreichen die Kurven innerhalb der Injektionsdauer kein Sättigungsplateau, was bedeutet, dass die Wechselwirkung des Peptids mit dem Rezeptor eher langsam ausgebildet wird.

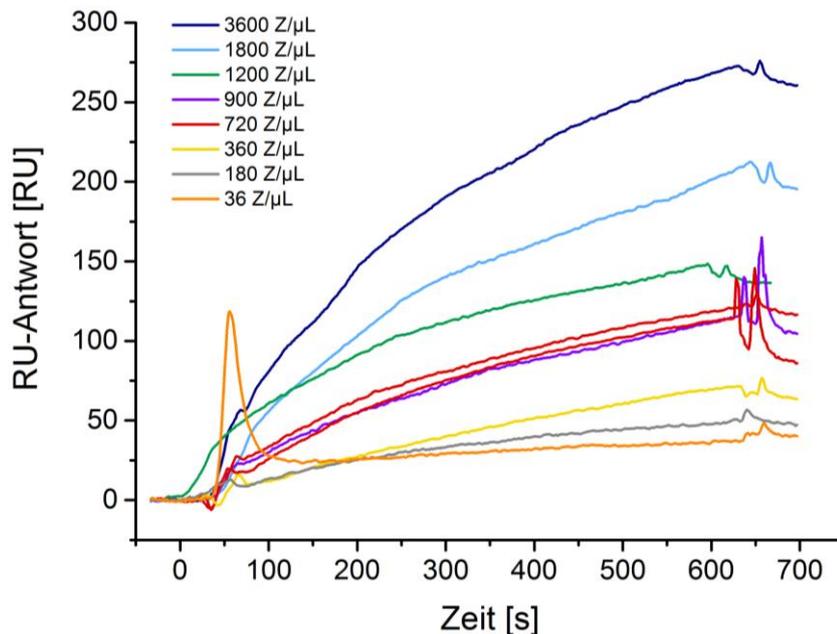


**Abbildung 25:** SPR-Sensorgramme des linearen Peptids **P1** mit CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen. Die RU-Antworten wurden gegen die Zeit aufgetragen und es wurden acht verschiedene Zellkonzentrationen vermessen. Die Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung ist eindeutig erkennbar.

Das lineare, glycosylierte Peptid **P2** wurde mit ca. 1.2 pmol auf dem Sensorchip immobilisiert und zeigte bei Kontakt mit den CCR5-überexprimierenden Zellen ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit der Sensorgramme (Abbildung 26). Die maximalen RU-Antworten lagen zwischen 35 und 270 RU. Der Verlauf der Sensorgramme spricht, wie bei **P1**, für eine langsame Assoziation. Der hohe Ausschlag der Kurve von 36  $\text{Z}/\mu\text{L}$  könnte sich durch Reste der SDS-Regenerationslösung erklären lassen, die vor der Messung nicht ausreichend durch Spülen entfernt wurden.

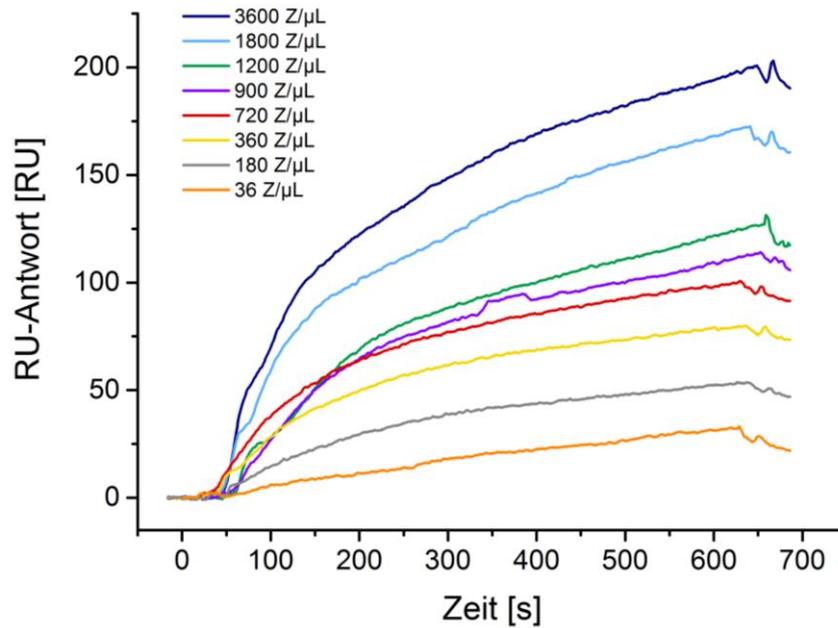
Da sich die Belegungen von **P1** und **P2** deutlich unterscheiden, lassen sich die Sensorgramme nicht direkt miteinander vergleichen. Es fällt jedoch auf, dass trotz der mehr als doppelt so

hohen Belegung von **P2**, nicht ganz doppelt so hohe maximale RU-Werte erreicht wurden. Aus früheren Studien mit V3-Peptiden ist bekannt, dass glycosylierte V3-Peptide stärkere Affinitäten zum CCR5-Rezeptor aufweisen als unglycosylierte. Ebenso führte die Zyklisierung durch Disulfidbrücken zu erhöhten Affinitäten im Vergleich zu linearen Peptiden.<sup>64,65,164</sup> Demzufolge wurde erwartet, dass **P2** zu mehr als doppelt so hohen RU-Antworten führen müsste wie **P1**.



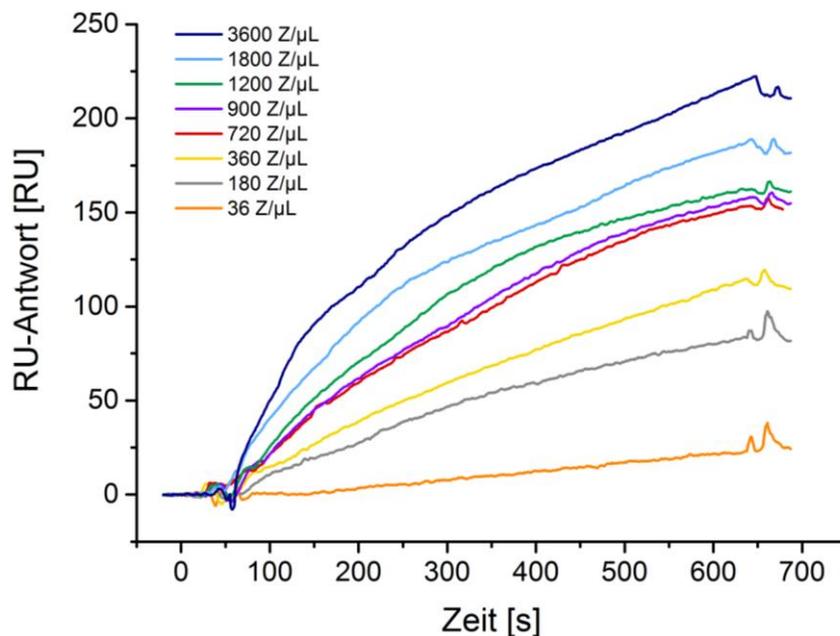
**Abbildung 26:** SPR-Sensorgramme des linearen Glycopeptids **P2** mit CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen. Die RU-Antworten wurden gegen die Zeit aufgetragen und es wurden acht verschiedene Zellkonzentrationen vermessen. Die Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung ist eindeutig erkennbar. Der starke Ausschlag zu Beginn der Kurve der Konzentration 36 Z/µL (orange) ist dadurch zu erklären, dass nach der vorherigen Regeneration mit SDS nicht ausreichend gespült wurde.

Die Belegung des zyklischen Peptids **P3** lag bei etwa 852 fmol und führte zu maximalen RU-Antworten von 30 bis 200 RU (Abbildung 27). Es ist wieder ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang der Sensorgramme sowie der nicht zu einer Sättigung führende Anstieg der Kurven erkennbar. Auch **P3** wechselwirkt somit spezifisch mit den Zellen.



**Abbildung 27:** SPR-Sensorgramme des zyklischen Peptids **P3** mit CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen. Die RU-Antworten wurden gegen die Zeit aufgetragen und es wurden acht verschiedene Zellkonzentrationen vermessen. Die Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung ist eindeutig erkennbar.

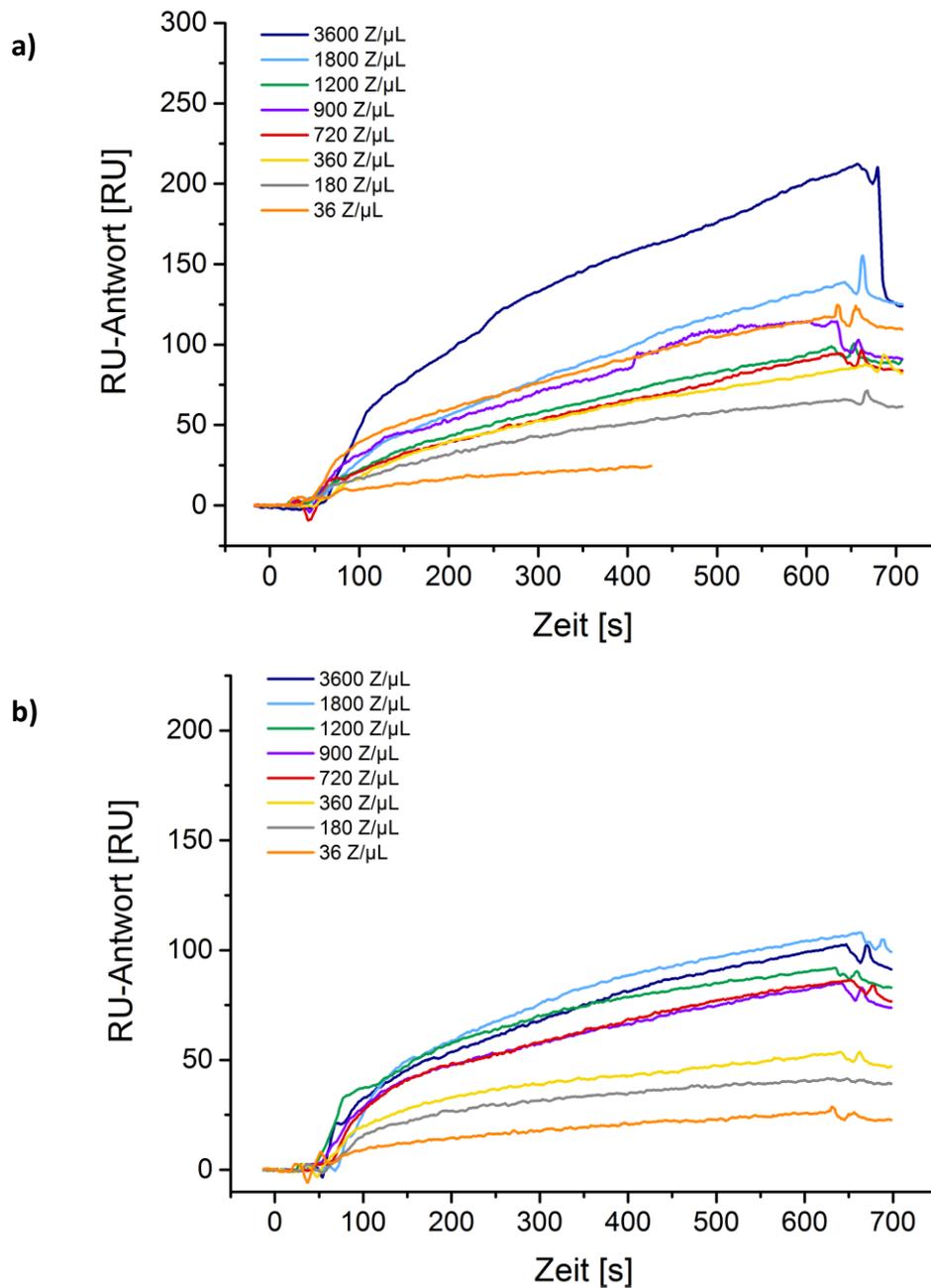
Zuletzt wurde das zyklische, glycosylierte Peptid **P4** mit ca. 363 fmol auf dem Sensorchip immobilisiert (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** SPR-Sensorgramme des zyklischen Glycopeptids **P4** mit CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen. Die RU-Antworten wurden gegen die Zeit aufgetragen und es wurden acht verschiedene Zellkonzentrationen vermessen. Die Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung ist eindeutig erkennbar.

Bei den Messungen wurden RU-Antworten von 20 bis 230 RU mit einem konzentrationsabhängigen Verhalten der Sensorgramme erhalten. Auch bei **P4** lassen die Kurven ohne Sättigungsplateau auf eine langsame Assoziation schließen.

Bei allen Peptiden wurden neben den Messungen mit Hi5-Zellen Negativkontrollen mit den entsprechenden Parentalzellen durchgeführt. In Abbildung 29 sind exemplarisch die Sensorgramme von **P2** und **P3** mit Parentalzellen gezeigt.



**Abbildung 29:** SPR-Sensorgramme des linearen Peptids **P2** (a) und des zyklischen Peptids **P3** (b) mit GHOST(3)-Parentalzellen. Die RU-Antworten wurden gegen die Zeit aufgetragen und es wurden acht verschiedene Zellkonzentrationen vermessen. Die RU-Antworten sind bei beiden Peptiden niedriger als bei den Hi5-Zellen (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27), aber zu hoch für eine eindeutige Negativkontrolle.

Die Bindungsstudien der Peptide mit den Parentalzellen zeigten kein eindeutiges Ergebnis. Die RU-Antworten beider Peptide sind zwar niedriger als bei den Messungen mit Hi5-Zellen, (um etwa 70 RU weniger bei **P2** und um etwa die Hälfte bei **P3**) aber zeigen immer noch eine deutliche Bindung der Peptide an die Parentalzellen. Das spricht entweder dafür, dass ein

nennenswerter Anteil der Wechselwirkungen der Parentalzellen unspezifischer Natur ist. So könnte es auch sein, dass die Peptide an ein anderes Protein der Zellen binden, gerade im Hinblick darauf, dass die Zellen höchstwahrscheinlich zerstört sind. Dadurch könnte eine Bindung an ein Protein aus dem Inneren der Zelle vorliegen. Möglicherweise wurden aber auch die Parentalzellen mit CCR5-exprimierenden Zellen kontaminiert, sodass die Negativkontrolle weniger negativ ausfällt als erwartet. Oder sie sind zwar nicht mit dem CCR5-Rezeptor kontaminiert, aber in irgendeiner anderen Weise gealtert, sodass es zu einer Interaktion mit den Peptiden kam. Außerdem könnte es sein, dass die CCR5-exprimierenden Hi5-Zellen teilweise ihren Vektor verloren haben und demnach nicht mehr ausreichend CCR5 exprimieren, um sich stärker von den Parentalzellen zu unterscheiden.

Ob die Zellen tatsächlich kontaminiert oder verändert vorlagen, wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abschnitt 6.2.4).

#### 6.2.2 Bindungskurven der Peptide und Glycopeptide P1-P4

Die Ergebnisse der SPR-Experimente wurden thermodynamisch ausgewertet und die erhaltenen Bindungskurven der vier Peptide werden im Folgenden vorgestellt. Der Vergleich und die Diskussion erfolgen im Anschluss. Eine kinetische Auswertung war aufgrund der sehr langsamen Dissoziation nicht möglich.

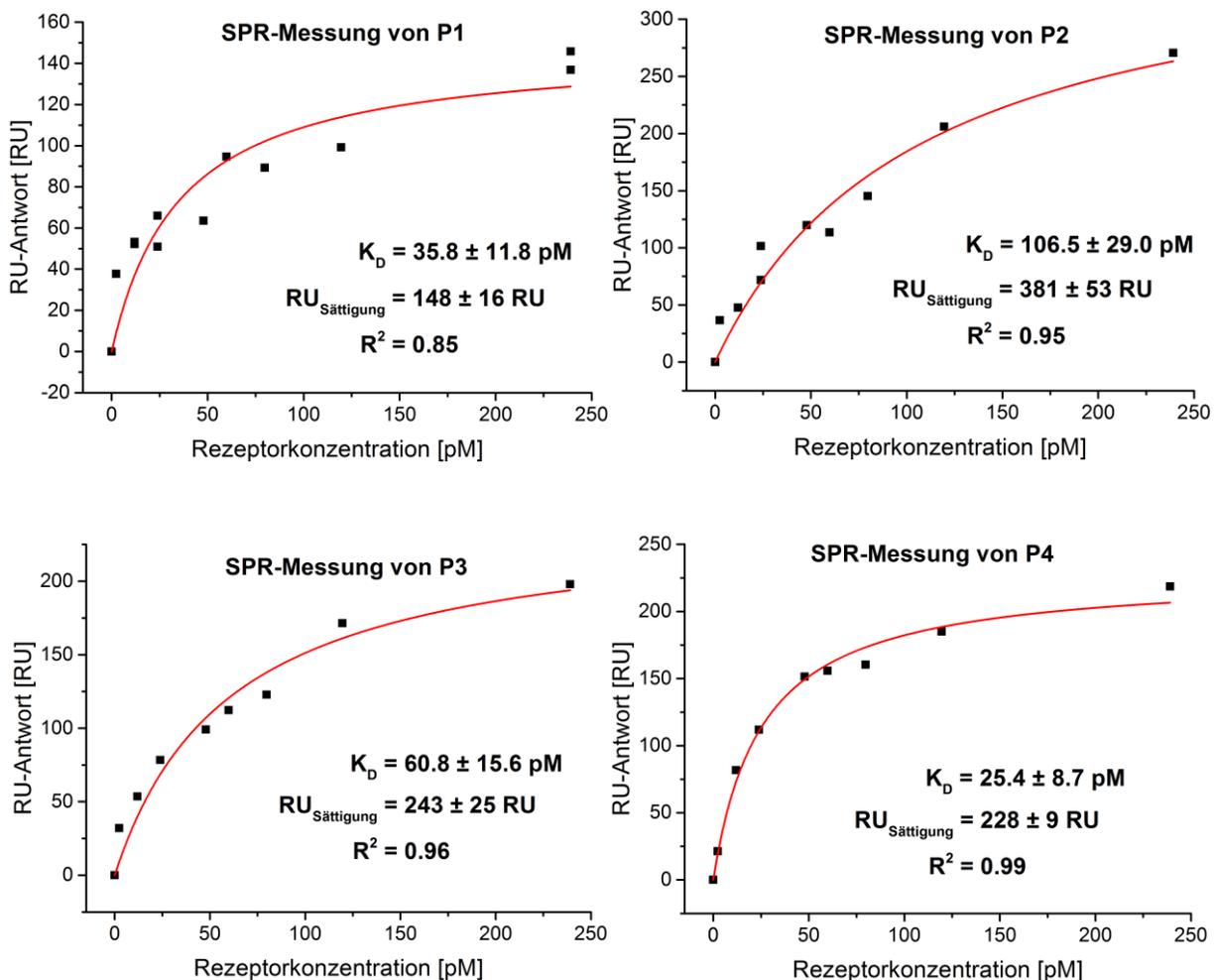
Die Zahl der CCR5-Rezeptoren auf der Oberfläche der GHOST(3)-Hi5-Zellen wurde zuletzt von B. Jürs mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf einen Wert von  $4 \cdot 10^4$  bestimmt.<sup>1</sup> Auch nach mehrmaligem Passagieren der Zellen blieb der Wert konstant. Anhand dieses Werts wurden ausgehend von den verwendeten Zellkonzentrationen (36 bis 3600 Z/ $\mu$ L) Rezeptorkonzentrationen von 2.4 bis 240 pmol berechnet. Die jeweils maximalen RU-Antworten wurden gegen die Rezeptorkonzentration aufgetragen und an das *One-site-binding*-Modell angepasst. Zusätzlich wurde jeweils ein künstlicher Nullpunkt eingefügt.

Aufgrund der Größe von etwa 17  $\mu$ m pro Zelle ist theoretisch davon auszugehen, dass eine einzelne Zelle mehrere Peptide gleichzeitig bindet, wobei es durch die wirkenden Scherkräfte wahrscheinlich zur Zerstörung der Zellen und Bindung von Zellfragmenten kommt. Aus diesem Grunde wäre das *One-site-binding*-Modell, das von einer 1:1-Bindung ausgeht, eigentlich ungeeignet. Um der multivalenten Bindung gerechter zu werden, wurde versucht, die Werte an das *Two-site-binding*-Modell anzupassen. Die Anpassung war jedoch deutlich schlechter als beim *One-site-binding*-Modell oder ließ sich z.T. gar nicht durchführen. So wurde letztlich doch das *One-site-binding*-Modell verwendet.

Es ist nicht bekannt, wieviele Rezeptoren sich auf der Seite der Zelle befinden, die gerade zu den immobilisierten Peptiden zeigt. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die Zellen z.T. durch Scherkräfte bei der Injektion zerrissen werden und nur noch Membranfragmente mit den Peptiden wechselwirken. Entsprechend stark könnten die wahren Rezeptorkonzentrationen von den hier zur Berechnung verwendeten abweichen.

Aus den genannten Gründen sollten die mittels SPR bestimmten  $K_D$ -Werte keinesfalls als absolut betrachtet werden, sondern lediglich als Abschätzung zum relativen Vergleich der Peptide untereinander dienen.

Abbildung 30 zeigt die erhaltenen Bindungskurven der vier Peptide und Glycopeptide **P1** bis **P4**. Aus der Anpassung für das lineare, unglycosylierte Peptid **P1** ergibt sich eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $35.8 \pm 11.8$  pM. Der Sättigungswert der RU-Antwort bei unendlicher Rezeptorkonzentration beträgt 148 RU. Demnach ist die Sättigung bei der höchsten verwendeten Konzentration fast erreicht worden.



**Abbildung 30:** Bindungsisothermen der Peptide **P1** bis **P4**. Aufgetragen wurden die RU-Antworten gegen die berechneten Rezeptorkonzentrationen. Es wurde jeweils ein künstlicher Nullpunkt eingefügt und eine Anpassung an das *One-site-binding*-Modell vorgenommen.

Die aus dem *One-site-binding*-Modell erhaltene Bindungskurve des linearen Glycopeptids **P2** ergibt eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $106.5 \pm 29.0$  pM. Die RU-Antwort bei unendlich hoher Rezeptorkonzentration wurde zu 381 RU berechnet. Die experimentell erhaltene maximale RU-Antwort der höchsten Konzentration lag mit 270 RU demzufolge bei etwa zwei Dritteln des Sättigungswertes. Unter der Annahme einer 1:1-Bindung von Peptid und CCR5-Rezeptor (40 kDa) ergibt sich für eine Belegung von 100% der möglichen Bindungsstellen (1 pmol immobilisiertes Peptid) eine zu erwartende maximale RU-Antwort von 40000 RU. Das bedeutet, dass maximal 1% der möglichen Bindungsstellen für die Bindung genutzt wurden, was sehr wahrscheinlich daran liegt, dass die Zellen bzw. Zellfragmente zu groß sind, um in die Dextranschicht eindringen zu können. Dieses Ergebnis spricht letztlich sehr dafür, dass die Zellen durch Scherkräfte zerstört wurden und nur noch Zellfragmente vorliegen, da sonst eine noch sehr viel höhere Massenzunahme und maximale RU-Antwort zu erwarten wären.

Für das zyklische, unglycosylierte Peptid **P3** ergibt sich eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $60.8 \pm 15.6$  pM und der theoretische Sättigungswert der Kurve liegt bei 243 RU. Bei der höchsten Konzentration lag entsprechend schon fast der gesättigte Zustand vor.

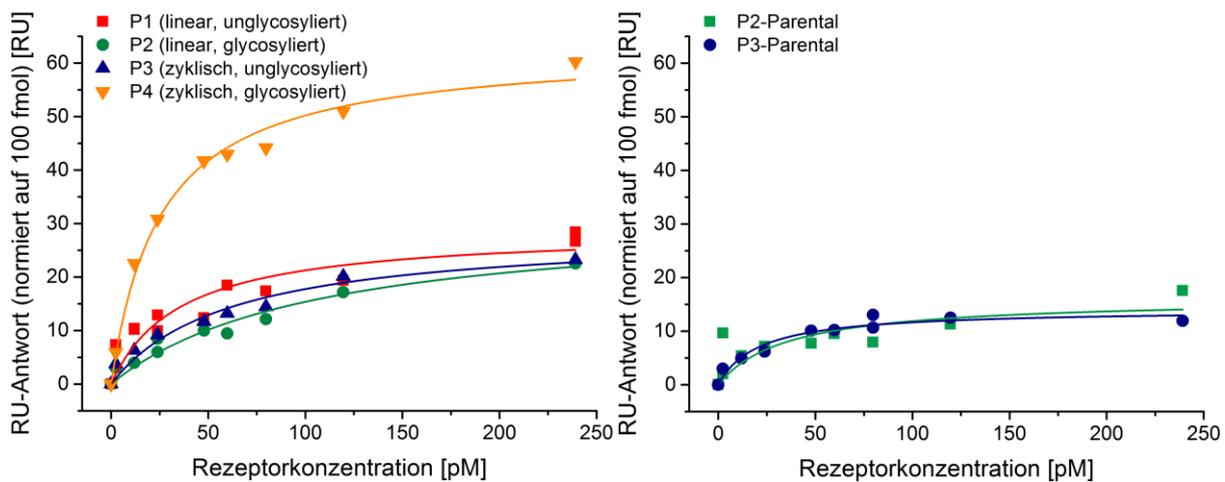
Die Dissoziationskonstante  $K_D$  des zyklischen, glycosylierten Peptids **P4** lag bei  $26.4 \pm 8.7$  pM. Der theoretische Sättigungswert bei unendlich hoher Rezeptorkonzentration liegt bei 228 RU, was in etwa dem experimentellen maximalen RU-Wert der höchsten Konzentration entspricht.

### 6.2.3 Vergleich und Diskussion der Ergebnisse

Die Belegung der Sensorchips mit den verschiedenen Peptiden fiel sehr unterschiedlich aus, weshalb die jeweiligen Bindungskurven zur besseren Vergleichbarkeit auf 100 fmol normiert wurden (Abbildung 31, links). Aus dem normierten Vergleich der Bindungskurven wird sofort ersichtlich, dass das zyklische Glycopeptid **P4** die höchsten RU-Antworten lieferte und die niedrigste Dissoziationskonstante zeigte. Damit sollte es die höchste Bindungsaffinität der vier Peptide aufweisen. Die Bindungskurven von **P1**, **P2** und **P3** liegen sehr dicht beieinander. Das lineare, unglycosylierte Peptid **P1** zeigt etwas höhere RU-Antworten und einen niedrigeren  $K_D$  als **P2** und **P3**. Dieses Ergebnis ist anders als bei nativen Peptiden, da in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, dass zyklisierte V3-Peptide eine höhere Bindungsaffinität aufweisen als lineare und glycosylierte Peptide eine höhere als unglycosylierte.<sup>64,65,162,164</sup>

Das zyklische Peptid **P3** hat geringere RU-Antworten und einen höheren  $K_D$ -Wert als das entsprechende Glycopeptid **P4**. Und das lineare Glycopeptid **P2** weist eine geringere Bindungsaffinität auf als das zyklische, unglycosylierte Peptid **P3**.

Eine mögliche Erklärung für die höheren RU-Antworten von **P1** könnte sein, dass nach der Immobilisierung des Sensorchips mit **P1**, welche als erste der vier Immobilisierungen durchgeführt wurde, nicht ausreichend lange regeneriert wurde. Dadurch wäre die wahre Basislinie niedriger und die tatsächliche Belegung müsste höher sein. Folglich müssten die RU-Antworten von **P1** nach Normierung auf 100 fmol kleiner ausfallen. Da die drei Kurven von **P1** bis **P3** alle sehr dicht beieinander liegen, könnte es gut sein, dass eine nur leicht höhere Stoffmenge bei der Belegung dazu führen würde, dass die Kurve von **P1** unter den anderen beiden Kurven von **P3** und **P2** läge. Letztlich handelt es sich aber doch um verschiedene Moleküle mit unterschiedlichen Konformationen, gerade auch im Vergleich zu den analogen, nicht trunkierten V3-Peptiden, deren Bindungsverhalten dementsprechend nicht mit früheren Studien übereinstimmen muss.



**Abbildung 31:** Vergleich der Bindungskurven der vier Peptide **P1** bis **P4** für die Interaktion mit Hi5-Zellen nach Normierung auf 100 fmol (*links*). Es wurden die normierten RU-Antworten gegen die Rezeptorkonzentrationen aufgetragen. Das zyklische Glycopeptid **P4** zeigte erwartungsgemäß die höchsten RU-Antworten. Das lineare, unglycosylierte **P1** weist unerwartet die zweithöchsten RU-Antworten auf, gefolgt vom zyklischen, unglycosylierten **P3**. Die niedrigsten RU-Antworten lieferte das lineare Glycopeptid **P2**. Insgesamt liegen die Kurven von **P1** bis **P3** aber sehr dicht beieinander und in derselben Größenordnung. *Rechts*: Auftragung der auf 100 fmol normierten RU-Antworten gegen die Rezeptorkonzentrationen der exemplarischen Parentalzellmessungen von **P2** und **P3**. Beide Kurven weisen einen ähnlichen Verlauf auf und liegen unterhalb der entsprechenden Kurven für die Wechselwirkung mit den Hi5-Zellen.

Aus der Auftragung der ebenfalls auf 100 fmol normierten RU-Antworten der Parentalzellmessungen von **P2** und **P3** (Abbildung 31, rechts) wird ersichtlich, dass beide Kurven einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen. Die Kurven liegen mit ca. 10 RU etwa bei halb so hohen RU-Antworten wie die entsprechenden Kurven der CCR5-Wechselwirkung. Das deutet darauf hin, dass es eindeutig zu einer spezifischen Wechselwirkung der

verschiedenen Peptide mit dem CCR5-Rezeptor kam. Wodurch die Bindung an die Parentalzellen tatsächlich verursacht wird, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden.

Insgesamt sind die RU-Antworten mit 20 bis 60 RU der höchsten Rezeptorkonzentration jedoch deutlich niedriger als in früheren Arbeiten, in denen für vergleichbare Peptide und Glycopeptide bei Normierung auf 100 fmol RU-Antworten von 100 bis 200 RU erhalten wurden.<sup>64</sup> Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass in jener SPR-Studie von J. Dojahn ein Pioneer F1-Sensorchip verwendet wurde, der bei gleicher Anzahl der Carboxymethyl-Funktionen eine kürzere Dextranmatrix aufweist als ein CM5-Sensorchip.<sup>64,182</sup> Die Dextranmatrix des CM5-Sensorchips hat eine Höhe von 100 nm, während die in dieser Arbeit verwendeten CMD200-Sensorchips eine Dextranschicht von 200 nm aufweisen.<sup>183</sup> Das hat zur Folge, dass die hier verwendeten Chips eine deutlich dickere Dextranschicht und folglich eine deutlich höhere Belegung von 360 fmol bis 1.2 pmol haben, als die F1-Chips in der Studie von J. Dojahn (ca. 50 fmol). Tatsächlich sind die Zellen mit ca. 17 µm Durchmesser aber viel zu voluminös, um in die Dextranschicht eindringen zu können. Demzufolge können nur die äußersten, immobilisierten Peptide für eine Interaktion genutzt werden, wodurch die tatsächlich nutzbare, immobilisierte Stoffmenge der Peptide **P1** bis **P4** deutlich geringer sein muss.

Die größere Dextranmatrix ist zudem verantwortlich für die problematische Regeneration, die sehr oft wiederholt werden musste und ein Vielfaches der Zeit der eigentlichen Messung in Anspruch nahm. In früheren Studien wurde deshalb häufig der CM3-Sensorchip verwendet, der eine nur etwa 30 nm dicke Dextranschicht aufweist und keine Probleme bei der Regeneration verursachte.<sup>65</sup>

Weitere Gründe für geringere RU-Antworten, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, sind wahrscheinlich i) die fehlende PND und ii) eine geringere Injektionszeit als in vergleichbaren Studien.

Die hochkonservierte PND, die sich in der Spitze des *V3-Loops* befindet und bei den hier untersuchten Peptiden fehlt, ist ein Teil des Motivs, das den CCR5-Rezeptor an der ECL2 bindet.<sup>2,38</sup> Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass die trunkierten Peptide ohne PND eine verringerte Bindungsaffinität zum CCR5-Rezeptor aufweisen als die Peptide mit PND aus früheren Studien.<sup>64,65</sup> Zudem könnte es sein, dass die Peptide durch die Trunkierung eine veränderte Konformation aufweisen als native V3-Peptide und deshalb auf andere Art mit dem CCR5-Rezeptor interagieren.

Die Injektion in den hier durchgeführten SPR-Experimenten erfolgte über zehn Minuten, während in der Vergangenheit meist über zwölf Minuten injiziert wurde.<sup>1,162,164</sup> Folglich

hätten die Sensorgramme mit zwei Minuten längerer Injektionszeit jeweils etwas höhere maximale RU-Antworten erreichen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Peptide **P1** bis **P4** trotz der fehlenden PND den CCR5-Rezeptor spezifisch binden. Aufgrund des ungünstig gewählten Sensorchiptyps konnte nur ein Bruchteil der theoretisch verfügbaren Bindungsstellen tatsächlich zur Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor genutzt werden.

Versuche die Peptide an einen Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln und die Bindungskonstanten mit der Methode der Durchflusszytometrie zu bestimmen, wurden nicht weiter verfolgt, da die Ausbeuten der Kupplung bei verschiedenen Bedingungen jeweils unter 10% lagen.

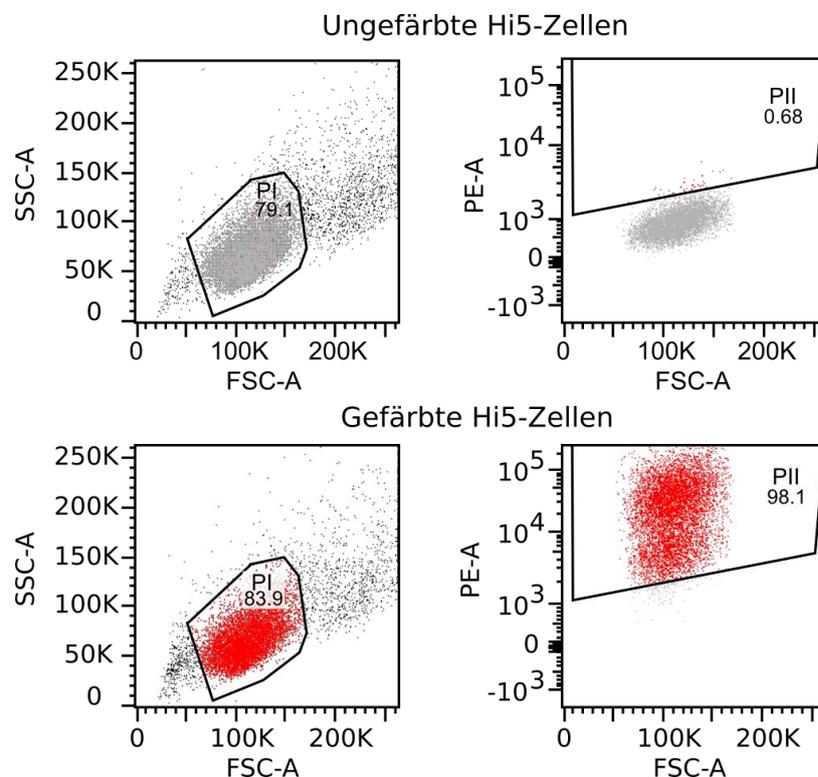
#### **6.2.4 Durchflusszytometrische Kontrolle der GHOST(3)-Zellen mit einem Anti-CCR5-Antikörper**

Um auszuschließen, dass die unerwartet hohen RU-Antworten der Parentalzellen (vgl. Abbildung 29) durch Kontamination mit CCR5-exprimierenden Zellen verursacht wurden, wurde eine Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Durchflusszytometrie-messungen wurden an einem FACS Cantoll der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) im Rahmen der *FACS Sorting Core Unit* durchgeführt. Dafür wurden GHOST(3)-Parentalzellen und Hi5-Zellen mit einem Phycoerithrin-gelabelten (PE) CCR5-spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Von den Parentalzellen wurden zwei unterschiedliche Chargen untersucht. Die eine Charge entsprach den frischen Parentalzellen, die auch für die SPR-Experimente im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Bei der anderen Charge handelte es sich um ältere Zellen, die in früheren SPR-Studien eingesetzt wurden, aber schon vier Jahre bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Bei der alten Parentalzellcharge wurde eine Kontamination vermutet, da sie auch nach Zugabe von Puromycin gewachsen sind, obwohl die Parentalzellen kein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum besitzen. Die Emissionen von jeweils 10000 Zellen wurden per Durchflusszytometrie vermessen.

Der Farbstoff-markierte Antikörper sollte im Idealfall spezifisch an die Hi5-Zellen binden, die den CCR5-Rezeptor auf der Oberfläche tragen. Die Hi5-Zellen dienen demnach als Positivkontrolle. An die Parentalzellen sollte keine Bindung stattfinden, da sie, sofern keine Kontamination vorliegt, keinen CCR5-Rezeptor anzubieten haben. Von den unterschiedlichen Zellen wurden jeweils eine Probe ohne und eine Probe mit dem PE-markierten Antikörper vermessen. Zur Auswertung wurde die Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) sowie die Fluoreszenzintensität des PE-Kanals gegen die Vorwärtsstreuung

aufgetragen. So war es möglich, unterschiedliche Populationen zu identifizieren. Da die Vorwärtsstreuung ein Maß für die Größe der Zellen ist, können die lebendigen Zellen von den toten unterschieden werden. In der *Dotplot*-Auftragung SSC gegen FSC der Positivkontrolle (gefärbte Hi5-Zellen) wurde folglich zunächst eine Population PI bestimmt, in dem die lebenden, funktionellen Zellen zu finden sind. Zellen bei kleineren FSC-Emissionen sind tote Zellen und die, die größere Emissionen verursachen, sind vermutlich lebende Zellen mitten in der Zellteilung und deshalb bis zu doppelt so groß wie die funktionellen Zellen. Für die Zellen der PI-Population wurden anschließend *Dotplots* mit der Auftragung der PE-Intensitäten gegen die FSC-Emissionen erstellt, anhand derer sich unterscheiden ließ, ob die Zellen an den PE-markierten Antikörper gebunden sind. Die Zellpopulationen, die eine erhöhte PE-Fluoreszenz hervorriefen und somit den Antikörper gebunden hatten, wurden in dem Bereich PII identifiziert. Die beiden Populationsbereiche PI und PII wurden anschließend für die jeweiligen Parentalzellproben übernommen.

Die Ergebnisse der Messungen der Hi5-Zellen sind in Abbildung 32 dargestellt. Der Anteil der lebendigen, funktionalen Zellen im Bereich PI (grau) lag sowohl bei den unbehandelten Zellen als auch bei den Antikörper-markierten Zellen bei etwa 80% (79% bzw. 84%).

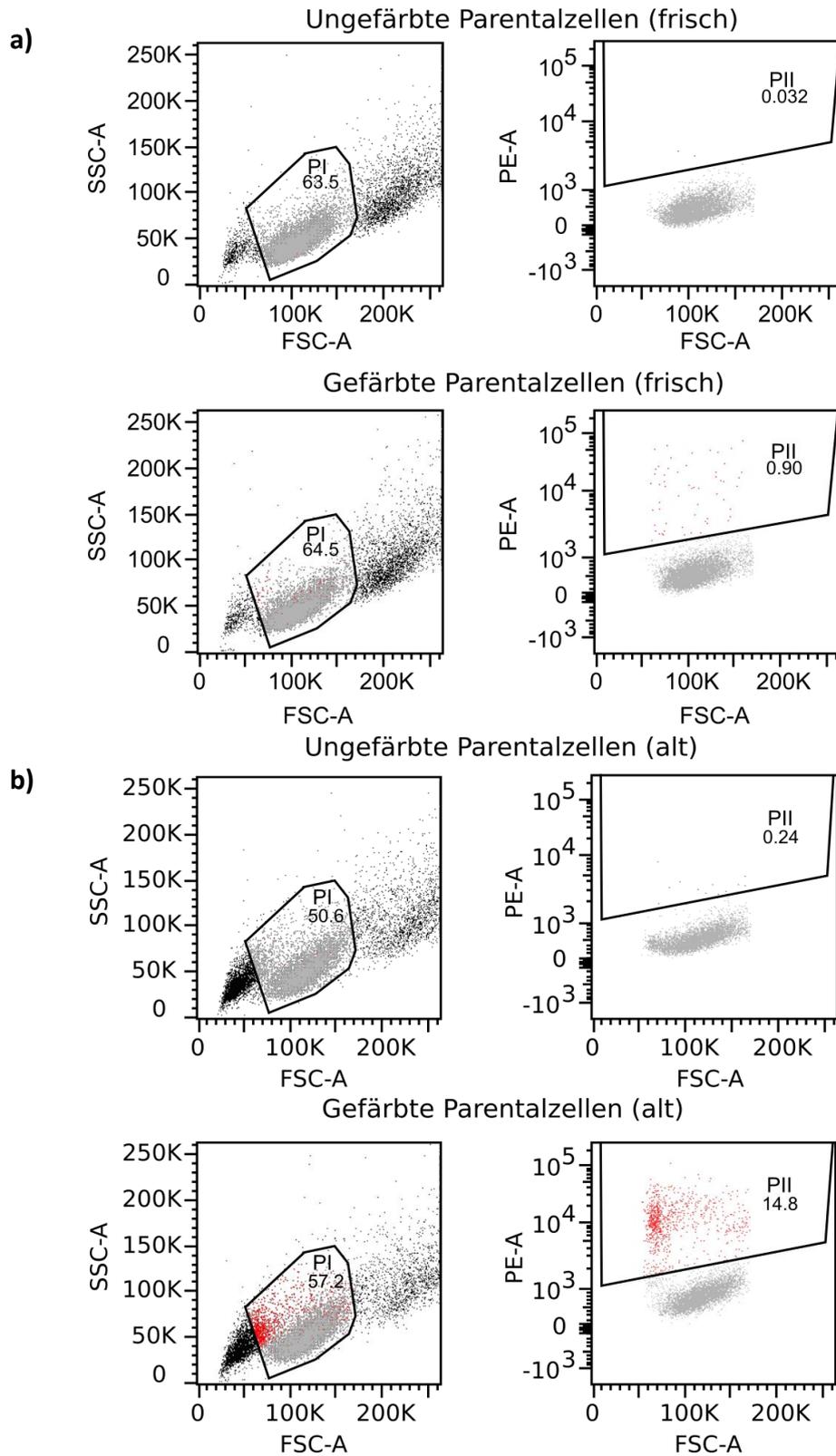


**Abbildung 32:** Durchflusszytometriemessung mit GHOST(3)-Hi5-Zellen ohne (ungefärbt) und mit (gefärbt) PE-markiertem Anti-CCR5-Antikörper. Es wurden zum einen die Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen, um die lebendigen (PI, grau) von den toten und den sich teilenden Zellen (schwarz) unterscheiden zu können. Des Weiteren wurden von der lebendigen Population PI die PE-Fluoreszenzintensitäten gegen FSC aufgetragen, um die Zellen zu erkennen, die den markierten Anti-CCR5-AK gebunden haben (PII, rot). Von den lebendigen Hi5-Zellen haben 98% den AK gebunden.

Aus der Auftragung PE gegen FSC lassen sich die Zellen, die keinen Antikörper gebunden haben von den gefärbten Zellen (PII, rot) unterscheiden. Der Anteil der Zellen, die den CCR5-spezifischen Antikörper gebunden haben beträgt 98%, bezogen auf die lebende Population PI und 82% in Bezug auf die gesamten vermessenen Zellen. In der ungefärbten Negativkontrolle ohne Antikörper liegt der Anteil der Zellen, die im Bereich PII liegen, bei 0.7% der lebenden Population PI. Demnach konnte die Bindung der Hi5-Zellen an den CCR5-spezifischen Antikörper bestätigt werden. Die *Dotplots* der ungefärbten frischen Parentalzellen unterscheiden sich kaum von denen, die mit dem PE-markierten Antikörper inkubiert wurden (Abbildung 33a). Beide Proben hatten einen Anteil funktionaler, lebendiger Zellen von etwa 65% (PI, grau). Der Anteil der Zellen, die vermutlich mitten in der Zellteilung stecken war bei den Parentalzellen höher als bei den Hi5-Zellen, während der Anteil der toten Zellen etwa gleich war. Weniger als 1% der Zellen aus PI wiesen eine erhöhte PE-Fluoreszenz auf und lagen im Bereich PI (rot). Bei den gefärbten Zellen lag dieser Anteil mit 0.9% minimal höher als bei den ungefärbten Zellen mit 0.03%. Aus der Auftragung SSC gegen FCS ist aber zu erkennen, dass ein nennenswerter Teil der rot dargestellten PII-Zellen in dem Bereich der toten Zellpopulation verortet sind. Entsprechend handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die toten Parentalzellen. Noch deutlicher wird das aus den *Dotplots* der älteren Parentalzellcharge (Abbildung 33b). Der Anteil der Population PI von der Gesamtzahl der Zellen liegt je nach Probe zwischen 50 und 57%. Aus den *Dotplots* ist aber auch zu erkennen, dass ein Teil der toten Zellpopulation (<80k FSC-A) in den Bereich PI hineinragt und somit die Zahl funktionaler, lebendiger Zahlen in Wirklichkeit noch kleiner ist.

Bei der gefärbten Probe zeigt sich, dass 15% der PI-Zellpopulation an den Antikörper gebunden vorlagen. Aus dem *SSC-FSC-Dotplot* wird jedoch deutlich, dass die rot markierten Zellen (PII) hauptsächlich im Bereich der toten Zellpopulation liegen. Der höhere Anteil toter Zellen erklärt sich durch die lange Lagerung bei -80 °C, die für Zellen nicht ideal ist. Besser wäre eine Langzeitlagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C, was hier aber technisch nicht möglich war.<sup>184</sup>

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Hi5-Zellen den CCR5-Rezeptor tragen und spezifisch den PE-markierten Antikörper binden, während die Parentalzellen eindeutig keinen CCR5-Rezeptor anzubieten haben und entsprechend niedrige PE-Fluoreszenzintensitäten liefern. Es zeigte sich jedoch eine unspezifische Bindung des Antikörpers an tote Zellen, die in der lange gelagerten Parentalzellcharge vermehrt vorhanden waren.



**Abbildung 33:** Durchflusszytometriemessung mit **a)** frischen und **b)** älteren GHOST(3)-Parentalzellen ohne (ungefärbt) und mit (gefärbt) PE-markiertem Anti-CCR5-Antikörper. Anhand der Auftragung SSC gegen FSC wurden die lebendigen (PI, grau) von den toten und den sich teilenden Zellen (schwarz) unterschieden. Der Anteil der funktionalen, lebenden Zellen betrug etwa 65% **(a)** bzw. 54% **(b)**. Des Weiteren wurden von der lebendigen Population PI die PE-Fluoreszenzintensitäten gegen FSC aufgetragen, um die Zellen zu erkennen, die den markierten Anti-CCR5-AK gebunden haben (PII, rot). Von der Population PI haben 0.9% **(a)** bzw. 15% **(b)** den AK gebunden.

### 6.3 Strukturelle Analyse der V3-Peptide

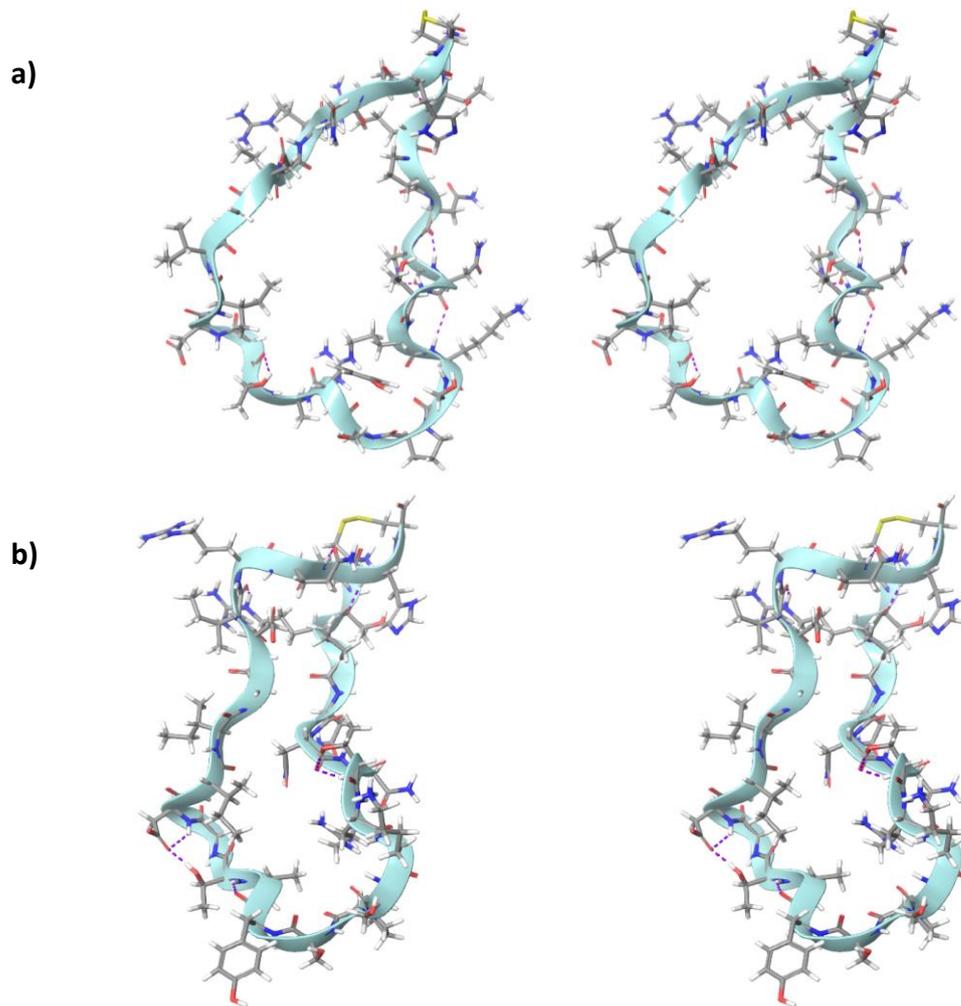
Der Einfluss der Glycosylierung und der Trunkierung der Peptidsequenz sollte mittels *molecular modeling* untersucht werden. Hierfür wurden die Strukturen der beiden synthetisierten zyklischen Peptide **P3** und **P4** sowie eines entsprechenden zyklischen Glycopeptids mit dem Nonasaccharid als Glycan berechnet. Anschließend wurde für die Peptide **P3** und **P4** ausgehend von den durch NMR erhaltenen Torsionswinkeln und Protonenabständen eine Konformationsanalyse durchgeführt. Durch *Distance-geometry*-Rechnungen wurden entsprechende 3D-Strukturen erstellt. Die Ergebnisse der Strukturvorhersage und der experimentellen Strukturen wurden miteinander verglichen. Zuletzt wurde das Nonasaccharid-Glycopeptid in die kürzlich veröffentlichte Röntgenkristallstruktur des CCR5-Rezeptors modelliert.

#### 6.3.1 *In-silico*-Strukturanalyse

Die Strukturen der zyklischen Peptide **P3** und **P4** wurden mit Hilfe von *molecular modeling* berechnet und untersucht. Des Weiteren wurde ein V3-Glycopeptid gleicher Sequenz analysiert, welches statt Chitobiose das zuvor beschriebene Nonasaccharid (**19**) als Glycan trägt und somit dem natürlichen V3-Loop ähnlicher ist.

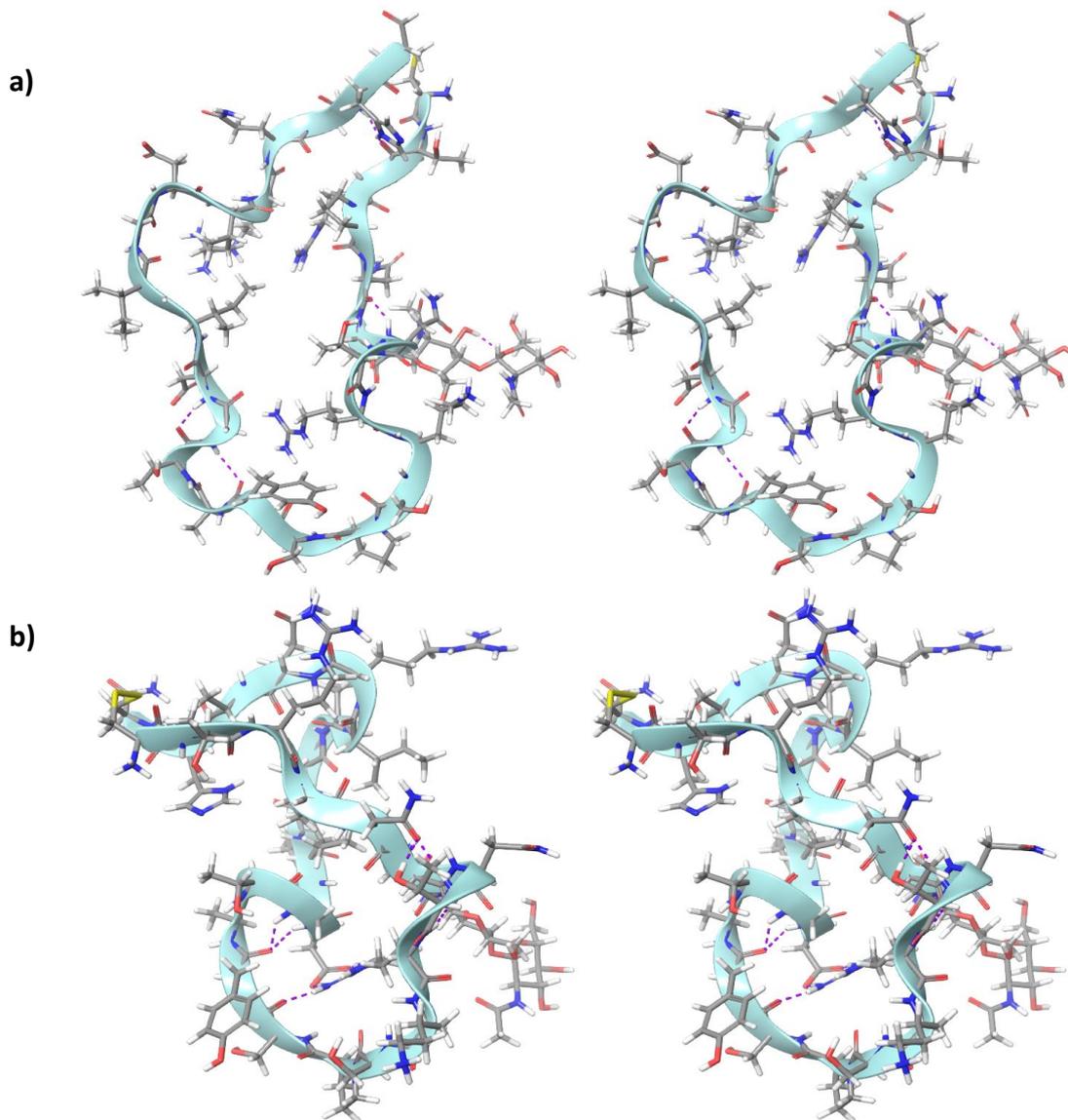
Als Ausgangsstruktur der zyklischen V3-Peptide diente die Endstruktur einer früheren Moleküldynamiksimulation (MD) der gp120-Röntgenstruktur (2B4C).<sup>51</sup> Die gp120-Struktur wurde dafür auf den V3-Loop reduziert, die PND deletiert und entsprechende Mutationen eingefügt, um der in dieser Arbeit verwendeten trunkierten Konsensussequenz zu entsprechen. Für die drei verschiedenen V3-Peptide (unglycosyliert, Chitobiosyl-V3-Peptid und Nonsaccharid-V3-Peptid) wurde jeweils eine MD-Simulation über einen Zeitraum von 2 ns durchgeführt.

In Abbildung 34 sind die berechneten Strukturen des unglycosylierten Peptids **P3** zu Beginn und nach Ende der MD-Simulation als *Crossed-eye*-Darstellung gezeigt. Nach Ende der Simulation war die Struktur deutlich schmaler und langgestreckter. Außerdem wies sie eine leichte Verdrillung auf. Die Distanz der  $\text{C}\alpha$ -Atome der beiden mittig im *loop* liegenden Aminosäuren N300 und I322 betrug zu Beginn der Simulation 17.0 Å und am Ende nur noch 7.6 Å. Im Laufe der Simulation bildeten sich vermehrt interresiduale Wasserstoffbrücken aus, wie z.B. zwischen den beiden sich gegenüber liegenden Aminosäuren R298 und I325.



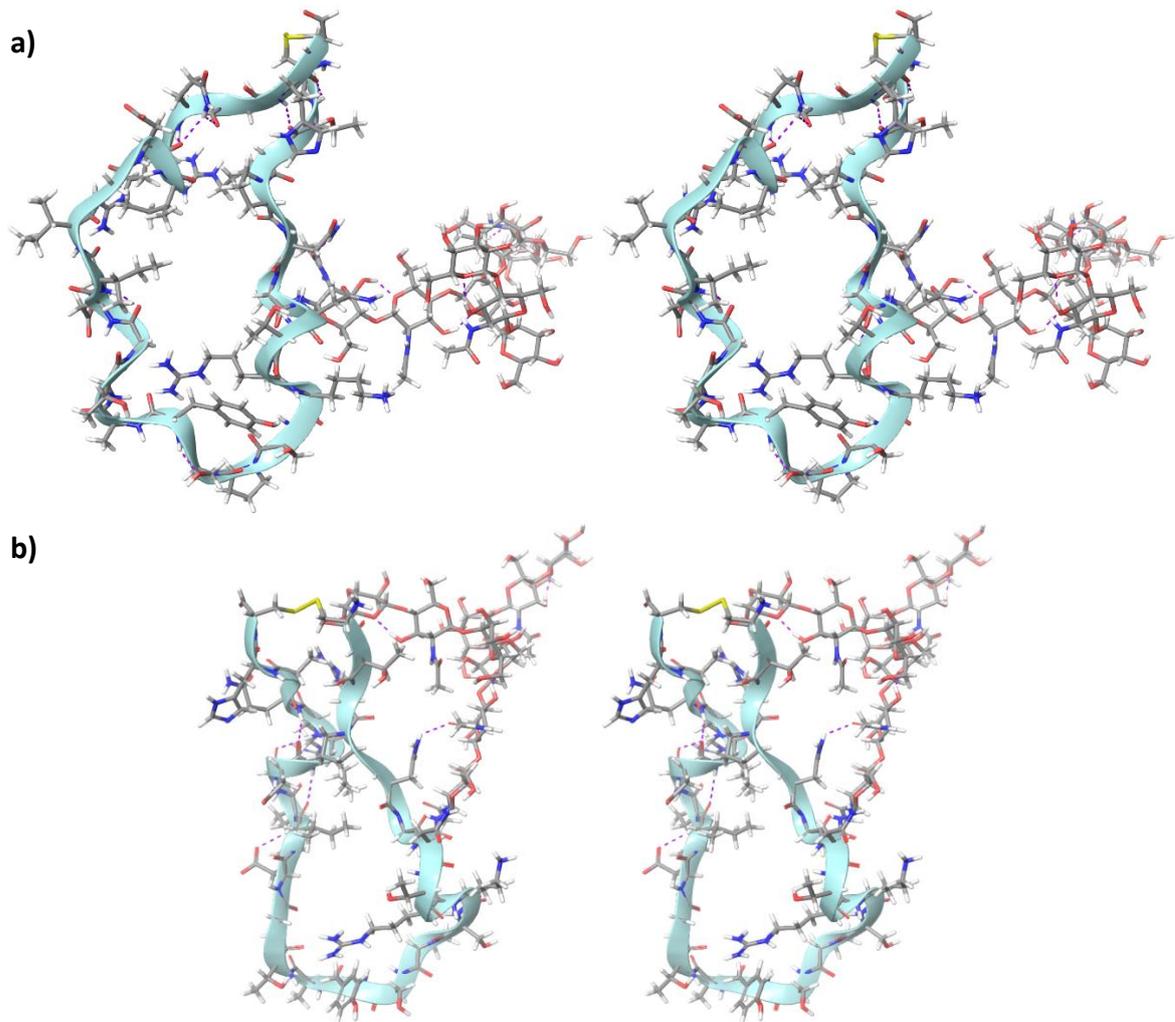
**Abbildung 34:** *In-silico*-Struktur von **P3** **a)** zu Beginn und **b)** nach Ende einer 2 ns dauernden MD-Simulation in der *Crossed-eye*-Darstellung. Das Peptid ist als Stäbchenmodell und Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt violett dargestellt. Die Endstruktur ist deutlich schmaler und verdrillter als die Startstruktur.

Die Struktur des Chitobiosyl-V3-Peptids **P4** (Abbildung 35) verhielt sich während der Simulation ähnlich wie die von **P3**. Die Startstruktur hat sich während der Simulation leicht verdrillt. Die Weite hat sich jedoch nur wenig verändert, der *loop* nimmt während der Simulation nur eine minimal schmalere Konformation ein. Der Abstand der  $C\alpha$ -Atome der Aminosäuren N300 und I322 lag zu Beginn bei 13.8 Å und ist am Ende der Simulation mit 12.2 Å eventuell noch im Rahmen der Standardabweichung. Die Chitobiose zeigte fast über die gesamte Dauer nicht zum Peptid. Lediglich die *N*-Acetylgruppe des ersten *N*-Acetylglucosamins (GlcNAc) bildete zwischenzeitlich eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe des Rückgrats von N301 aus. Eine weitere Wasserstoffbrücke bildete sich im Laufe der Simulation zwischen R304 und S02 aus, die sich in der Spitze des *loops* gegenüber liegen. Dieser Kontakt trägt demnach vermutlich zur minimal schmaleren Struktur des Peptids zum Ende der Simulation bei (Abbildung 35b).



**Abbildung 35:** *In-silico*-Struktur von **P4** **a)** zu Beginn und **b)** nach Ende einer 2 ns dauernden MD-Simulation in der *Crossed-eye*-Darstellung. Das Peptid ist als Stäbchenmodell und Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt violett dargestellt. Die Struktur am Ende der Simulation ist leicht schmaler und verdrehter als die Startstruktur. Die Chitobiose zeigt während der Simulation vom Peptid weg.

Auch das Nonasaccharid-V3-Peptid entwickelte sich von einer anfangs weiten, offenen Struktur zu einer schmaleren Struktur am Ende der MD-Simulation (Abbildung 36). Der Abstand der  $\text{Ca}$ -Atome der Aminosäuren N300 und I322 betrug zu Beginn 15.4 Å und verringerte sich auf 10.3 Å. Der Verdrillungsgrad ist hingegen geringer als bei den anderen beiden Peptidstrukturen. Vermutlich behindert das sterisch anspruchsvolle Glycan eine stärkere Verdrillung. Das Saccharid bewegt sich im Laufe der Simulation in Richtung Peptid und interagiert mit den Aminosäuren. In der Endstruktur liegt z.B. eine Wasserstoffbrücke zwischen der *N*-Acetylgruppe des zweiten GlcNAcs und der Seitenkette von N300 vor.



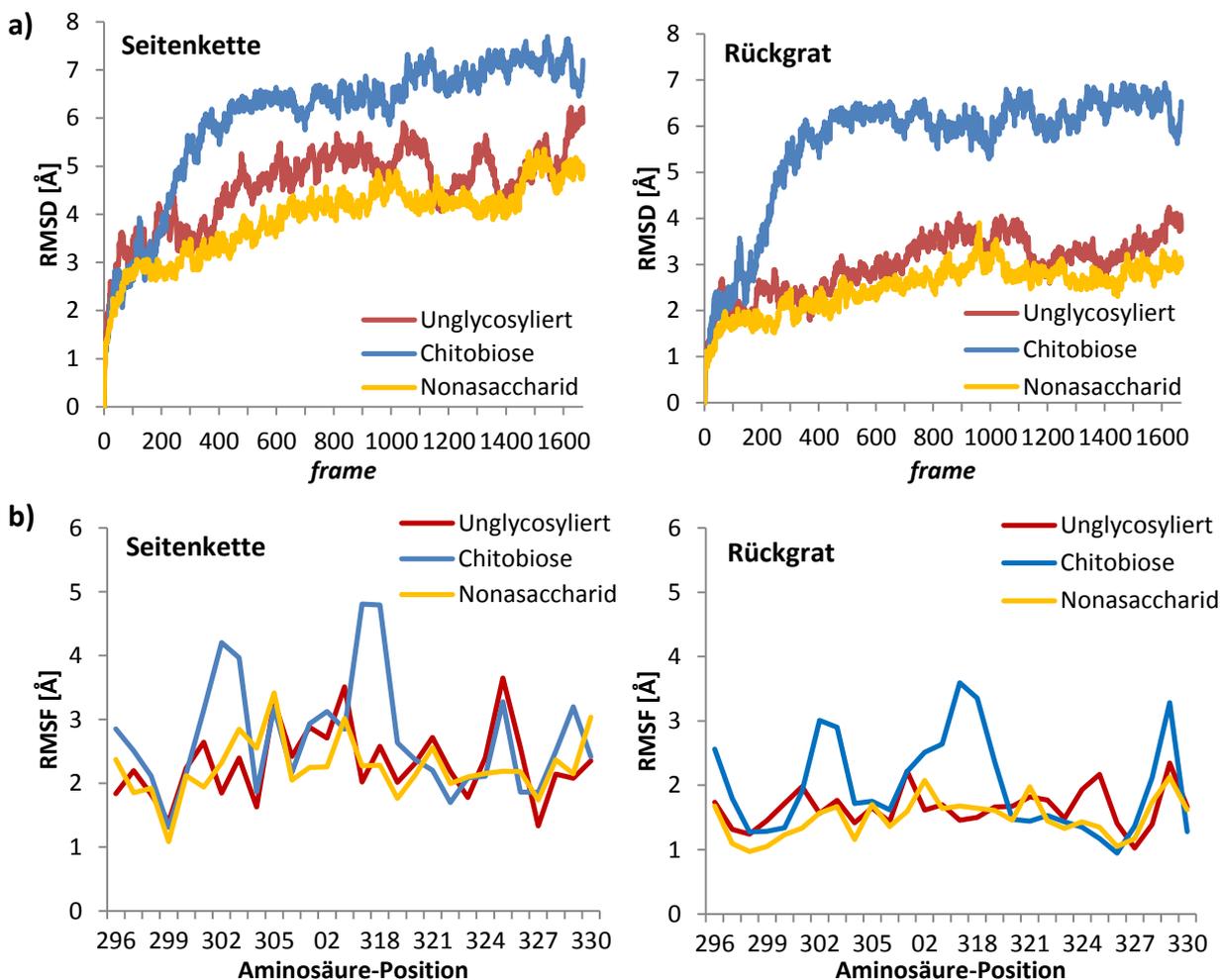
**Abbildung 36:** *In-silico*-Struktur des Nonasaccharid-V3-Peptids **a)** zu Beginn und **b)** nach Ende einer 2 ns dauernden MD-Simulation in der *Crossed-eye*-Darstellung. Das Peptid ist als Stäbchenmodell und Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt violett dargestellt.

Die endständige Galactose der 1,6-verknüpften Antenne zeigt während der Simulation Wechselwirkungen mit verschiedenen Aminosäuren. Die 1,3-verknüpfte Antenne des Glycans zeigt durchgehend in eine andere Richtung als das Peptid.

Die mittlere quadratische Abweichung (*root-mean-square deviation*, RMSD) ist ein Maß dafür, wie sehr die Position bestimmter Atome zu einem bestimmten Zeitpunkt der Simulation von einer gegebenen Struktur abweichen. Die RMSD-Werte aller drei V3-Peptide wurden in Bezug auf die jeweilige Startstruktur (*frame 0*) gegen den Verlauf der MD-Simulation aufgetragen (Abbildung 37a). Eine Stabilisierung des RMSD deutet auf das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes hin, welcher für das Rückgrat aller drei Peptide erreicht wird. Der RMSD der Seitenketten des unglycosylierten V3-Peptids schwankt stärker als bei den beiden Glycopeptiden. Möglicherweise hängt das mit der fehlenden Glycosylierung zusammen, die eventuell eine stabilisierende Wirkung auf die Struktur

ausübt. Die stärkste Veränderung im Vergleich zur Startstruktur weist das Chitobiosylpeptid mit etwa 6 Å auf. Vermutlich liegt das an der starken Verdrillung, die das Peptid erfährt (s. Abbildung 35).

Die Fluktuation des RMSD (*root-mean-square fluctuation*, RMSF) der einzelnen Aminosäuren (Abbildung 37b) gibt Auskunft über besonders variable Bereiche der Peptide. Die beweglichen Seitenketten zeigen erwartungsgemäß eine etwas höhere Fluktuation als das Peptidrückgrat. Das unglycosylierte und das Nonasaccharid-Peptid weisen sowohl für die Seitenketten als auch für das Rückgrat einen ähnlichen Verlauf auf. Das Chitobiosylpeptid fällt hingegen mit stärkeren Fluktuationen der Aminosäuren N302 und T303 bzw. A317 und T318 auf. Diese vier Aminosäuren wechseln im Verlauf der Simulation sehr häufig zwischen ihren Interaktionspartnern hin und her.



**Abbildung 37:** Auftragung der RMSD- und RMSF-Werte der Seitenketten sowie der Rückgrate der drei verschiedenen V3-Peptide (unglycosyliert, mit Chitobiose bzw. Nonasaccharid). **a)** Zeitlicher Verlauf des RMSD über die Dauer der MD-Simulationen. Die Stabilisierung des RMSD spricht für das Erreichen eines Gleichgewichtszustands. Das Chitobiosylpeptid verändert seine Konformation im Laufe der Simulation stärker als die anderen beiden Peptide **b)** Auftragung der Fluktuation des RMSD (RMSF) gegen die einzelnen Aminosäuren; das statt der PND eingefügte PS-Motiv ist mit 01 und 02 nummeriert. Das Chitobiosylpeptid weist variable Bereiche auf als die beiden anderen Peptide.

Um die MD-Simulationen noch genauer auszuwerten, wurden 18 zufällig gewählte Abstände im unglycosylierten Peptid und 21 in den beiden glycosylierten Peptiden von gegenüber liegenden Aminosäuren und/oder Kohlenhydraten ausgewählt. Bei den Abständen handelte es sich um Schweratom-Abstände - vornehmlich zwischen den jeweiligen C $\alpha$ -Atomen - deren Verlauf gegen die Zeit der Simulation aufgetragen wurde. Aminosäuren und Kohlenhydrate deren Schweratom-Abstände unter 10 Å lagen wurden auf sämtliche Protonenabstände untersucht. Bei mehreren Protonen pro Schweratom (z.B. geminale H $\beta$ ) wurde zunächst nur jeweils eines der Protonen auf mögliche Kontakte zu anderen Protonen analysiert. Da im NOESY-Spektrum Abstände bis ca. 5 Å detektiert werden können, wurden alle Protonenabstände ausgewählt, die bei maximal 5 Å lagen und somit möglicherweise experimentell bestätigt werden können. Protonen mit uneindeutigen oder stark schwankenden Abständen wurden genauer untersucht, indem die Abstände aller Protonen einer Aminosäure mit sämtlichen Protonen der anderen ausgewertet wurden. Abbildung 38 zeigt beispielhaft einige der Protonenabstände über den zeitlichen Verlauf der Simulation, welche die meiste Zeit kleiner oder gleich 5 Å waren. Der Kontakt zwischen T303 und G319 des Nonasaccharid-Peptids bestand allerdings nur die ersten 1.5 ns. Ansonsten hielten sich die verschiedenen Kontakte recht stabil über die Dauer der Simulation.

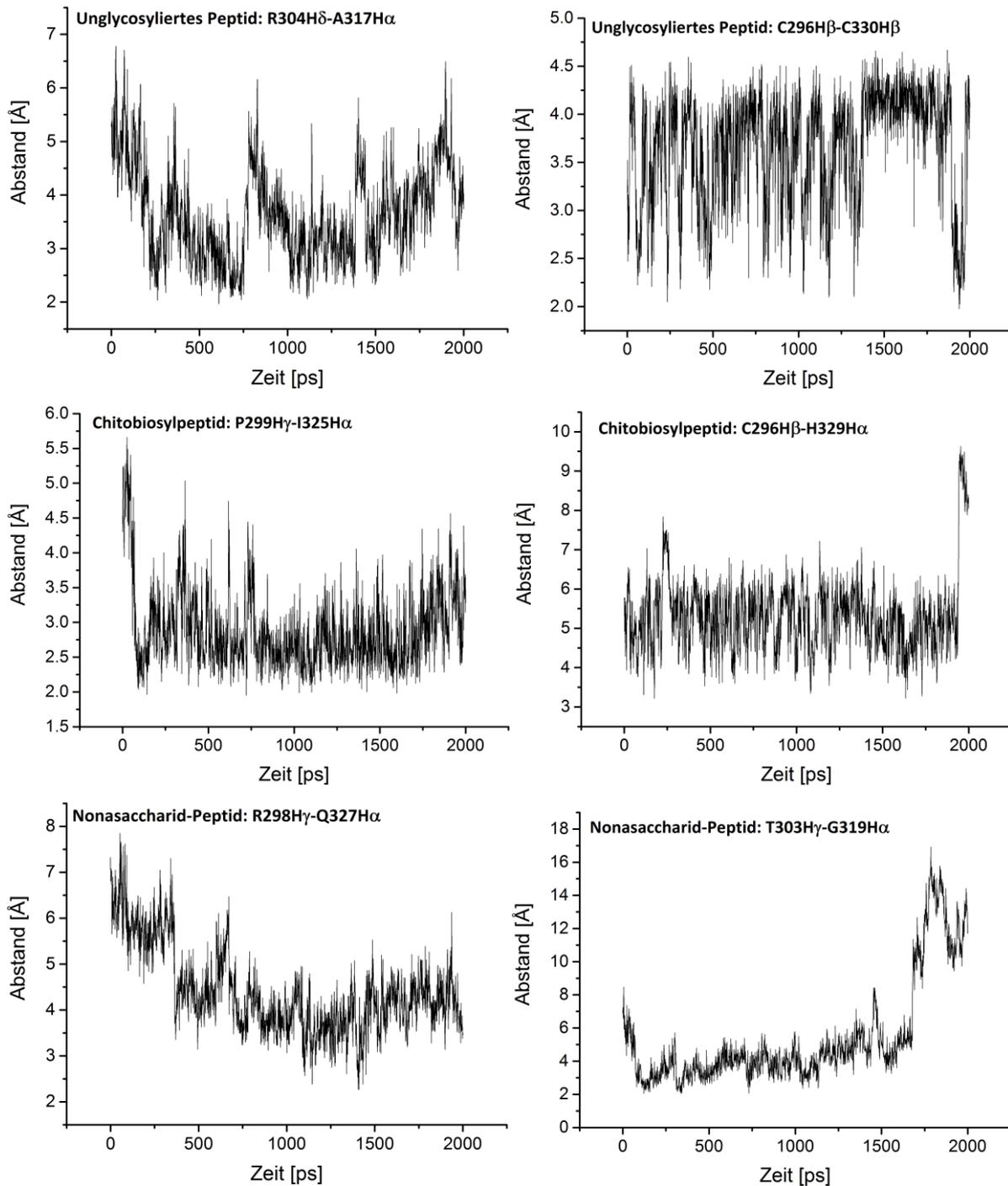
Aus der Vielzahl der betrachteten Abstände ergaben sich am Ende nur wenige, die maximal 5 Å groß waren. Alle der auf diese Weise gefundenen Kontakte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3:** Aminosäuren der drei verschiedenen V3-Peptide mit Protonenabständen der MD-Simulation, die kleiner als 5 Å sind. Grau hinterlegt sind gleiche Aminosäure-Kontakte.

Unglycosyliertes V3-Peptid <b>P3</b>	Chitobiosyl-V3-Peptid <b>P4</b>	Nonasaccharid-V3-Peptid
C296 – C330	C296 – C330	C296 – C330
R298 – Q327	R298 – Q327	R298 – Q327
P299 – I325	P299 – I325	P299 – I325
C296 – H329	C296 – H329	-
-	-	T303 – G321
R304 – A317	-	-

Die gefundenen Kontakte liegen vor allem im *Stem*-Bereich und in der Spitze des *loops*. Der Kontakt zwischen P299 und I325 konnte für das Peptid **P3** mittels NOESY-NMR bestätigt werden. Für das Glycopeptid **P4** wurde im NOESY-Spektrum jedoch kein entsprechendes Kreuzsignal gefunden. Der Kontakt der disulfidverbrückten Cysteine C296 und C330 konnte sowohl für **P3** als auch für **P4** durch NOESY-NMR bestätigt werden. Für die anderen *in silico* gefundenen Kontakte konnten keine entsprechenden Kreuzsignale im NMR bestätigt

werden. Ein Grund hierfür könnte eine teilweise Überlagerung der entsprechenden Bereiche der Peptidspektren bzw. eine verminderte Intensitäten im Bereich der  $\alpha$ -Protonen durch die Wasserunterdrückung sein. Alternativ könnte das fehlende Kreuzsignal ein Indiz sein, dass die berechneten Strukturen noch nicht vollständig den wahren Peptidkonformationen entsprechen bzw. nur eine der möglichen Konformationen darstellen. Vom *V3-Loop* ist bekannt, dass er verschiedene Konformationen einnehmen kann (s. Abschnitt 3.5.2).



**Abbildung 38:** Zeitliche Verläufe von ausgewählten Protonenabständen des unglycosylierten, des Chitobiosyl- und des Nonasaccharid-Peptids über jeweils 2 ns dauernde MD-Simulationen. Gezeigt sind Kontakte mit maximal 5 Å Abstand.

Außerdem fällt auf, dass die glycosylierten Peptide weniger Kontakte aufweisen als das unglycosylierte Peptid. Daraus lässt sich schließen, dass die Kohlenhydrate einen Einfluss auf die peptidische Struktur ausüben.

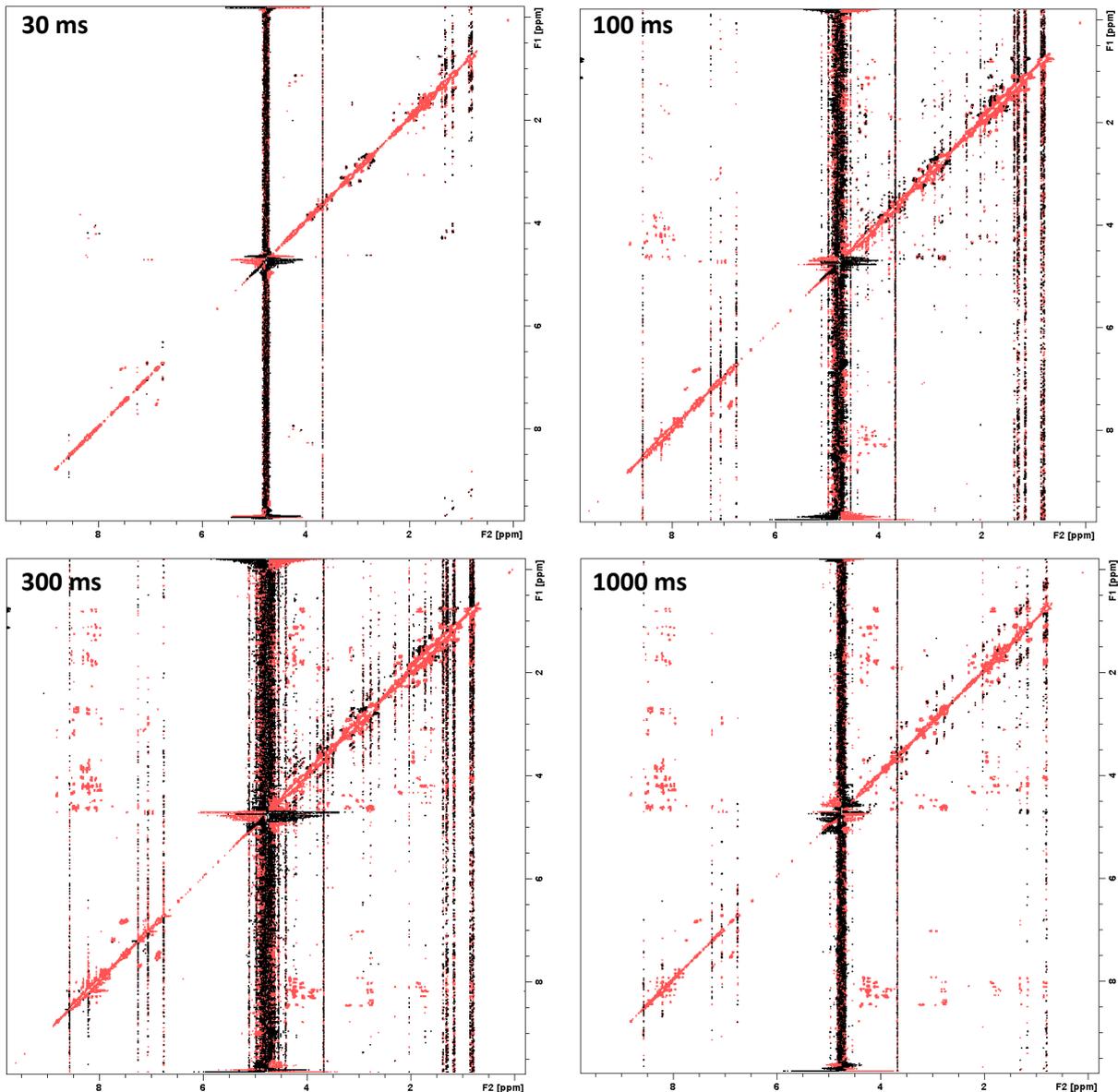
### 6.3.2 Konformationsanalysen der Peptide P3 und P4 mittels NMR

Zur Bestimmung experimenteller 3D-Strukturen der beiden zyklischen Peptide **P3** und **P4** wurden Konformationsanalysen mit Hilfe von NMR durchgeführt (s. Abschnitt 4.4). Hierfür wurden TOCSY- und NOESY-Spektren aufgenommen, aus denen sich interresiduale Abstände sowie  $^3J$ -Kopplungskonstanten bestimmen ließen. Anhand der Abstands- und Winkelbeschränkungen konnten mit dem Programm CYANA schließlich Strukturen der Peptide bestimmt werden. Anhand der so ermittelten 3D-Strukturen sollte der Einfluss der Trunkierung auf die Konformation der zyklischen V3-Peptide untersucht werden.

#### 6.3.2.1 Konformationsanalyse des zyklischen Peptids P3

Zur Bestimmung der Protonenabstände des zyklischen Peptids **P3** wurden zunächst 2D-NOESY-Spektren mit Mischzeiten von 30, 50, 100, 200, 300, 600 und 1000 ms an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen. In Abbildung 39 sind NOESY-Spektren unterschiedlicher Mischzeiten gezeigt, aus denen der Aufbau des NOEs erkennbar wird. Die höchsten Intensitäten wies das Spektrum mit der Mischzeit 300 ms auf. Entsprechend wurde dieses Spektrum genutzt, um die Integralgrenzen für die NOE-Kreuzsignale zu setzen, die anschließend auf alle anderen Spektren übertragen wurden. Die Integrale wurden zweifach normiert. Zum einen wurden die Integrale in Bezug auf die Eigenrelaxation korrigiert, wofür zunächst das isolierte Signal eines Diagonalpeaks bei sehr geringer Mischzeit (30 ms) integriert wurde. Dieses Integral wurde als Eigenrelaxation definiert und diente als Normierungsfaktor, der auf alle anderen Integralwerte angewandt wurde. Zum anderen wurden die Integrale auf 100% normiert. Dazu wurde jeweils der prozentuale Anteil eines Kreuzsignals von der Summe aller Kreuz- und Diagonalpeaks eines Protons berechnet. Die erhaltenen NOE-Prozente wurden gegen die Mischzeiten aufgetragen, um NOE-Aufbaukurven zu erhalten. Zur Bestimmung der Parameter  $P_0$  und  $P_1$  wurden die Kurven an die doppelt-exponentielle Gleichung (7) (s. Abschnitt 4.4) angepasst. Dabei zeigte sich in allen Aufbaukurven, dass der NOE bei einer Mischzeit von 600 ms zu gering ausfiel. Sie wurden folglich nicht berücksichtigt. Die Ursache war vermutlich ein inhomogenes Magnetfeld bei der Aufnahme des 600-ms-Spektrums, wodurch die Signale breiter waren und somit nicht vollständig durch die gesetzten Integralbereiche erfasst wurden.

Aus dem Produkt von  $P_0$  und  $P_1$  wurde schließlich die Anfangssteigung zum Zeitpunkt 0 ms erhalten, die der Kreuzrelaxationsrate entspricht.



**Abbildung 39:** 2D-NOESY-Spektren mit Mischzeiten von 30, 100, 300 und 1000 ms. Die NOE-Intensitäten nehmen erst zu und sinken dann wieder ab, wobei das NOESY-Spektrum mit 300 ms Mischzeit die höchsten Intensitäten aufwies.

Um Protonenabstände nach Gleichung (8) berechnen zu können, ist es zunächst nötig die Kreuzrelaxationsrate eines bekannten Referenzabstands zu bestimmen. Dafür wurden sechs Kreuzsignale von geminalen bzw. aromatischen Protonenpaaren ausgewählt: Die C-terminalen Amid-Protonen, die  $\beta$ -Protonen von C330, H329 und Y316 sowie die aromatischen Protonen von Y316. Aus den Aufbaukurven wurden die Kreuzrelaxationsraten berechnet. Die entsprechenden Referenzabstände wurden mit Hilfe des Programms Maestro (2015-4) aus einer Röntgenstruktur von gp120 (2B4C)<sup>51</sup> zu 1.75 Å für die amidischen

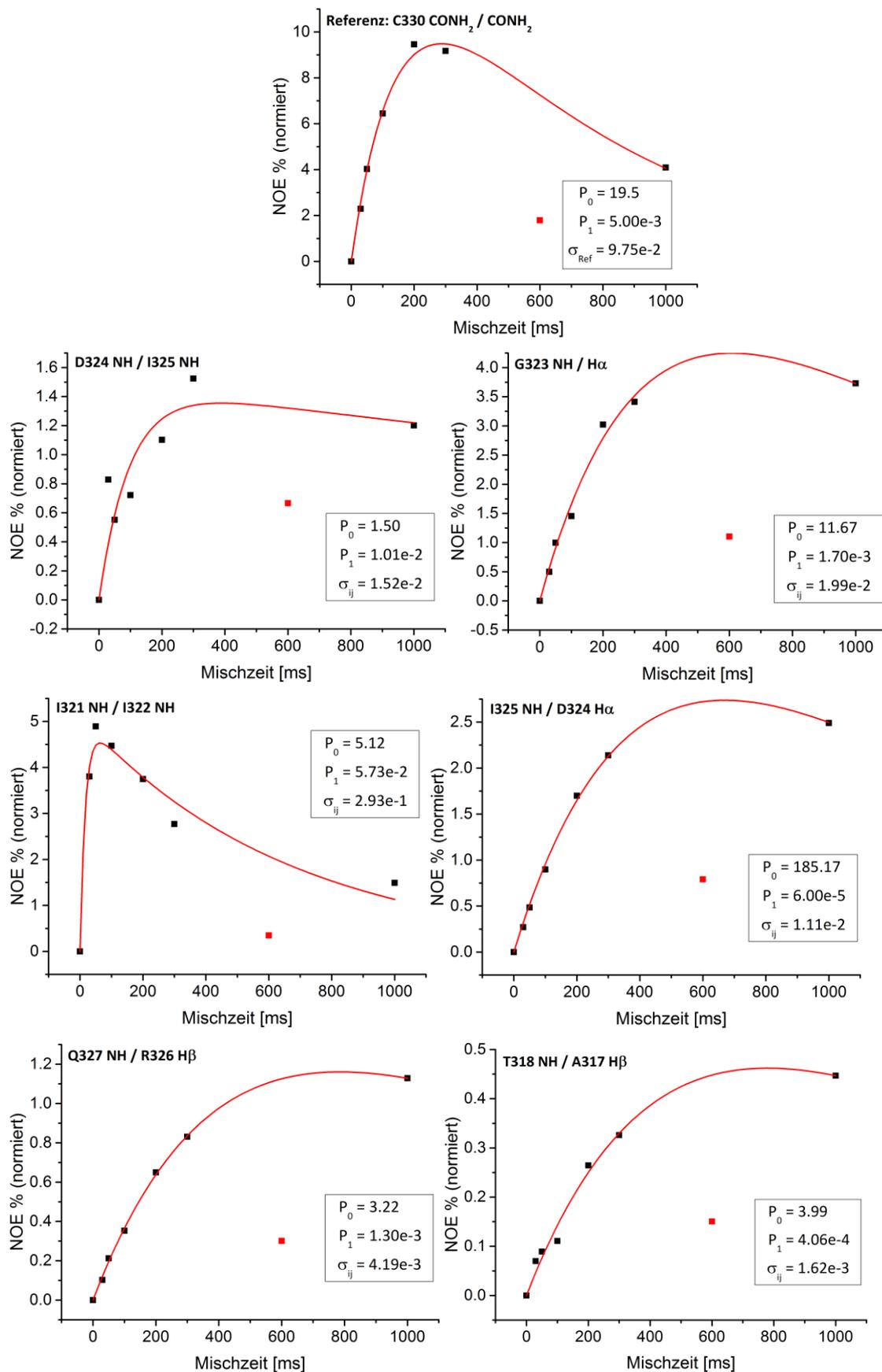
Protonen, 1.70 Å für die geminalen  $\beta$ -Protonen und 2.45 Å für die vicinalen aromatischen Protonen bestimmt.

Ausgehend von einem Referenzabstand wurden jeweils die Abstände der anderen Referenzprotonenpaare berechnet. Dies wurde für alle Referenzabstände wiederholt und erlaubt eine Abschätzung, wie verlässlich die berechneten Abstände sind. Die Verwendung der  $\beta$ -Protonen von Y316 und H329 als Referenzabstand ergaben deutlich zu große Abstandswerte und wurden nicht weiter verwendet. Das  $\beta/\beta'$ -Paar von C330 als Referenzabstand gab leicht zu niedrige und die aromatischen Referenzprotonen leicht erhöhte Abstandswerte, während C330 CONH<sub>2</sub> und C330 H $\beta'/\text{H}\beta$  etwa gleich gut passten. Letztendlich wurden die Amidprotonen von C330 als Referenz ausgewählt und zur Berechnung der unbekannt Abstände verwendet (Abbildung 40). Mit Hilfe der drei anderen brauchbaren Referenzwerte (C330  $\beta/\beta'$ , C330  $\beta'/\beta$ , Y316 H $\delta/\text{H}\epsilon$ ) wurden ebenfalls sämtliche unbekannt Abstände berechnet, die dann zur Fehlerberechnung dienten. Der Fehler lag bei allen berechneten Abständen bei ca. 7%.

Insgesamt wurden 66 Kreuzsignale aus den NOESY-Spektren ausgewertet (Abbildung 40 und s. Anhang 10.1). Die Datenpunkte des Spektrums mit einer Mischzeit von 600 ms wurden nicht berücksichtigt.

Hauptsächlich wurden intraresiduale und sequenzielle Kontakte des Rückgrats sowie einige Kontakte des Rückgrats zu Seitenketten-Protonen gefunden, wohingegen kaum *Long-range*-Kontakte der Seitenketten auszumachen waren. Die Identifizierung letzterer wurde aufgrund starker Überlagerungen erschwert. Für einige Kontakte konnten keine sinnvollen Aufbaukurven erhalten werden. Da aber beobachtbare NOE-Kontakte vorhanden waren, wurde für deren Abstände ein Bereich, von 1.8 bis 5.0 Å angenommen. Nur in diesem Bereich sind NOE-Kontakte möglich.

Zur Berechnung der  $\phi$ -Winkel nach der Karplus-Gleichung (4) mussten die <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten der NH-H $\alpha$ -Kopplung bestimmt werden. Aufgrund von Signalüberlagerungen war es nicht möglich diese aus dem eindimensionalen <sup>1</sup>H-Spektrum zu erhalten, weswegen sie aus dem TOCSY-Spektrum von **P3** ermittelt wurden. Aus den Kopplungskonstanten wurden bis zu vier mögliche  $\phi$ -Winkel nach Gleichung (4) berechnet (Tabelle 4). Strukturbedingt war es nicht möglich  $\phi$ -Winkel für die Proline P299 und P02 sowie das N-terminale C296 zu bestimmen.



**Abbildung 40:** Referenz-NOE-Aufbaukurve und exemplarische NOE-Aufbaukurven verschiedener Protonenpaare des unglycosylierten Peptids **P3**. Auftragung der NOE-Prozente gegen die Mischzeit mit doppelt-exponentieller Anpassung. Mittels der Parameter  $P_0$  und  $P_1$  wurden die Kreuzrelaxationsraten  $\sigma_{ij}$  berechnet. Die rot markierten Datenpunkte wurden bei der Anpassung nicht berücksichtigt.

Positive Werte für die  $\phi$ -Winkel sind nach Ramachandran nicht erlaubt, sodass sich für alle  $\phi$ -Winkel jeweils zwei Werte ergeben, die in den Bereichen von  $-169^\circ$  bis  $-132^\circ$  und  $-108^\circ$  bis  $-71^\circ$  liegen (Tabelle 4).

**Tabelle 4:**  $^3J$ -Kopplungskonstanten und  $\phi$ -Winkel des unglycosylierten Peptids **P3**. Die Kopplungskonstanten wurden mit Hilfe eines TOCSY-Spektrums bestimmt und die Winkel wurden nach Gleichung (4) berechnet. Grau markiert sind die Winkel, die laut Ramachandran-Plot erlaubt sind.

Aminosäure	$^3J$ (Hz)	$\phi1$	$\phi2$	$\phi3$	$\phi4$
T297	7.8	-	-	-149	-91
R298	6.6	73	47	-159	-81
N300	7.5	-	-	-151	-89
N301	6.9	-	-	-156	-84
N302	6.7	70	50	-158	-82
T303	8.2	-	-	-145	-95
R304	8.5	-	-	-142	-98
K305	8.3	-	-	-144	-96
S306	6.3	78	42	-161	-79
S02	6.7	70	50	-158	-82
Y316	7.2	-	-	-154	-86
A317	5.8	85	35	-165	-75
T318	6.9	60	60	-156	-84
G319	5.6	88	32	-166	-74
D320	6.8	67	53	-157	-83
I321	9.2	-	-	-132	-108
I322	8.2	-	-	-145	-95
G323	5.3	91	29	-169	-71
D324	6.8	67	53	-157	-83
I325	8.7	-	-	-139	-101
R326	8.5	-	-	-142	-98
Q327	7.9	-	-	-148	-92
A328	8.1	-	-	-146	-94
H329	7.6	-	-	-150	-90
C330	7.6	-	-	-150	-90

Aus den experimentell ermittelten Protonenabständen und  $\phi$ -Winkeln wurden mit Hilfe des Programms CYANA Strukturen des Peptids erstellt. Dafür mussten obere und untere Limits der Distanzen und Winkel als *constraints* festgelegt werden. Für die *distance constraints* wurde jeweils der Bereich von  $\pm 15\%$  bezogen auf die ermittelten Abstände angegeben. Bei

Protonenpaaren, für die keine Aufbaukurven generiert werden konnten oder deren berechnete Abstände unter 1.8 Å lagen, wurde der Bereich von 1.8 bis 5.0 Å angegeben.

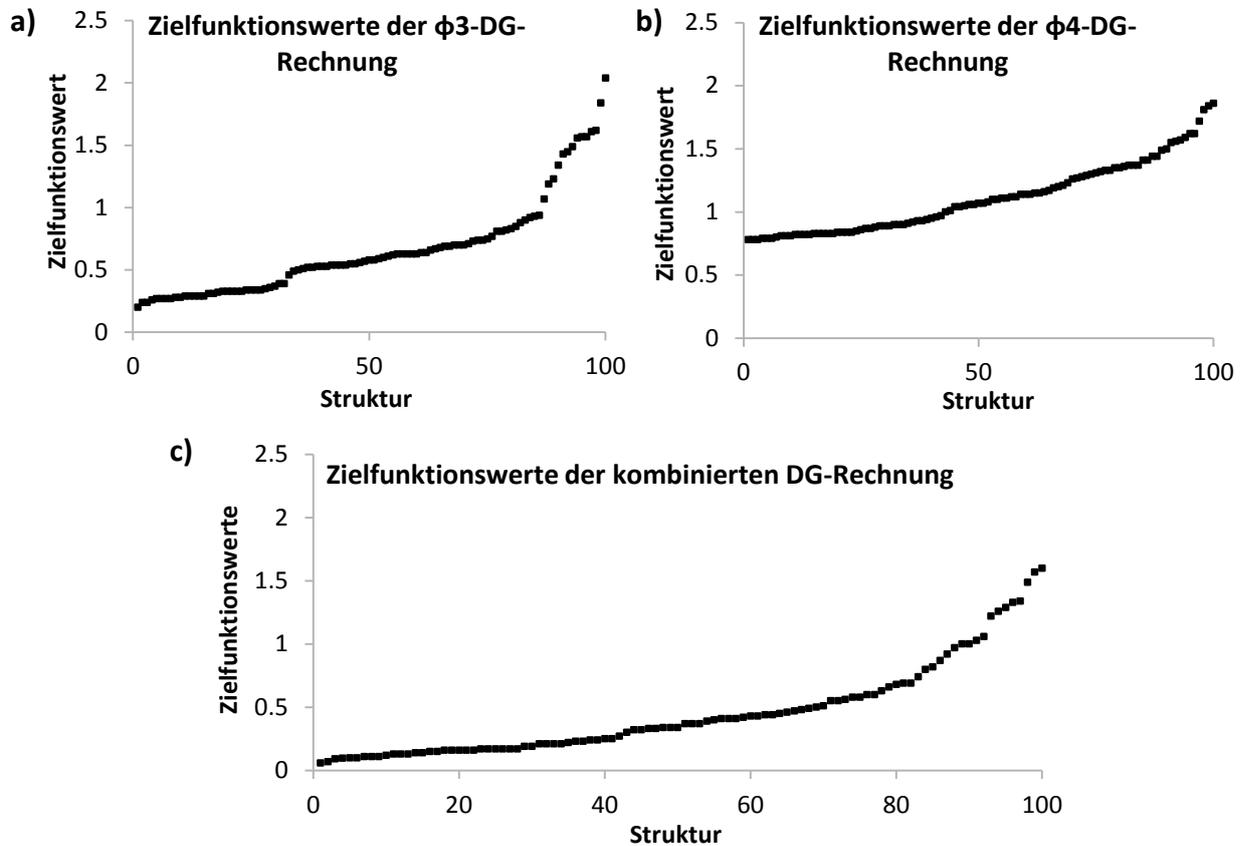
Eine Entscheidung für je einen der  $\phi$ -Werte konnte nicht getroffen werden, aber sämtliche Kombinationen der Winkel zu verwenden war bei  $2^{25}$  Möglichkeiten unmöglich. Daher wurden zwei *Distance-geometry*-Rechnungen (DG) zur Strukturgenerierung von **P3** durchgeführt, einmal mit den  $\phi_3$ -Winkeln und einmal mit den  $\phi_4$ -Winkeln. Als *dihedral angle constraints* dienten jeweils die Bereiche von  $\pm 15^\circ$  der ermittelten Winkel. Für die beiden Proline konnten keine  $\phi$ -Winkel angegeben werden, da CYANA die Diederwinkel über die Wasserstoffe definiert, statt über die Schweratome. Da Prolin kein amidisches Proton aufweist, wurden stattdessen die  $\Psi$ -Winkel angegeben. Dafür wurde jeweils der Bereich von  $-70^\circ$  bis  $180^\circ$  verwendet, der sich aus dem Ramachandran-*Plot* für Proline ergibt.<sup>185</sup> Bei nicht eindeutig zuzuordnenden geminalen Methyl- und Methylenprotonen wurden in den Abstandsbeschränkungen für das Programm CYANA Pseudoatome (Q) definiert.

Die *constraints* wurden mit CYANA eingelesen und zur Berechnung von jeweils 500 randomisierten Strukturen verwendet, die mit Hilfe von Zielfunktionswerten bewertet wurden. Je besser die Abstands- und Winkelbeschränkungen eingehalten wurden, desto kleiner ist der Zielfunktionswert der Struktur. Die Strukturen der  $\phi_3$ -Winkel weisen dabei kleinere Werte auf als die der  $\phi_4$ -Winkel und erfüllen dementsprechend besser die vorgegebenen *constraints* (Abbildung 41).

Da es unwahrscheinlich ist, dass tatsächlich alle Winkel der **P3**-Struktur den  $\phi_3$ -Werten entsprechen, wurden die  $\phi_3$ -Strukturen auf Verletzungen der Winkelbeschränkungen überprüft. Die Winkel von I322, T318 und R326 lagen nicht im vorgegebenen Bereich. Daraufhin wurde eine dritte DG-Rechnung durchgeführt, bei der diese drei verletzten Winkelbeschränkungen in die  $\phi_4$ -Winkel geändert wurden. Die erhaltenen Zielfunktionswerte dieser kombinierten Rechnung waren für die besten zehn Strukturen mit Werten unter 0.1 deutlich besser als in der reinen  $\phi_3$ -DG-Rechnung mit Werten bei 0.2 bis 0.3 (Abbildung 41).

Die aus der kombinierten DG-Rechnung erhaltene 3D-Struktur des zyklischen Peptids **P3** mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion weist eine langgestreckte, der Grundform der Röntgenstruktur des V3-*Loops* (2B4C)<sup>51</sup> ähnliche Form auf (Abbildung 42). Allerdings enthält die Struktur der Konformationsanalyse kein  $\beta$ -Faltblattmotiv wie die Röntgenstruktur. Die N-terminale Region von C296 bis R403 hat sowohl in der Röntgenstruktur als auch in der hier ermittelten V3-Konformation eine leicht helikale Substruktur, jedoch zeigen die Windungen jeweils in unterschiedliche Richtungen. Das zeigt sich auch daran, dass der RMSD der  $\alpha$ -

Atome, die jeweils in beiden *loops* vorhandenen Aminosäuren, den größten Wert von 6.9 Å für T303 aufweist. Der C-terminale Bereich des *loops* von I321 bis C330 zeigt einen ähnlichen Verlauf des Rückgrats.

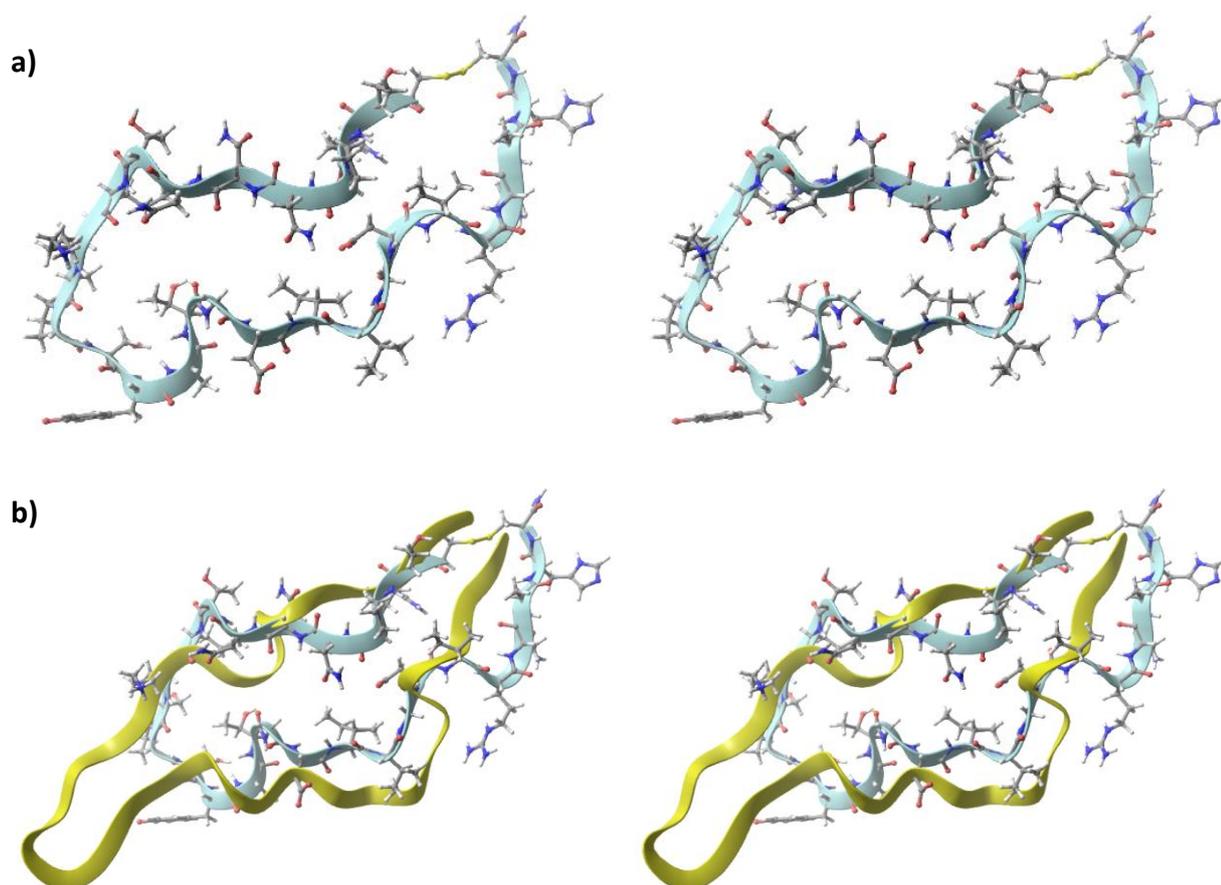


**Abbildung 41:** Auftragung der Zielfunktionswerte gegen die 100 Strukturen für P3, deren Winkel und Abstände die Beschränkungen am besten einhalten. Je niedriger der Wert, desto besser werden die *constraints* erfüllt. Die Strukturen mit den  $\phi_3$ -Winkeln (a) weisen niedrigere Werte auf als die der  $\phi_4$ -Winkel (b) und passen somit besser zu den vorgegebenen Beschränkungen. Die Strukturen der DG-Rechnung mit einer Kombination aus  $\phi_3$ - und  $\phi_4$ -Winkeln (c) liefern bessere Zielfunktionswerte als die reinen  $\phi_3$ - oder  $\phi_4$ -Strukturen.

Da es sich bei Strukturen, die mit Hilfe von NMR ermittelt wurden, immer um die gemittelten Konformationen der Verbindung in Lösung handelt, ist es möglich, dass Unterschiede zur Kristallstruktur vorhanden sind. Des Weiteren ist es sehr wahrscheinlich, dass die fehlende PND einen Einfluss auf die Konformation des V3-Loops hat. So fehlt z.B. das  $\beta$ -Turn-Motiv, das sonst von der PND ausgebildet wird, wodurch die Spitze des Peptids insgesamt etwas breiter ist als in der Röntgenstruktur. Außerdem weist der in der Röntgenstruktur verwendete V3-Loop eine etwas andere Aminosäuresequenz auf als die in dieser Arbeit verwendete Konsensussequenz.

Ausgehend von der so erhaltenen Struktur aus Abbildung 42 sollte eine *constrained* MD-Simulation durchgeführt werden, um eine energetisch günstigere Konformation bei gleichbleibenden Abstands- und Winkelbeschränkungen zu erhalten. Da es im Programm

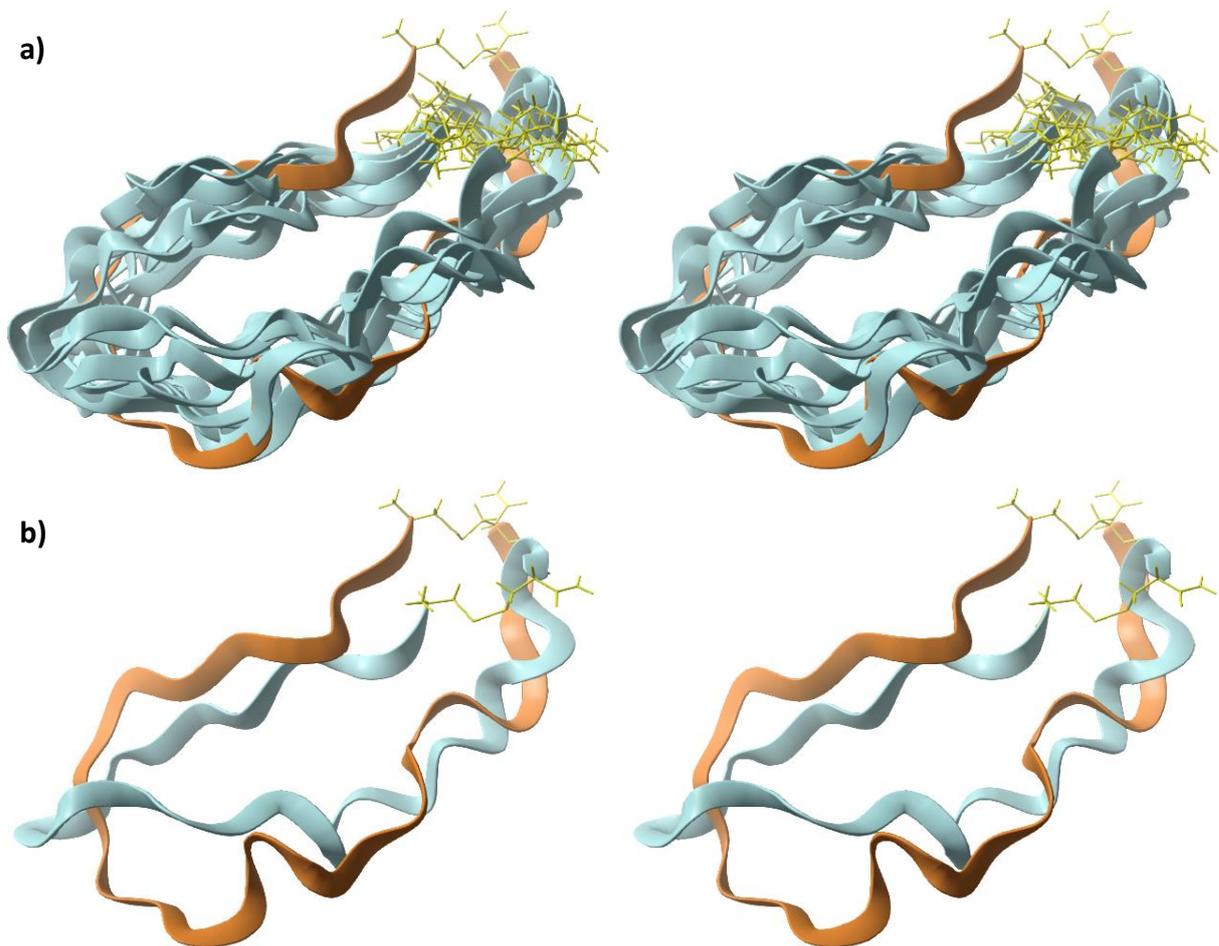
Maestro nicht möglich ist *constraints* für die MD-Simulation festzulegen, wurde zunächst mit dem Modul *MacroModel* eine *constrained* Energieminimierung durchgeführt. Dafür wurde das C-terminale Amid ergänzt, das in CYANA nicht implementiert ist und deshalb in der Struktur der DG-Rechnung fehlte. So war es möglich zusätzliche Abstandsbeschränkungen für das Amid festzulegen. Die Winkel und Abstände wurden je mit  $\pm 15\%$  erlaubter Abweichung als *constraints* gesetzt und das Strafpotenzial betrug  $100 \text{ kJ/mol}\cdot\text{rad}^2$  für die Diederwinkel bzw.  $100 \text{ kJ/mol}\cdot\text{\AA}^2$  für die Abstände. Die Energieminimierung wurde mit Wasser als Solvens durchgeführt und lieferte eine sehr ähnliche Struktur, die in Bezug auf die Startstruktur einen RMSD-Wert von  $2.5 \text{ \AA}$  der  $\text{C}\alpha$ -Atome aufwies. Die energieminierte Struktur besaß im Vergleich zur Startstruktur eine um  $1262.4 \text{ kJ/mol}$  niedrigere potenzielle Energie von  $-5741.6 \text{ kJ/mol}$ .



**Abbildung 42:** *Crossed-eye*-Darstellungen der 3D-Struktur des zyklischen Peptids **P3** mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion, erhalten aus der kombinierten DG-Rechnung. Die Struktur von **P3** ist sowohl **a)** alleine als auch als **b)** Überlagerung mit der Röntgenstruktur des V3-Loops (2B4C) dargestellt.<sup>51</sup> **P3** ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Eine gewisse Ähnlichkeit zur *Loop*-Form der Röntgenstruktur ist vorhanden.

Mit der minimierten Endstruktur wurde anschließend eine MD-Simulation über  $2 \text{ ns}$  in einer Wasserbox mit einer Salzkonzentration von  $0.15 \text{ M}$  durchgeführt. Zu Beginn einer MD-Simulation wird normalerweise eine Energieminimierung durchgeführt, bevor die eigentliche

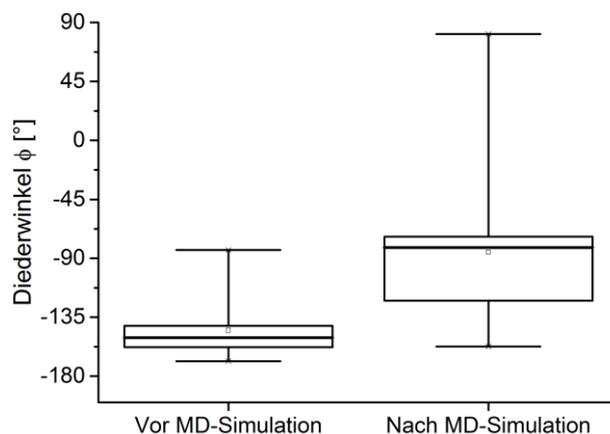
Simulation startet. Da bei der Simulation keine *constraints* gesetzt werden konnten, hat sich bei einem ersten Versuch gezeigt, dass schon bei 0 ns eine völlig andere Struktur vorlag als die vorgegebene Startstruktur. Folglich wurde auf diese vorgeschaltete Minimierung verzichtet, auch weil die Startstruktur bereits energieminiert vorlag. In Abbildung 43a sind die energieminierte Startstruktur (orange) sowie elf Strukturen der Simulation, die nach jeweils 200 ps erstellt wurden (türkis) übereinandergelegt. Die Grundstruktur des Peptidrückgrats verändert sich im Laufe der Simulation nicht grundlegend. Die RMSD-Werte der  $\text{C}\alpha$ -Atome in Bezug auf die Startstruktur liegen zwischen 3.8 und 5.6 Å. Im Vergleich der Start- zur Endstruktur der MD-Simulation zeigt sich, dass das Peptid nach 2 ns eine etwas engere Konformation einnimmt (Abbildung 43b).



**Abbildung 43:** Crossed-eye-Darstellungen von **a)** elf Strukturen, die nach jeweils 0.2 ns erstellt wurden bzw. **b)** der Start- und Endstruktur der 2 ns dauernden MD-Simulation von **P3**. Die Startstruktur (orange) stammt aus der vorangegangenen DG-Rechnung und wurde vor der Simulation mit denselben *constraints* energieminiert und mit den Strukturen der Simulation (türkis) übereinander gelegt.

Der Vergleich der Diederwinkel  $\phi$  der Start- mit der Endstruktur zeigt, dass sich im Laufe der Simulation sämtliche Winkelwerte von  $\phi_3$ - zu  $\phi_4$ -Winkeln bzw. von  $\phi_4$ - zu  $\phi_3$ -Winkeln geändert haben (Abbildung 44). Die *distance constraints* wurden größtenteils eingehalten,

jedoch lagen immerhin 30% der Abstände nach der Simulation nicht mehr im Fehlerbereich von  $\pm 15\%$ . Die potenzielle Energie des Systems hat sich von  $-5741.6$  kJ/mol der energieminierten Startstruktur zu  $-4694.0$  kJ/mol der Endstruktur der Simulation deutlich erhöht. Aufgrund dieser Tatsachen ist es unwahrscheinlich, dass die nach der MD-Simulation erhaltene Konformation tatsächlich noch der Struktur des unglycosylierten Peptids **P3** entspricht. Für den folgenden Vergleich (s. Abschnitt 6.3.3) der experimentell ermittelten Konformation mit der Strukturvorhersage der *In-silico*-Studie aus Abschnitt 6.3.1 wurde daher die Struktur der Energieminimierung verwendet.

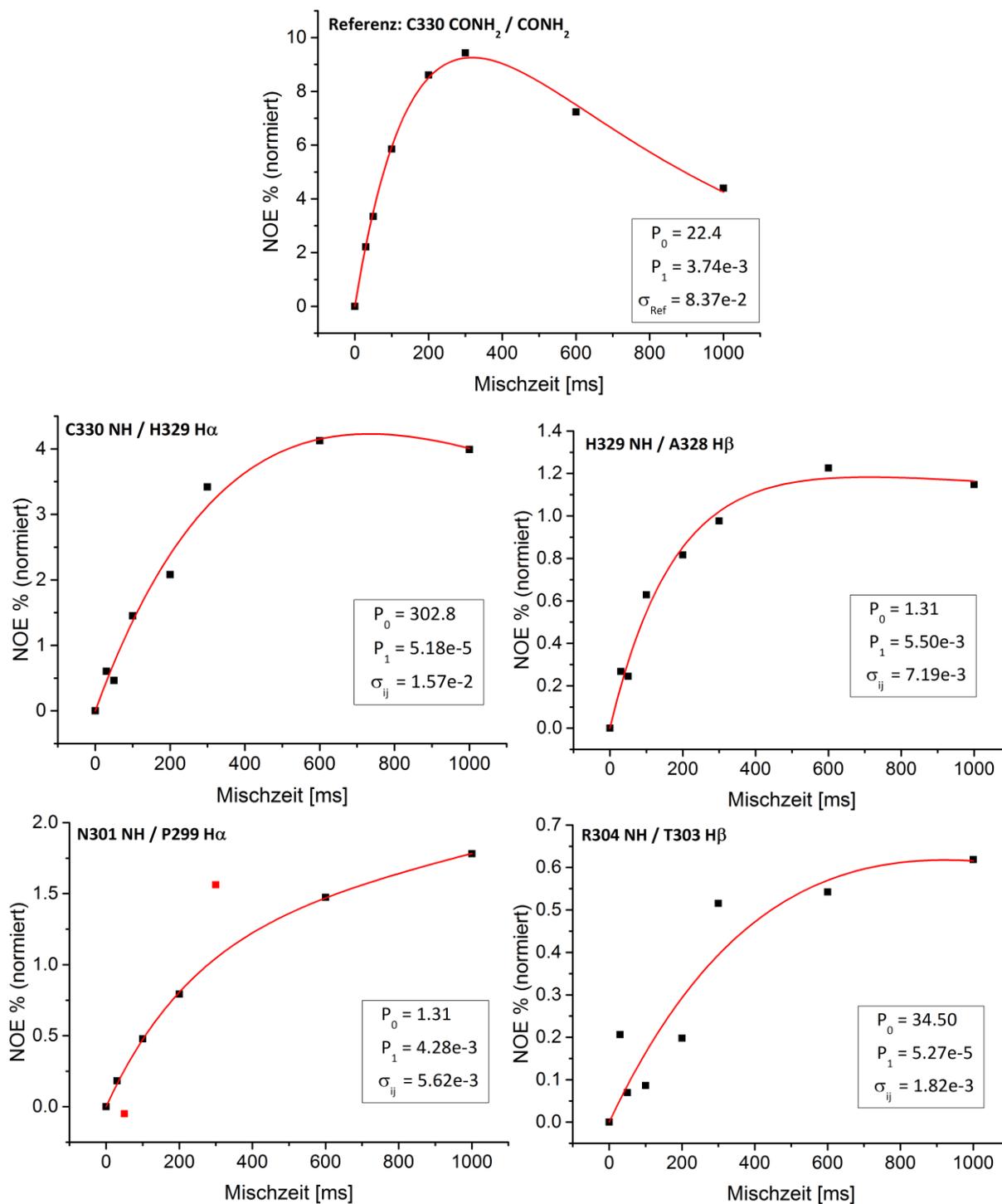


**Abbildung 44:** Vergleich der Diederwinkel  $\phi$  der **P3**-Struktur vor und nach der MD-Simulation. Die Winkel sind als *Boxplot* dargestellt. Deutlich erkennbar ist die vollständige Umkehr von hauptsächlich  $\phi_3$ -Winkeln im Bereich von  $-160^\circ$  bis  $-130^\circ$  vor der Simulation zu  $\phi_4$ -Winkeln im Bereich von  $-110^\circ$  bis  $-60^\circ$  nach der Simulation. Die obere und untere Linie geben Maximum und Minimum, die mittlere den Median und die Bereiche in der Box stellen das obere ( $>$ Median) und untere Quartil ( $<$ Median) dar.

### 6.3.2.2 Konformationsanalyse des zyklischen Glycopeptids **P4**

Zur Bestimmung der 3D-Struktur des zyklischen Glycopeptids **P4** wurde genauso verfahren, wie für das Peptid **P3**. Aus den Integralen der unterschiedlichen Mischzeiten wurden Aufbaukurven für die gleichen sechs Referenzprotonenpaare erstellt, wobei erneut die amidischen Protonen des C-Terminus am geeignetsten erschienen (Abbildung 45).

Es wurden Aufbaukurven von 79 Kreuzsignalen der NOESY-Spektren erstellt (Abbildung 45) und die entsprechenden Protonenabstände berechnet (s. Anhang 10.2). Wieder wurden hauptsächlich intraresiduale und sequenzielle Kontakte des Rückgrats gefunden, aber auch einige *Long-range*-Kontakte konnten identifiziert werden. So wechselwirken außer den  $\beta$ -Protonen der Cystine auch das  $\delta$ -Proton der Seitenkette von R298 und das H3 von der zweiten *N*-Acetylglucosamin-Einheit der Chitobiose miteinander. Außerdem wurden Kontakte zwischen dem N301 NH (Rückgrat) und P299 H $\alpha$  sowie T297 H $\beta$  und P299 H $\delta$  gefunden.



**Abbildung 45:** Referenz-Aufbaukurve und exemplarische NOE-Aufbaukurven unterschiedlicher Protonenpaare des glycosylierten Peptids **P4**. Auftragung der NOE-Prozente gegen die Mischzeit mit doppelt-exponentieller Anpassung. Mittels der Parameter  $P_0$  und  $P_1$  wurden die Kreuzrelaxationsraten  $\sigma_{ij}$  berechnet. Die rot markierten Datenpunkte wurden bei der Anpassung nicht berücksichtigt.

Mit Hilfe der  $^3J$ -Kopplungskonstanten der NH-H $\alpha$ -Kopplung wurden die  $\phi$ -Winkel nach Gleichung (4) berechnet und ergaben bis zu vier Lösungen, von denen nur die zwei negativen Werte  $\phi_3$  und  $\phi_4$  nach Ramachandran erlaubt sind (Tabelle 5). Für R304, G232 und I322 konnten keine Winkel berechnet werden, weil entweder aufgrund von Überlagerungen

keine Kopplungskonstante bestimmt werden konnte oder es bei zu hohen Kopplungskonstanten keine Lösung nach Gleichung (4) gab.

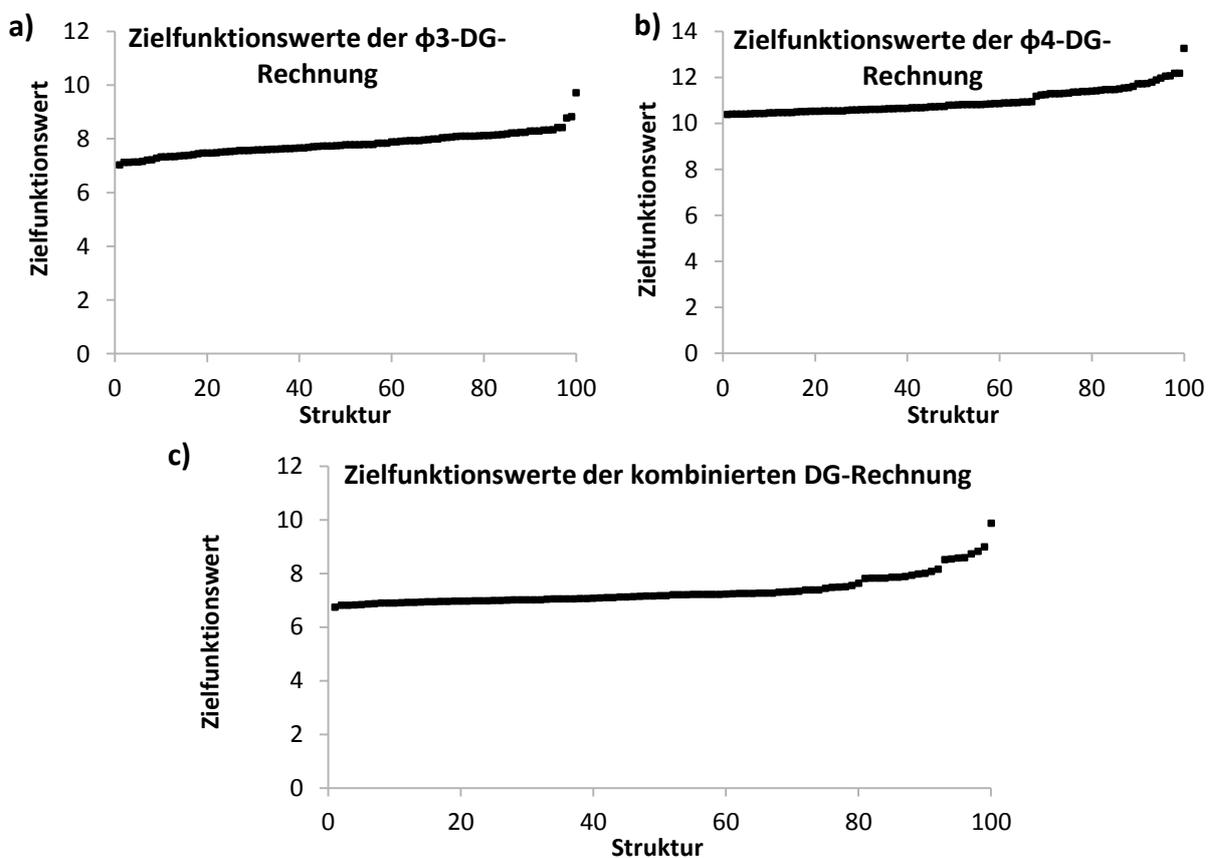
Für die *distance constraints* wurde erneut der Bereich von  $\pm 15\%$  der jeweils ermittelten Abstände angegeben. Bei Protonenpaaren, für die keine Aufbaukurven generiert werden konnten oder deren berechnete Abstände unter  $1.8 \text{ \AA}$  lagen, wurde der Bereich von  $1.8$  bis  $5.0 \text{ \AA}$  angegeben. Die Abstände zu den Chitobiose-Protonen konnten für die DG-Rechnungen nicht verwendet werden, da in CYANA keine Nomenklatur für Kohlenhydrate implementiert ist.

**Tabelle 5:**  $^3J$ -Kopplungskonstanten und  $\phi$ -Winkel des glycosylierten Peptids **P4**. Die Kopplungskonstanten wurden mit Hilfe eines TOCSY-Spektrums bestimmt und die Winkel wurden nach Gleichung (4) berechnet. Grau markiert sind die Winkel, die laut Ramachandran-Plot erlaubt sind.

Aminosäure	$^3J$ (Hz)	$\phi 1$	$\phi 2$	$\phi 3$	$\phi 4$
T <sub>297</sub>	7.6	-	-	-150	-90
R <sub>298</sub>	6.2	80	40	-162	-78
N <sub>300</sub>	6.1	81	39	-163	-77
N <sub>301</sub>	6.9	-	-	-156	-84
N <sub>302</sub>	6.5	75	45	-159	-81
T <sub>303</sub>	7.5	-	-	-151	-89
R <sub>304</sub>	9.8	-	-	-	-
K <sub>305</sub>	8.5	-	-	-142	-98
S <sub>306</sub>	6.5	75	45	-159	-81
S <sub>02</sub>	7.4	-	-	-152	-88
Y <sub>316</sub>	6.9	60	60	-156	-84
A <sub>317</sub>	5.4	90	30	-168	-72
T <sub>318</sub>	6.2	80	40	-162	-78
G <sub>319</sub>	6.5	75	45	-159	-81
D <sub>320</sub>	6.7	70	50	-158	-82
I <sub>321</sub>	9.0	-	-	-135	-105
I <sub>322</sub>	9.6	-	-	-	-
G <sub>323</sub>		Nicht bestimmbar wegen Überlagerung			
D <sub>324</sub>	6.1	81	39	-163	-77
I <sub>325</sub>	8.0	-	-	-147	-93
R <sub>326</sub>	9.0	-	-	-135	-105
Q <sub>327</sub>	8.4	-	-	-143	-97
A <sub>328</sub>	7.7	-	-	-150	-90
H <sub>329</sub>	6.6	73	47	-159	-81
C <sub>330</sub>	7.2	-	-	-154	-86

Als Winkelbeschränkung wurde jeweils der Bereich von  $\pm 15^\circ$  der ermittelten  $\phi_3$ - und  $\phi_4$ -Winkel angegeben. Für die Proline wurden stattdessen wieder die  $\psi$ -Winkel im Bereich  $-70^\circ$  bis  $180^\circ$  verwendet. Die Aminosäuren R304, G232 und I322, für die keine Winkel berechnet werden konnten, sollten im nach Ramachandran erlaubten Bereich von  $-180^\circ$  bis  $0^\circ$  liegen.

Mit Hilfe von CYANA wurden erneut 500 randomisierte Strukturen berechnet und die 100 besten anhand von Zielfunktionswerten bewertet. Dabei wurde wie für das Peptid **P3** vorgegangen, indem zwei DG-Rechnungen mit  $\phi_3$ - bzw.  $\phi_4$ -Winkeln durchgeführt wurden, bei denen die  $\phi_3$ -Strukturen die niedrigeren Zielfunktionswerte aufwiesen (Abbildung 46).

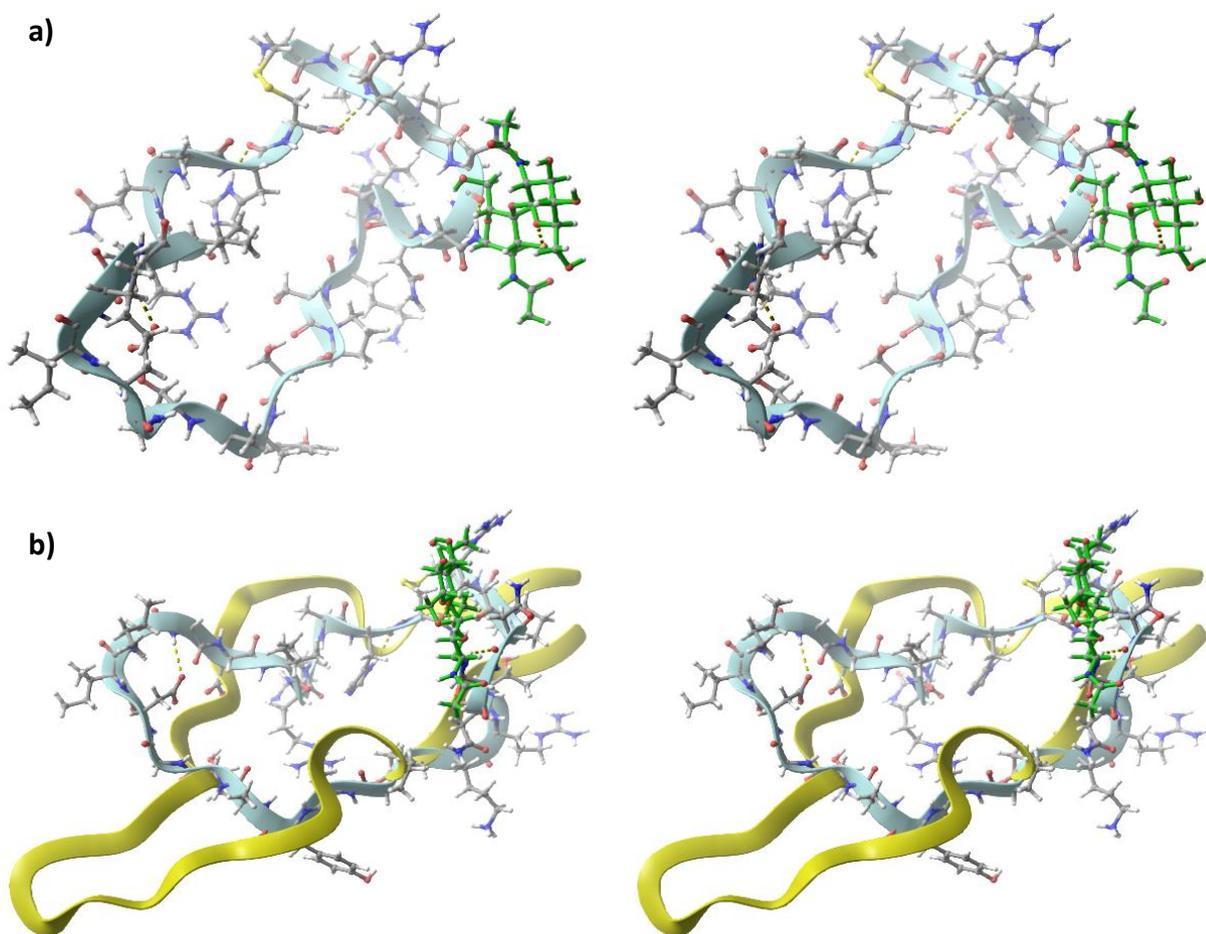


**Abbildung 46:** Auftragung der Zielfunktionswerte gegen die 100 Strukturen für **P4**, deren Winkel und Abstände die Beschränkungen am besten einhalten. Je niedriger der Wert, desto besser werden die *constraints* erfüllt. Die Strukturen mit den  $\phi_3$ -Winkeln (**a**) weisen leicht niedrigere Werte auf als die der  $\phi_4$ -Winkel (**b**) und passen somit besser zu den vorgegebenen Beschränkungen. Die Strukturen der DG-Rechnungen mit einer Kombination aus  $\phi_3$ - und  $\phi_4$ -Winkeln (**c**) haben leicht niedrigere Zielfunktionswerte als die reinen  $\phi_3$ - oder  $\phi_4$ -Strukturen.

Von der  $\phi_3$ -DG-Rechnung ausgehend wurden die nicht eingehaltenen Diederwinkel bestimmt, die bei den Aminosäuren R298, T303 und H329 auftraten und für eine weitere DG-Rechnung in die jeweiligen  $\phi_4$ -Winkel geändert. Die Zielfunktionswerte konnten im Vergleich zur reinen  $\phi_3$ -Rechnung nur minimal gesenkt werden von 7,0 auf 6,7 für die beste Struktur. Insgesamt sind die Zielfunktionswerte deutlich höher als bei **P3**, da einige

Abstandsbeschränkungen nicht eingehalten werden konnten. Bei der kombinierten DG-Rechnung wurden insgesamt 14 *distance constraints* verletzt, von denen acht im Mittel aber weniger als 0.5 Å Abweichung aufwiesen. Somit blieben für die erhaltenen Strukturen sechs größere Verstöße der Abstandsbeschränkungen, die Kontakte zwischen T297 und R298, N300 und N301, N301 und N302, A328 und H329 sowie der Seitenkette von H329 betrafen. Die Abstandsverletzungen liegen demnach alle in der *Base*-Region des Peptids und dem Bereich der Glycosylierungsstelle N301.

Die Struktur des zyklischen Glycopeptids **P4** mit dem niedrigsten Zielfunktionswert wurde um das C-terminale Amid sowie die Chitobiose ergänzt und ist in Abbildung 47 gezeigt. **P4** unterscheidet sich in der Konformation deutlich von der *V3-Loop*-Röntgenstruktur.<sup>51</sup>

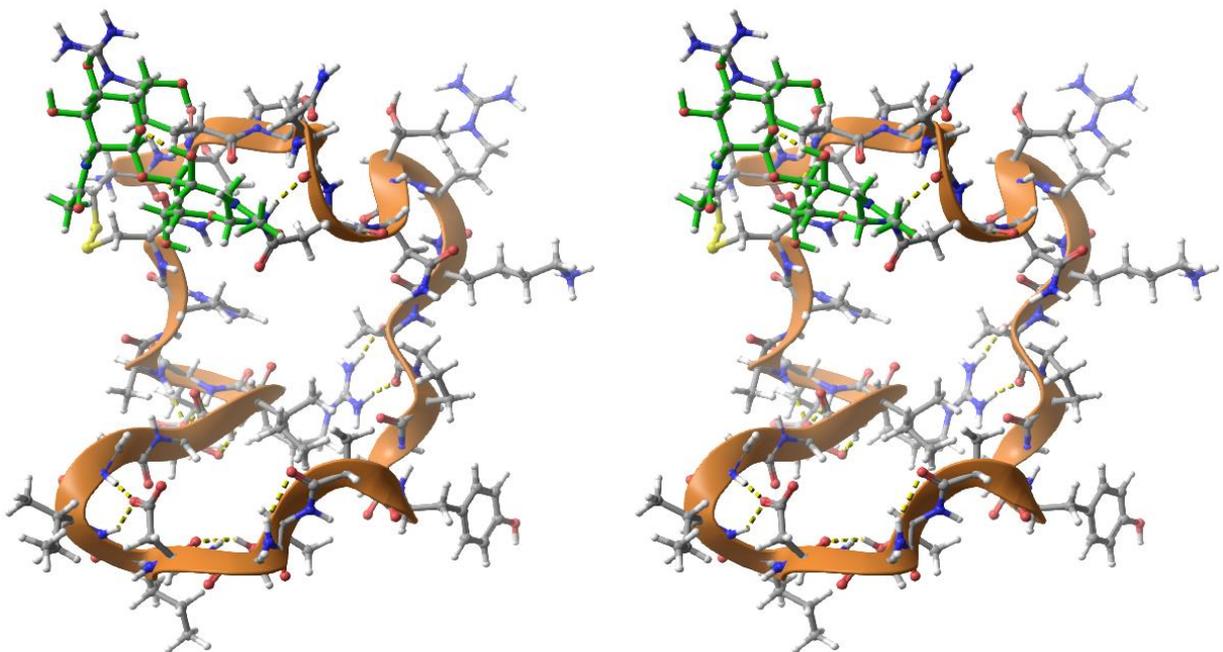


**Abbildung 47:** *Crossed-eye*-Darstellungen der 3D-Struktur des zyklischen Glycopeptids **P4** mit dem niedrigsten Wert der Zielfunktion, erhalten aus der kombinierten DG-Rechnung. Die Struktur von **P4** ist sowohl **a)** alleine als auch als **b)** Überlagerung mit der Röntgenstruktur des *V3-Loops* (2B4C) dargestellt.<sup>51</sup> Die Struktur von **P4** weicht deutlich von der Röntgenstruktur ab. **P4** ist jeweils als Kugel-Stab-Modell, das Glycan jeweils in grün und Wasserstoffbrückenbindungen gelb-gestrichelt dargestellt.

Zum einen ist das durch das Fehlen der PND begründet und zum anderen liegt es vermutlich auch daran, dass die Röntgenstruktur eine andere Sequenz aufweist und unglycosyliert

vorliegt. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Glycosylierung einen Einfluss auf die Konformation des *V3-Loops* hat.

Die Struktur von **P4** aus Abbildung 47 wurde anschließend unter Nutzung der *distance* und *dihedral angle constraints* der DG-Rechnung sowie zehn zusätzlicher Abstandsbeschränkungen bezüglich des C-terminalen Amids und der Chitobiose energieminiert. Die Energieminimierung wurde mit denselben Bedingungen wie für das Peptid **P3** durchgeführt und führte zu einer Struktur (Abbildung 48), deren Energie im Vergleich zur Startstruktur um 1339.4 kJ/mol niedriger liegt. Die mittlere quadratische Abweichung der C $\alpha$ -Atome der Start- und Endstruktur liegt bei RMSD = 2.8 Å, was bedeutet, dass die energieminierte Struktur der Startstruktur noch sehr ähnelt.



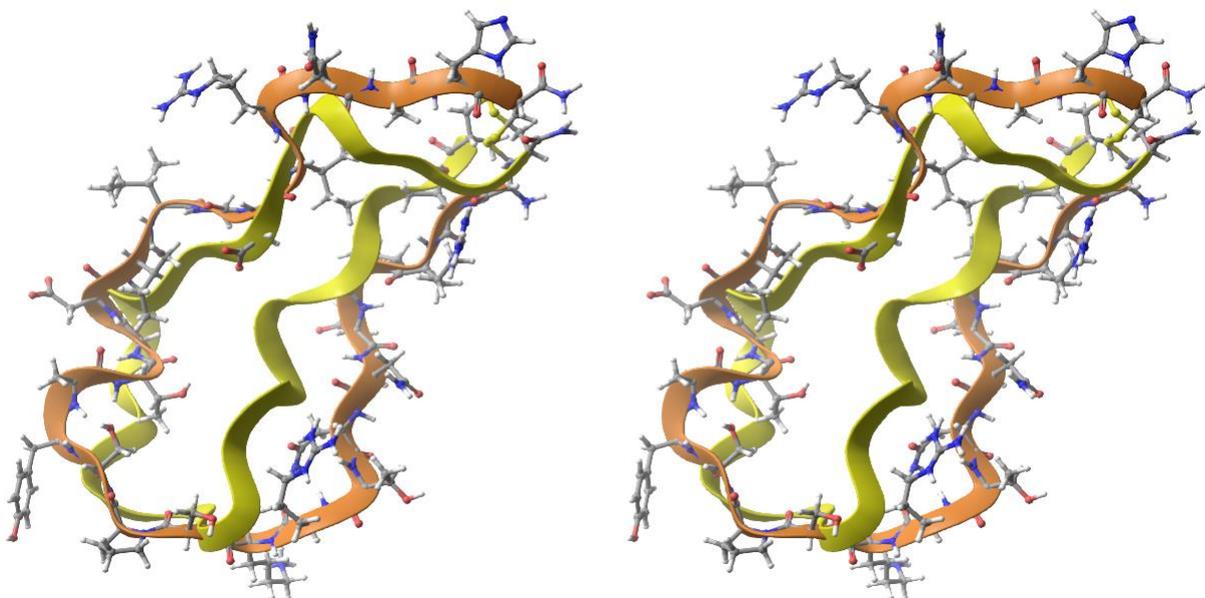
**Abbildung 48:** *Crossed-eye*-Darstellung der energieminierten Struktur des zyklischen Glycopeptids **P4** als Kugel-Stab-Modell.

Die energieminierte Struktur wurde zuletzt ebenfalls in einer MD-Simulation eingesetzt, führte jedoch wie schon beim Peptid **P3** zu vollständig veränderten  $\phi$ -Winkeln und vermehrt gebrochenen Abstandsbeschränkungen, weshalb für den folgenden Vergleich mit den *In-silico*-Strukturen die energieminierte Konformation verwendet wurde.

### 6.3.3 Vergleich der experimentellen mit den berechneten Strukturen

Aus der in Abbildung 49 gezeigten Überlagerung der berechneten (Abschnitt 6.3.1) und der experimentell ermittelten, energieminierten Konformation von **P3** (Abschnitt 6.3.2.1) ist erkennbar, dass beide Strukturen einen grundsätzlich ähnlichen Verlauf des Peptidrückgrats aufweisen. Qualitativ betrachtet unterscheidet sich die *In-silico*-Struktur von der

experimentellen hauptsächlich darin, dass sie etwas schmaler und der C-Terminus stärker verdrillt ist. Diese Verdrillung zeigt sich in den sehr unterschiedlichen  $\phi$ -Winkeln des Q327, welche in der experimentellen Struktur  $-150^\circ$  und in der *In-Silico*-Struktur  $-63^\circ$  betragen (s. Anhang 10.3). Bei der hier gezeigten berechneten Konformation handelt es sich um die, die nach 2 ns der MD-Simulation vorlag. Entsprechend stellt diese nur eine von mehreren möglichen Konformationen der Simulation dar, weshalb geringe Abweichungen zur experimentellen Konformation vertretbar sind. Außerdem ist anzumerken, dass eine Dauer von 2 ns für die MD-Simulation einer so flexiblen Struktur wie dem *V3-Loop* wahrscheinlich zu kurz ist, um eine im Gleichgewicht vorliegende Konformation zu erhalten. Die Stabilisierung des RMSD-Wertes, die auf das Erreichen des Gleichgewichtszustandes hindeutet (vgl. Abbildung 37), wird vermutlich nur durch ein lokales Energieminimum verursacht. Der Vergleich der Diederwinkel  $\phi$  der berechneten und der experimentellen Struktur (s. Anhang 10.3) zeigt jedoch große Abweichungen voneinander, welche sich auch in dem RMSD-Wert der  $\text{C}\alpha$ -Atome von  $4.3 \text{ \AA}$  widerspiegeln. Die Diederwinkel der experimentellen Struktur entsprechen größtenteils den  $\phi_3$ -Winkeln, während die berechnete Struktur, die auf der Röntgenstruktur (2B4C)<sup>51</sup> des gp120 basiert, hauptsächlich Winkel aus dem  $\phi_4$ -Bereich aufweist. Im Vergleich der Winkel mit den vorgegebenen Beschränkungen (s. Anhang 10.3) fällt auf, dass die energieminierte Struktur in einigen Fällen von den *constraints* abweicht.



**Abbildung 49:** *Crossed-eye*-Darstellung der energieminierten Struktur des zyklischen Peptids **P3** (orange und als Kugel-Stab-Modell) in Überlagerung mit der berechneten Struktur desselben Peptids nach einer 2 ns MD-Simulation (gelb). Die Strukturen weisen trotz des RMSD von  $4.3 \text{ \AA}$  der  $\text{C}\alpha$ -Atome eine grobe Ähnlichkeit der Konformation des Rückgrats auf.

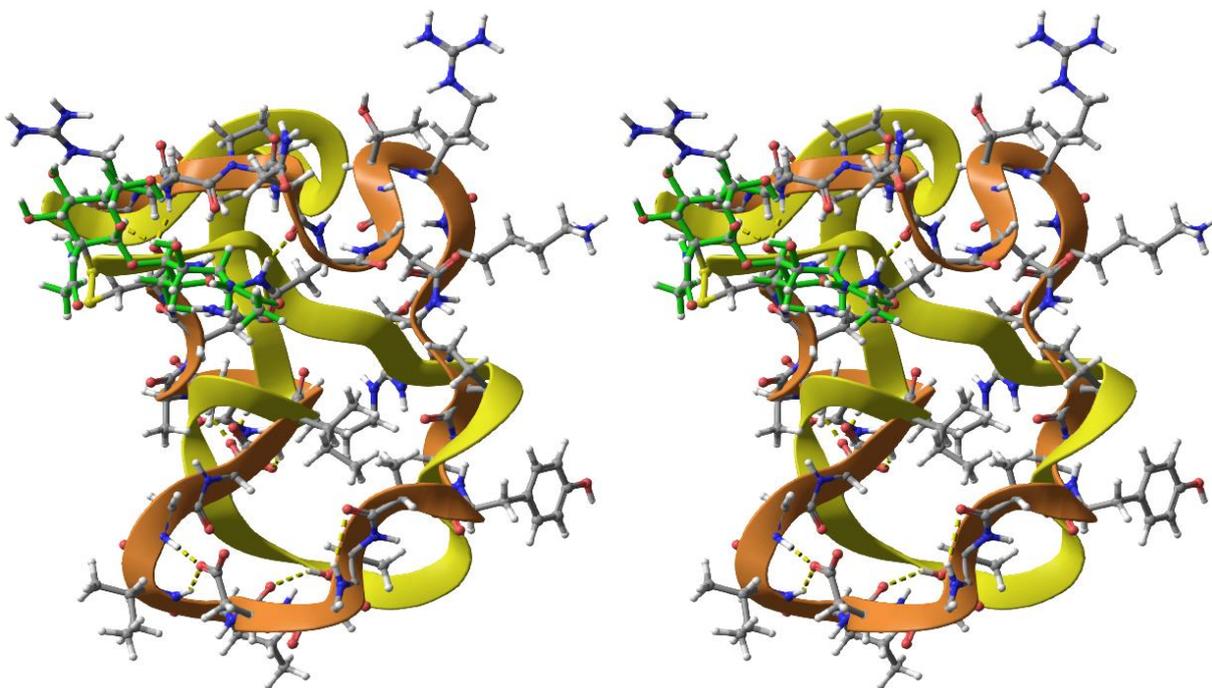
Trotz sehr niedriger Zielfunktionswerte der **P3**-Konformation ist es möglich, dass einzelne  $\phi$ -Winkel nicht korrekt dem  $\phi_3$ - bzw.  $\phi_4$ -Bereich zugeordnet wurden. Somit könnte es sein, dass bei der Energieminimierung einige der möglicherweise falsch zugeordneten Winkel angepasst wurden und eher dem in Lösung vorliegenden Zustand entsprechen.

Beim Vergleich der jeweils vorhandenen Wasserstoffbrücken und Kontakte mit Abständen kleiner als 5 Å fällt auf, dass in der experimentellen Konformation von **P3** die meisten Kontakte der *In-Silico*-Struktur (Abschnitt 6.3.1, Tabelle 3) fehlen. Lediglich der Kontakt zwischen P299 und I325 mit einem Abstand von 3.1 Å und die strukturbedingt in räumlicher Nähe stehenden terminalen Cysteine weisen einen Abstand von weniger als 5 Å auf. In der experimentellen Struktur sind stattdessen mehrere andere Wasserstoffbrückenbindungen (R298-C296, D320-A317, S02-A317, 2x N302-R304) vorhanden.

Die Überlagerung der experimentellen (Abschnitt 6.3.2.2) mit der *In-silico*-Struktur (Abschnitt 6.3.1) von **P4** in Abbildung 50 zeigt deutliche Abweichungen der beiden Konformationen. Beide sind stark verdrillt und weisen eine leicht verbogene Konformation des Peptidrückgrats auf. Allerdings liegen die sich jeweils entsprechenden Aminosäuren an unterschiedlichen Positionen, was durch den hohen RMSD-Wert der C $\alpha$ -Atome von 7 Å bestätigt wird. Demzufolge scheint die MD-Simulation des Chitobiosepeptids **P4** eine weniger aussagekräftige Konformationen generiert zu haben als die des unglycosylierten Peptids **P3**. Ein Grund dafür ist vermutlich, dass die Kraftfeld-Parametrisierungen nicht für Kohlenhydrate ausgelegt sind. Außerdem hat das Molekül durch das Glycan viele neue Freiheitsgrade, sodass das *sampling*, also das Berechnen der verschiedenen möglichen Konformationen eventuell zu kurz war. Möglicherweise spiegelt sich die weniger passende Struktur des Chitobiosylpeptids auch in den höheren RMSD- und RMSF-Werten der Simulation im Vergleich zum unglycosylierten und zum Nonasaccharid-Peptid (vgl. Abbildung 37) wider. Beide **P4**-Strukturen sind in eine andere Richtung gekrümmt als die **P3**-Strukturen, was wahrscheinlich auf die Chitobiose zurückzuführen ist, die mit R326 wechselwirkt.

Der Vergleich der Winkel mit den vorgegebenen Beschränkungen (s. Anhang 10.4) zeigt, dass die energieminierte Struktur etwas stärker von den *constraints* abweicht als das bei **P3** der Fall war. Das ist dadurch zu erklären, dass die Chitobiose und die zugehörigen Abstandsbeschränkungen der Chitobiose nachträglich hinzugefügt und erst im Rahmen der Energieminimierung angewendet werden konnten. Obwohl sich die Strukturen von **P4** deutlich weniger ähneln als die von **P3**, stimmen die Diederwinkel besser mit den Winkelvorgaben überein (s. Anhang 10.4).

Von den Kontakten und Wasserstoffbrückenbindungen der **P4-*In-Silico***-Struktur (Abschnitt 6.3.1, Tabelle 3) finden sich nur die zwischen C296 und C330 sowie die zwischen dem ersten GlcNAc und N301 in der experimentellen Konformation wieder. Die anderen Kontakte der berechneten Konformation weisen in der experimentellen Struktur deutlich größere Abstände auf. Allerdings zeigt die experimentell ermittelte Struktur zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen, die es in der berechneten nicht gibt. So interagiert z.B. D324 mit insgesamt vier verschiedenen anderen Aminosäuren (I325, R326, Q327, A328), D320 mit G323 und T318, und R326 bildet zwei Wasserstoffbrücken zu S306 aus. Weitere vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen gibt es zwischen A317 und G319, N301 und N300 sowie R298 und C330.



**Abbildung 50:** *Crossed-eye*-Darstellung der energieminierten Struktur des zyklischen Glycopeptids **P4** (orange und als Kugel-Stab-Modell) in Überlagerung mit der berechneten Struktur desselben Peptids (gelb). Der Chitobiosylrest an N301 der experimentellen Struktur ist grün dargestellt. Die Strukturen haben deutlich unterschiedliche Konformationen bei einem RMSD von 7.3 Å der C $\alpha$ -Atome.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Strukturvorhersage von V3-Peptiden mittels *molecular modeling* möglich ist und für das unglycosylierte V3-Peptid **P3** recht gut mit der experimentell ermittelten Struktur übereinstimmt. Die *In-silico*-Struktur des glycosylierten Peptids **P4** wies die gleichen Merkmale bezüglich Verdrillung und Krümmung auf, jedoch trotzdem deutliche Unterschiede zu der experimentell ermittelten Konformation.

### 6.3.4 *Molecular Modeling* der CCR5-V3-Loop-Wechselwirkungen

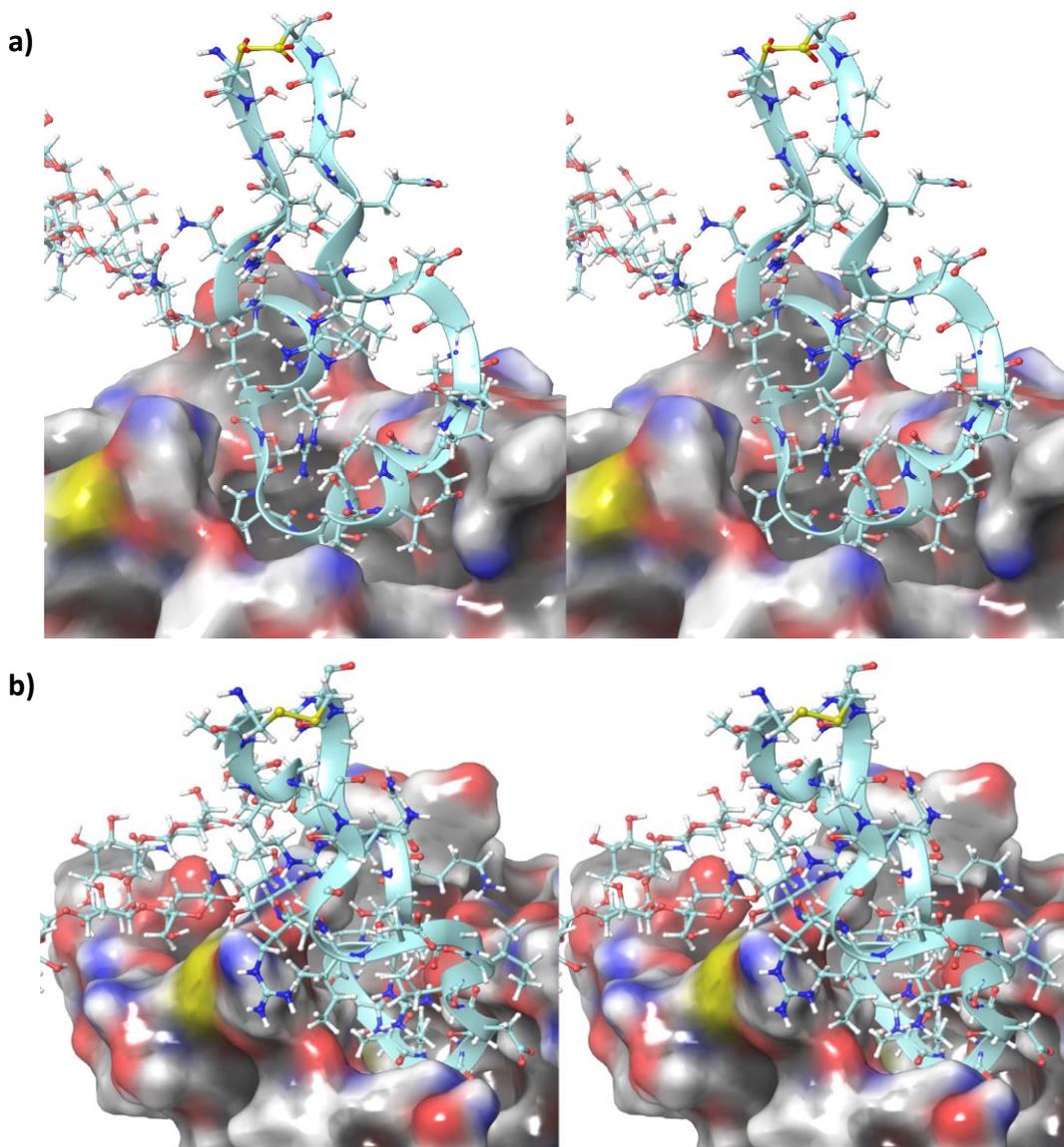
Seit 2013 gibt es eine Röntgenstruktur des 7-Helixtransmembranrezeptors CCR5 im Komplex mit Maraviroc, einem CCR5-Inhibitor.<sup>2</sup> Aufgrund der Bindung des Inhibitors ist es wahrscheinlich, dass der Rezeptor in einer anderen, möglicherweise inaktiven Form vorliegt. Dennoch haben Tan *et al.*<sup>2</sup> eine R5-trope V3-Struktur in den CCR5-Rezeptor modelliert, bei der sich mögliche Wechselwirkungen zwischen CCR5-Y187 und V3-S306, CCR5-N258 und V3-N308, CCR5-S272 und V3-N308 sowie CCR5-Y89 und V3-I309 ergaben. Der V3-Loop liegt dabei in derselben Bindungstasche wie Maraviroc, welche das Zentrum der sieben Helices darstellt. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendete trunkierte Konsensussequenz ist nur die Wechselwirkung zwischen CCR5-Y187 und V3-S306 von Bedeutung, da die restlichen Interaktionen Aminosäuren der fehlenden PND betreffen. Da in dem von Tan *et al.*<sup>2</sup> verwendeten Modell keine Glycosylierung vorhanden war, sollte gp120 mit trunkiertem V3-Loop und Nonasaccharid sowie als nativer V3-Loop der gp120-Röntgenstruktur<sup>51</sup> in die CCR5-Rezeptor-Struktur modelliert werden.

#### 6.3.4.1 *In-silico-Untersuchung der Wechselwirkung des Nonasaccharid-V3-Peptids mit dem CCR5-Rezeptor*

Zunächst wurde versucht den Nonasaccharid-V3-Loop, der dem Peptid aus Abschnitt 6.3.1 entspricht, mit der gleichen Orientierung und dem Y187-S306-Kontakt in den CCR5-Rezeptor zu modellieren, wie in der Veröffentlichung von Tan *et al.*<sup>2</sup> Durch Verwendung einer Oberfläche für den CCR5-Rezeptor, generiert mit einer Kugel, deren Radius (1.4 Å) einem Wassermolekül entspricht, wurde deutlich, dass in dieser Orientierung beide Moleküle stark überlappen. In der Veröffentlichung von Tan *et al.*<sup>2</sup> ist nur das Bändermodell und keine Oberflächen-Darstellung gezeigt, wodurch nicht eindeutig geklärt ist, ob es in jenem Modell ebenfalls zu Überlappungen kam. Der von Tan *et al.*<sup>2</sup> verwendete R5-trope V3-Loop sieht jedoch deutlich schmaler aus als der hier verwendete, weshalb er insgesamt tiefer und möglicherweise besser in die Tasche des CCR5-Rezeptors passt.

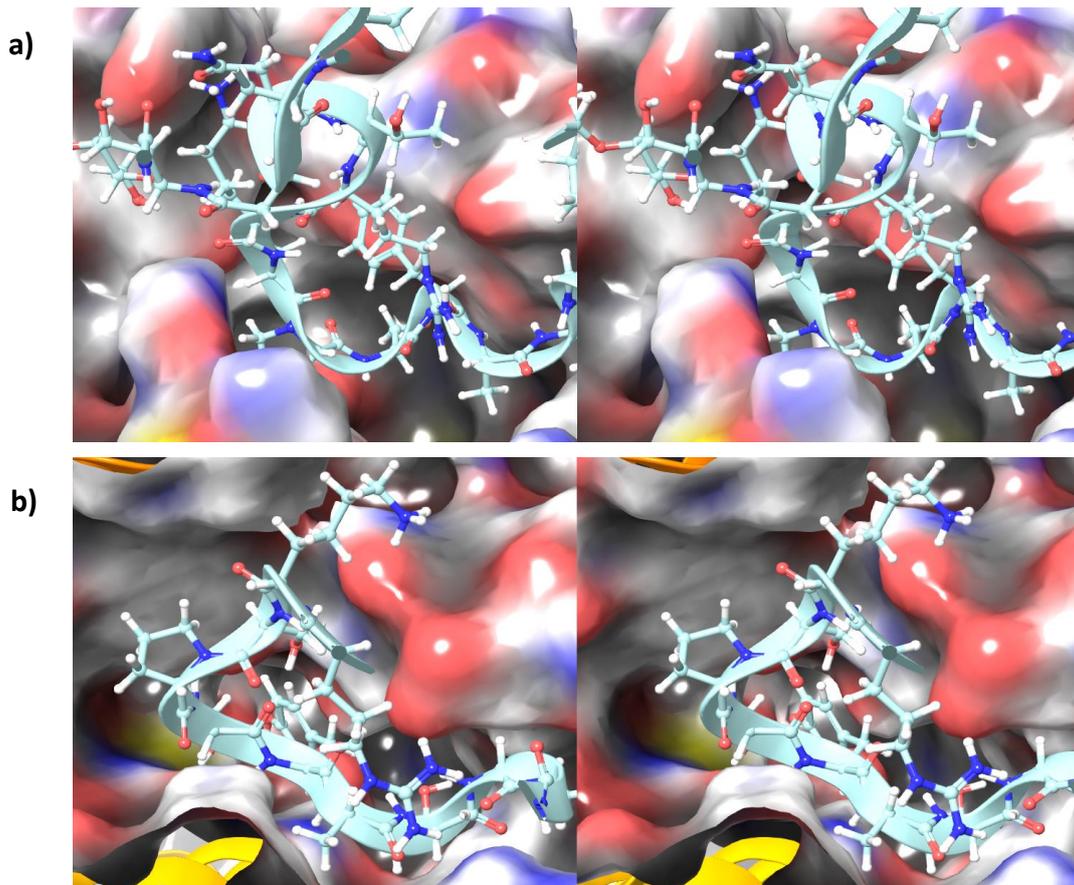
Daraufhin wurde der Nonasaccharid-V3-Loop so angeordnet, dass der Y187-S306-Kontakt erhalten bleibt, es aber zu keinen Überlappungen mehr kommt. In dieser Orientierung stellte das zusätzliche Nonasaccharid sterisch kein Problem dar, da es außerhalb der Bindungstasche lag. Von diesem Modell ausgehend wurde eine MD-Simulation über 3 ns in einer Wasserbox durchgeführt, um festzustellen, ob sich die V3-Region auf ähnliche Weise an den Rezeptor anpasst, wie im Modell von Tan *et al.*<sup>2</sup>

Im Laufe der Simulation hat sich der Nonasaccharid-V3-Loop etwas tiefer in die Bindungstasche bewegt und sich dieser besser angepasst (Abbildung 51 und Abbildung 52). Außerdem haben sich zusätzliche Kontakte und Wechselwirkungen sowohl zwischen dem peptidischen als auch dem Glycanteil und dem Rezeptor entwickelt (s. Anhang 10.5). Die Orientierung ist jedoch noch immer verschieden von der von Tan *et al.*<sup>2</sup> gefundenen. Die Wechselwirkungsenergie, die sich aus der Energie des Komplexes abzüglich der einzelnen Energien der Bindungspartner ergibt, wurde für den letzten *frame* der MD-Simulation zu -291.8 kJ/mol bestimmt.



**Abbildung 51:** *Crossed-eye*-Darstellung des Nonasaccharid-V3-Loops (türkis) in der Bindungstasche von CCR5 **a)** vor und **b)** nach einer 3 ns dauernden MD-Simulation. Im Laufe der Simulation passt sich der V3-Loop besser an Oberfläche und Bindungstasche des Rezeptors an. Auch das Nonasaccharid zeigt Wechselwirkungen mit dem Rezeptor.

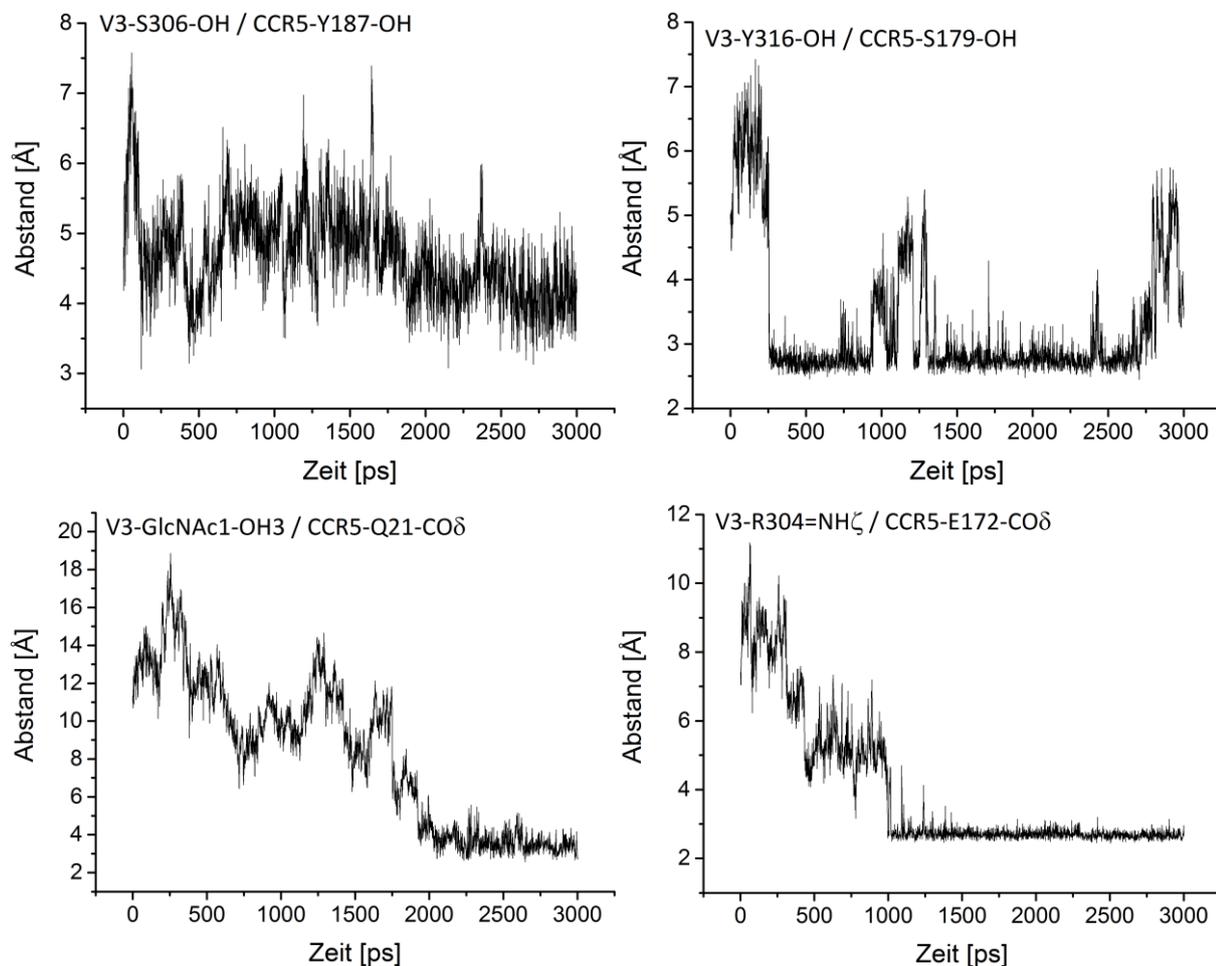
Der absolute Wert ist eindeutig zu hoch, was durch Vergleich mit der experimentellen Bindungsenergie der CCR5-gp120-Wechselwirkung deutlich wird, die bei etwa  $-50$  kJ/mol liegt und hat daher für sich genommen keine Aussage.<sup>186,187</sup> Als relativer Wert im Vergleich mit anderen Energien kann die Energie jedoch Informationen liefern, welche Wechselwirkung möglicherweise stärker ist. Der negative Wert deutet darauf hin, dass tatsächlich eine Bindung zwischen *V3-Loop* und Rezeptor vorlag und das Nonasaccharid keine Einschränkung, sondern eine zusätzliche Wechselwirkung verursachte.



**Abbildung 52:** *Crossed-eye*-Darstellung des Nonasaccharid-*V3-Loops* (türkis) in der Bindungstasche von CCR5 **a)** vor und **b)** nach einer 3 ns dauernden MD-Simulation. Gezeigt ist eine Nahaufnahme der Bindungstasche, aus der deutlich wird, dass sich der *V3-Loop* im Laufe der Simulation tiefer in die Tasche bewegt und besser an deren Form anpasst.

Zur Auswertung wurde zunächst eine *Protein Interaction Analysis* zu drei Zeitpunkten (0 ns, 1.5 ns und 3 ns) der Simulation durchgeführt, um mögliche Kontakte und Wechselwirkungen zu finden (s. Anhang 10.5). Anhand der zunehmenden Anzahl an Kontakten zwischen 2.5 und 4.0 Å, der wachsenden Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen und einer neu gebildeten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen CCR5-H181 und *V3*-Y316 wurde deutlich, dass sich *V3-Loop* und Rezeptor während der Simulation weiter annähern. Die Wechselwirkung zwischen CCR5-Y187 und *V3*-S306 geht jedoch schon während der Energieminimierung, die zu Beginn

der MD-Simulation durchgeführt wurde, verloren und fehlt daher bei 0 ns. Nach 1.5 ns hat sich der Kontakt erneut ausgebildet. Von den Aminosäurepaaren, die zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten Wasserstoffbrückenbindungen eingingen sowie von drei saccharidischen Kontakten zum Rezeptor wurden die Abstände in Abhängigkeit von der Simulationszeit bestimmt, von denen einige in Abbildung 53 gezeigt sind.

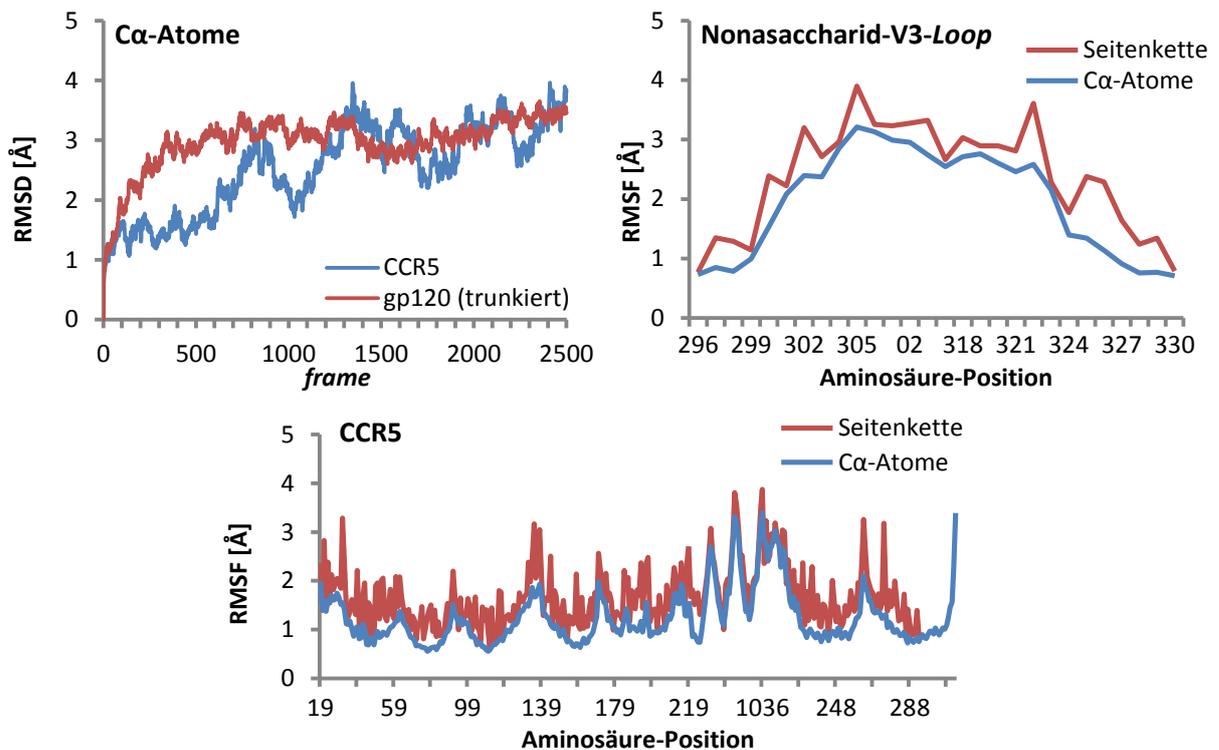


**Abbildung 53:** Zeitlicher Verlauf der Abstände einiger Wechselwirkungen zwischen dem Nonasaccharid-V3-Loop und dem CCR5-Rezeptor während der 3 ns dauernden MD-Simulation. Die Abstände wurden zwischen den Schweratomen der Moleküle bestimmt.

Die Aminosäuren CCR5-Y187 und V3-S306 sind demnach durchgängig in räumlicher Nähe (4.0-4.5 Å), aber zu weit voneinander entfernt für eine Wasserstoffbrückenbindung.<sup>188</sup> Somit liegt eine anders orientierte Bindung vor als im Modell von Tan *et al.*<sup>2</sup> Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen V3-Y316 und CCR5-S179 liegt zwar weder bei 0 ns noch bei 3 ns vor, ist aber doch den größeren Teil der Simulationszeit vorhanden. Die Wasserstoffbrücke zwischen V3-R304 und CCR5-E172 bildet sich im Laufe der Simulation aus, ist ab 1 ns konstant vorhanden und scheint somit ein wichtiger Bestandteil der Bindung von V3-Loop und CCR5-Rezeptor zu sein. Vom Nonasaccharid sind die ersten beiden *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) wichtige Bindungspartner, die Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor

eingehen, wie z.B. zwischen V3-GlcNAc1 und CCR5-Q21 oder V3-GlcNAc2 und CCR5-P19. Weiterhin bildete sich zum Ende der MD-Simulation auch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem V3-GlcNAc5 des 6-Armes und CCR5-E262 aus. Demnach unterstützt dieses Modell die Vermutung, die zur Verwendung der Chitobiose als Glycan in dieser Arbeit führte, dass vor allem die ersten beiden GlcNAcs der N301-Glycosylierung dominant für die Bindung an CCR5 sind.

Im Laufe der MD-Simulation steigt der RMSD-Wert der  $\text{C}\alpha$ -Atome, bezogen auf *frame 0*, sowohl vom V3-Loop als auch vom CCR5-Rezeptor auf etwa 3 Å, was dafür spricht, dass sich nicht nur der *loop* an den Rezeptor anpasst, sondern auch der Rezeptor an den *loop* (Abbildung 54). Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Aminosäuren des CCR5-Rezeptors, welche mit der V3-Region wechselwirken (CCR5: 19-26, 170-190, 260-280), eine höhere Beweglichkeit aufweisen.



**Abbildung 54:** Auftragung der RMSD- und RMSF-Werte des Nonasaccharid-V3-Loops und des CCR5-Rezeptors gegen die *frames* der MD-Simulation bzw. die jeweiligen Aminosäuren. Die MD-Simulation wurde mit dem vollständigen gp120 mit trunkiertem V3-Loop durchgeführt, bei der Auftragung des RMSF ist jedoch nur der Bereich der V3-Region gezeigt. Der RMSD ändert sich bei beiden Molekülen um ca. 3 Å. Die Aminosäuren des V3-Loops fluktuieren umso stärker, je näher sie an der Spitze des *loops* liegen. Vom CCR5 fluktuiert besonders die zwischen den AS 223 und 227 eingefügte Rubredoxin-Region.

Eine weitere mögliche Ursache des Anstiegs des RMSD-Werts könnte die an der intrazellulären Seite des CCR5-Rezeptors eingefügte Rubredoxin-Region sein, welche die höchsten RMSF-Werte und somit die höchste Beweglichkeit aufweist. Im V3-Loop nimmt die

Fluktuation des RMSD umso weiter zu, je näher die entsprechende Aminosäure der *Tip*-Region kommt. Somit weist der *loop* in der Spitze eine höhere Beweglichkeit auf als in der *Base*-Region.

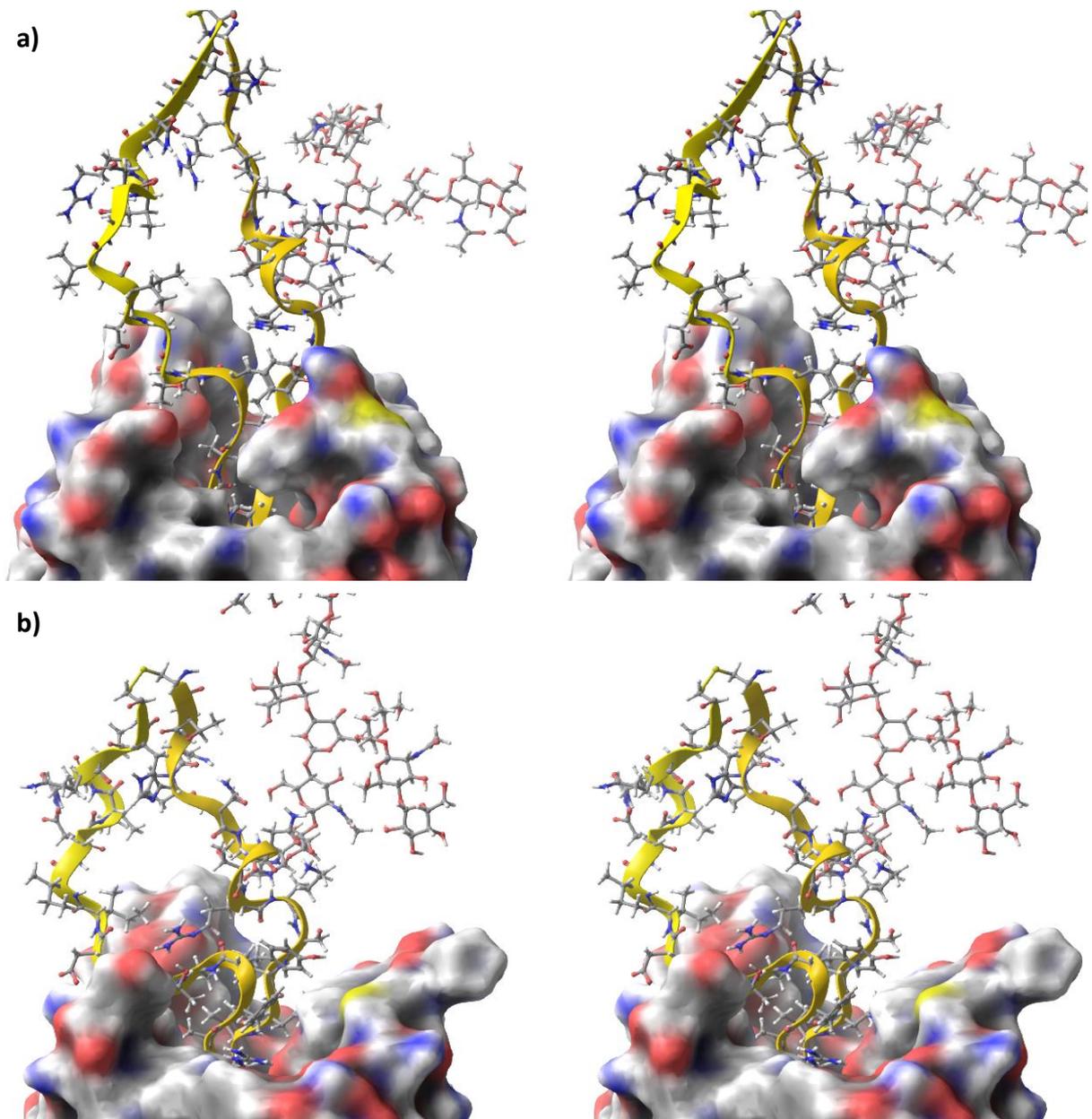
#### 6.3.4.2 *In-silico*-Untersuchung der Wechselwirkung des nativen V3-Loops mit dem CCR5-Rezeptor

Zur Untersuchung der Interaktion des nativen, vollständigen V3-Loops mit dem CCR5-Rezeptor wurde die Röntgenstruktur von gp120 zunächst an drei Stellen mutiert (Q301N, T317A, E320D), um der hier verwendeten Konsensussequenz zu entsprechen. Weiterhin wurde das bereits verwendete Nonasaccharid mit N301 verknüpft, um der natürlichen Glycosylierung möglichst nahe zu kommen. Anschließend wurde versucht, den nativen V3-Loop wie im Modell von Tan *et al.*<sup>2</sup> im CCR5-Rezeptor zu orientieren. Dies war jedoch nicht möglich, da auch der native V3-Loop deutlich breiter zu sein scheint und nicht so weit in die Bindungstasche passt wie der von Tan *et al.*<sup>2</sup> verwendete. Die Spitze des V3-Loops wurde ähnlich orientiert wie im Tan-Modell, ohne dass es zu Überlappungen mit CCR5 kam. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen V3-S306 und CCR5-Y187 konnte allerdings nicht gewährleistet werden. Von dieser Konfiguration ausgehend wurde ebenfalls eine 3 ns lange MD-Simulation in einer Wasserbox durchgeführt, in der der V3-Loop seine Vorzugsorientierung finden sollte.

Während der Simulation hat sich der native V3-Loop nicht grundlegend umorientiert (Abbildung 55). Die Spitze hat sich um etwa 45° verdrillt, die *Stem*- und *Base*-Bereiche haben sich etwas weiter geöffnet und der „Knick“, den der *loop* bei Y316 macht, ist zum Ende der Simulation stärker ausgeprägt (Abbildung 55 und Abbildung 56). Somit liegt am Ende der Simulation eine deutlich andere Orientierung als im Modell von Tan *et al.*<sup>2</sup> vor.

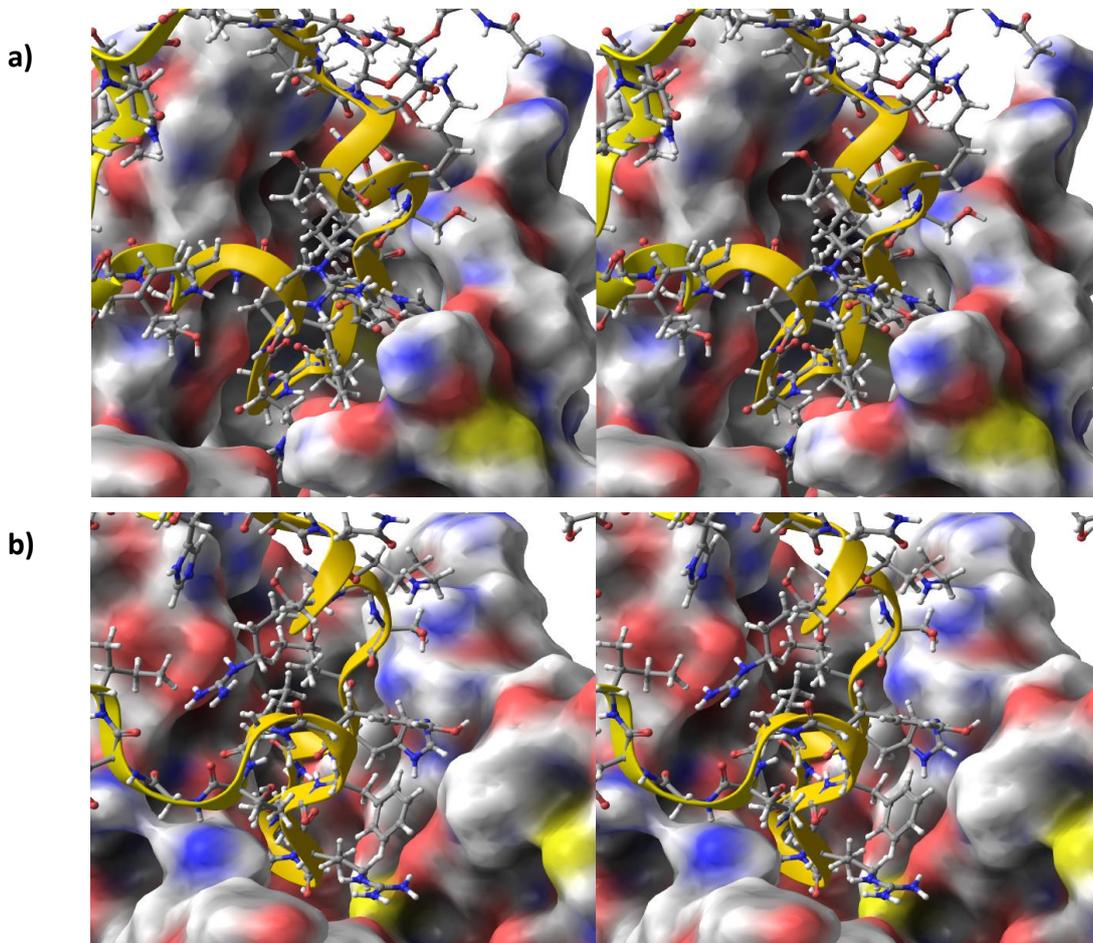
Der N-terminale Bereich von CCR5, der über eine Disulfidbrücke mit dem extrazellulären *loop* 3 (ECL3) verbunden ist, bewegt sich im Laufe der Simulation weg vom V3-Loop und öffnet den Eingangsbereich der Bindungstasche leicht. Dadurch fehlt dieser Bereich als potenzielles Bindungsepitop für das Glycan des V3-Loops. Weiterhin ist festzustellen, dass das Glycan zu keinem Zeitpunkt der Simulation Wechselwirkungen mit CCR5 eingeht. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist, dass die im Vergleich zur trunkierten Struktur deutlich längere Spitze des *loops* verhindert, dass er tief genug in die Bindungstasche passt. Somit war das Glycan zu Beginn der Simulation weiter entfernt von der CCR5-Oberfläche und hätte stärkere konformelle Änderungen durchlaufen müssen, um über die endständigen Kohlenhydrateinheiten des Glycans Kontakt zum CCR5 aufnehmen zu können.

Die Wechselwirkungsenergie, die sich aus der Energie des Komplexes abzüglich der Energien der einzelnen Bindungspartner ergibt, wurde für den letzten *frame* der MD-Simulation zu  $-183.6$  kJ/mol bestimmt. Dieser Wert ist höher als der mit  $-291.8$  kJ/mol bestimmte Wert für die Wechselwirkung des trunkierten V3-Loops mit CCR5, was bedeutet, dass die Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor verringert ist. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Spitze eindeutig schmaler ist als die des verkürzten Nonasaccharid-V3-Loops und somit tiefer in die Bindungstasche passen sollte.



**Abbildung 55:** *Crossed-eye*-Darstellung des nativen V3-Loops (gelb) in der Bindungstasche von CCR5 **a)** vor und **b)** nach einer 3 ns dauernden MD-Simulation. Das Glycan wechselwirkte zu keinem Zeitpunkt der Simulation mit dem CCR5-Rezeptor. Der variable N-Terminus von CCR5 bewegt sich zusammen mit dem ECL3 weg und öffnet die Bindungstasche etwas.

Beim Vergleich der einzelnen Komponenten der Energien (Abschnitt 7.11.3, Tabelle 20) fällt auf, dass sowohl die Energien der Van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch der elektrostatischen bei der Interaktion des nativen V3-Loops mit CCR5 höhere Werte einnimmt als beim trunkierten *loop*. Somit geht der trunkierte V3-Loop trotz des fehlenden Arginins in der Spitze des *loops* mehr ionische Wechselwirkungen mit CCR5 ein als der native. Außerdem spricht die höhere Van-der-Waals-Energie der Interaktion des nativen *loops* für eine schlechtere gegenseitige Anpassung beider Interaktionspartner. Eine weitere mögliche Ursache der niedrigeren Wechselwirkungsenergie sind wahrscheinlich die drei fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen des Glycans zum Rezeptor. Weiterhin sind am Ende der Simulation nur sechs peptidische Wasserstoffbrücken zum CCR5 vorhanden, während der trunkierte Nonasaccharid-V3-Loop acht aufweist, zuzüglich der drei saccharidischen des Nonasaccharids (vgl. Anhang 10.5 und 10.6).

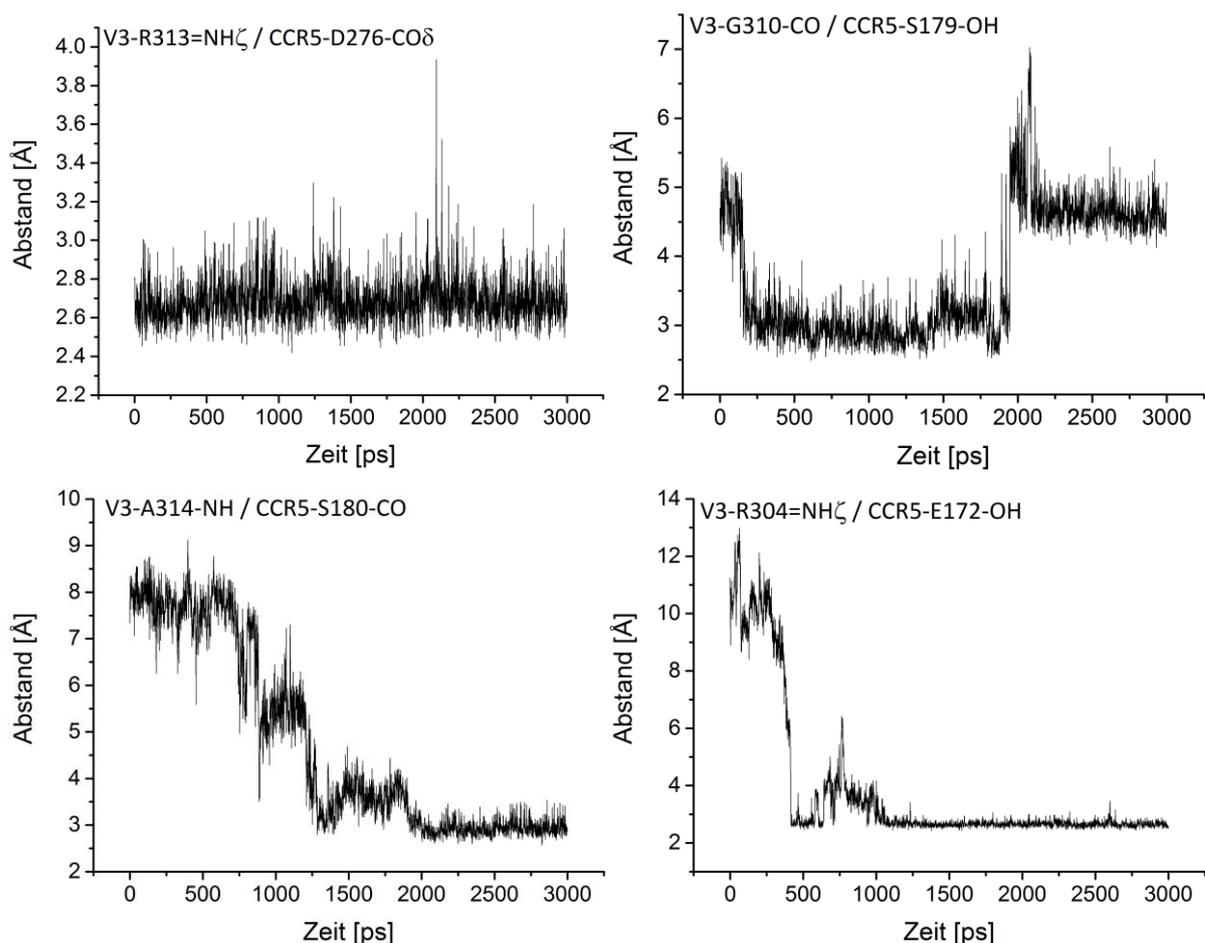


**Abbildung 56:** *Crossed-eye*-Darstellung des nativen V3-Loops (gelb) in der Bindungstasche von CCR5 **a)** vor und **b)** nach einer 3 ns dauernden MD-Simulation. Gezeigt ist eine nähere Ansicht der Bindungstasche, aus der die Verdrillung der Spitze vom V3-Loop sowie der veränderte N-Terminus und ECL3 (rechts im Bild) deutlich wird.

Das könnte zum einen ein Hinweis darauf sein, dass der trunkierte V3-Loop anders an den CCR5-Rezeptor bindet als die native V3-Region. Andererseits könnte es aber auch sein, dass

die vermutlich inaktive Konformation des CCR5-Rezeptors die korrekte Platzierung des V3-Loops, die der natürlichen Bindung entspräche, verhindert. Zuletzt sollte einem auch immer bewusst sein, dass es sich nur um ein Computermodell handelt, welches Tendenzen aufzeigen kann, aber nicht der Realität entsprechen muss.

Für die weitere Auswertung der Simulation wurde wieder eine *Protein Interaction Analysis* zu drei Zeitpunkten der Simulation (0 ns, 1.5 ns, 3 ns) durchgeführt, die Kontakte und Wechselwirkungen der beiden Moleküle zeigt (s. Anhang 10.6). Die Anzahl von Aminosäuren des CCR5 in 2.5 bis 4.0 Å Abstand zum V3-Loop nimmt zu, was dafür spricht, dass sich CCR5 und der V3-Loop in der Simulation weiter annähern. Ebenso nimmt die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen im Laufe der Simulation von vier auf sechs zu und es bilden sich zwei ionische Wechselwirkungen zwischen V3-R304 und CCR5-E172 bzw. V3-D320 und CCR5-R168 aus. Die Abstände der Aminosäuren, die Wasserstoffbrücken und ionische Bindungen eingehen, wurden in Abhängigkeit von der Simulationszeit bestimmt. Abbildung 57 zeigt beispielhaft einige dieser zeitlichen Verläufe der Abstände.



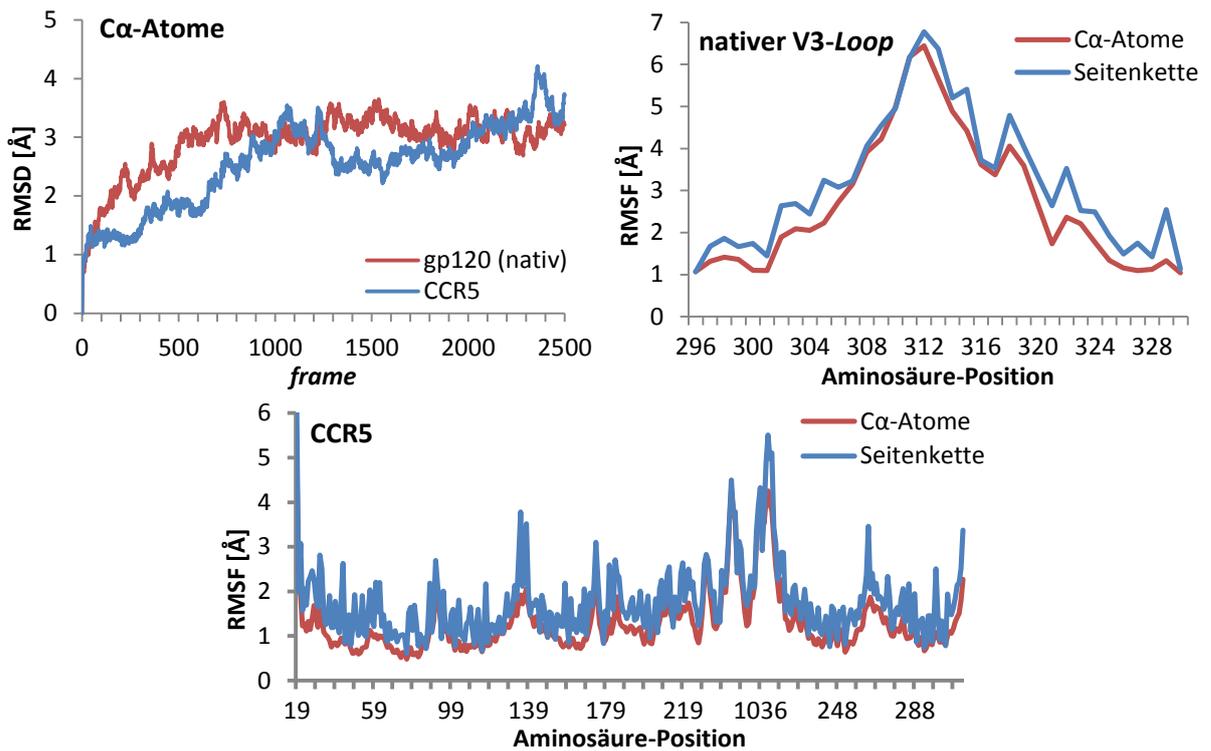
**Abbildung 57:** Zeitlicher Verlauf der Abstände einiger interagierender Aminosäuren des nativen V3-Loops und des CCR5-Rezeptors während der 3 ns dauernden MD-Simulation. Die Abstände wurden zwischen den Schweratomen der Moleküle bestimmt.

Die Aminosäuren V3-R313 und CCR5-D276 sind durchgängig über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden. Die Wasserstoffbrücke zwischen V3-G310 und CCR5-S179, die laut *Protein Interaction Analysis* nur bei 1.5 ns vorhanden ist, bildet sich nach etwa 200 ps und löst sich ab ca. 2000 ps wieder, wohingegen die Wasserstoffbrücke zwischen V3-A314 und CCR5-S180 erst ab 2 ns gebildet wird und dann konstant bleibt. Ein ähnliches Verhalten weisen auch die Wasserstoffbrückenbindungen von V3-G319 und CCR5-G181, V3-I309 und CCR5-Y89 sowie V3-D320 und CCR5-R168 auf. Die Aminosäuren V3-R304 und CCR5-E172 wechselwirken nicht nur über zwei Wasserstoffbrücken miteinander, sondern auch ionisch. Zur Interaktion kommt es ab ca. 300 ps und diese bleibt für die restliche Dauer der Simulation konstant.

Die RMSD-Werte der  $\alpha$ -Atome von CCR5 und vom nativen V3-Loop, bezogen auf *frame 0*, steigen im Verlauf der Simulation auf etwa 3 Å und zeigen insgesamt ein ähnliches Verhalten wie bei der Simulation des trunkierten V3-Loops (Abbildung 58). Auch bei dieser Simulation passen sich V3-Region und CCR5 aneinander an, wenn auch weniger offensichtlich als bei der Simulation des verkürzten V3-Loops. Die RMSF-Werte sind denen der Simulation mit dem trunkierten Nonasaccharid-V3-Loop ebenfalls ähnlich in Bezug auf Kurvenverlauf und Größenordnung. Die längere Spitze des nativen V3-Loops weist etwas größere RMSF-Werte und entsprechend eine höhere Beweglichkeit auf als die Spitze im trunkierten Loop, wodurch sich die Spitze gut der Bindungstasche anpassen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die trunkierte als auch die native V3-Region inklusive großem Glycan in die Bindungstasche des CCR5-Rezeptors passen und mit ihm in Interaktion treten. Der native V3-Loop wechselwirkt jedoch schlechter mit CCR5 als der trunkierte, was dafür spricht, dass das Modell zum einen noch nicht ideal ist und zum anderen, dass die mit Maraviroc kokristallisierte CCR5-Röntgenstruktur tatsächlich in einer ungünstigen, inaktiven Konformation vorliegt.

Weiterhin ließ sich das Modell des V3-CCR5-Komplexes von Tan *et al.*<sup>2</sup> nicht reproduzieren, da die hier verwendeten V3-Loops eine weiter geöffnete *Base*- und *Stem*-Region aufweisen als der Loop aus dem Modell und daher nicht tief genug in der Bindungstasche platziert werden konnten.



**Abbildung 58:** Auftragung der RMSD- und RMSF-Werte des nativen V3-Loops und des CCR5-Rezeptors gegen die *frames* der MD-Simulation bzw. die jeweiligen Aminosäuren. Die MD-Simulation wurde mit dem vollständigen gp120 mit trunziertem V3-Loop durchgeführt, bei der Auftragung des RMSF ist jedoch nur der Bereich der V3-Region gezeigt. Der RMSD ändert sich bei beiden Molekülen um ca. 3 Å. Auch im nativen V3-Loop fluktuieren die Aminosäuren umso stärker, je weiter sie von der *Base-Region* des *loops* entfernt sind. Vom CCR5 fluktuiert wieder die eingefügte Rubredoxin-Region am stärksten.



## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 6: Chemikalien

<i>Hersteller</i>	<i>Chemikalien</i>
Acros	<i>N</i> -Methylmorpholin
ABCR	Triisopropylsilan, Hydrazinhydrat, Z(2-Cl)OSu
AppliChem	Iodacetamid, Dithiothreitol, Guanidiniumchlorid
Bachem	Fmoc-L-Thr( <i>t</i> Bu)-OPfp
Biacore	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid, Ethanolamin
Biochrom	Fötales Kälberserum, RPMI 1640 Medium + L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin (10000 U/mL)
Bioclot	Bovines Fibrinogen
Bruker	2,5-Dihydroxybenzoesäure, ESI <i>Tuning Mix</i>
ChemSolute	Natriumhydroxid, Ameisensäure
Deutero	Deuteriumoxid (99.9%), DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (99.8%)
Euriso-top	Chloroform- <i>d</i> (99.8%)
Fluka	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid, Pentafluorphenol, DMAP
G Biosciences	TCEP-Agarose <i>Reducing Resin</i>
Gibco	0.05% Trypsin-EDTA
Grüssing	Essigsäureanhydrid, Ammoniumhydrogencarbonat, Kaliumchlorid, Natriumacetat, Natriumhydrogencarbonat
Honeywell	Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumsulfat
HyClone	RPMI-Medium
Invitrogen	Trypsin-EDTA (0.05%) <i>phenol-red</i>
Iris Biotech	Fmoc-L-Ala-OH x H <sub>2</sub> O, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp( <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Cys( <i>St</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser( <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Thr( <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH, <i>N,N</i> -Dimethylformamid ( <i>peptide grade</i> ), TBTU, DIPEA, Piperidin, Fmoc-Rink-Amide AM PS-Harz, TFA, DEPBT, HATU, Fmoc-L-Asp-O <i>t</i> Bu, <i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
Merck	Aceton, Ethanol, Diethylether, Dichlormethan, Chloroform, Methanol, Toluol, Salzsäure 37%, Kaliumdihydrogenphosphat,

<b>Hersteller</b>	<b>Chemikalien</b>
	Natriumdodecylsulfat, Kieselgel 60, Maleinsäure
Novabiochem	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OPfp, Fmoc-L-Asn(Trt)-OPfp, Fmoc-L-Pro-OPfp
Riedel de Haen	Natrium
Roche	N-Glycosidase F (rekombinant <i>E. coli</i> )
Sigma-Aldrich	Methanol (abs.), Trypanblau (0.4%), EDC HCl, HOAt in DMF, DMSO, Chitin, Pyridin (abs.), Neuraminidase ( <i>Clostridium perfringens</i> , EC 3.2.1.18), Trypsin ( <i>bovine Pancreas</i> )
vwr BDH	Natriumchlorid, Schwefelsäure 99%, Essigsäure 100%,
Prolabo	Acetonitril ( <i>gradient grade</i> )

Tabelle 7: Materialien

<b>Materialien</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Anionentauscher	Dowex 1x2, 100-200 (Cl), <i>strong anion exchange</i>	Alfa Aesar
Cryo-Röhrchen	Cryo-Röhrchen 2 mL mit Außengewinde, freistehend	Carl Roth
Dialyseschläuche	6-8 k MWCO	SpectrumLabs
	1000 MWCO	SpectrumLabs
Falcon- <i>Tubes</i>	Schraubröhre 15 und 50 mL, steril, ohne Stehrand	Sarstedt
Filter für Vakuumfiltration	GPWP04700 Polyethersulfon, 0.22 µm	Merck Millipore
Minifiltrationsröhrchen	SpinX <i>tubes</i> (0.22 µm Zelluloseacetat)	CoStar Corp
Kationentauscher	Dowex 50Wx2, 100-200, <i>strong acidic</i>	Applichem
Kulturgefäße	Gewebeflasche 175 cm <sup>2</sup> , ventiliert, rot	Sarstedt
Neubauer Zählkammer	0.1 mm Tiefe/0.0025 mm <sup>2</sup>	Marienthal
NMR-Röhrchen	5 mm Typ 502, Typ 507-HP7	Norell
	3 mm <i>match</i>	Hilgenberg
PGC-Säule	Hypercarb, 150x4.6 mm, 3 µm	Thermo Scientific
RP-C <sub>18</sub> -Säule analytisch	EC 250/4.6 Nucleodur C18 Isis, 5 µm	Macherey & Nagel
RP-C <sub>18</sub> -Säule analytisch	Kinetex C18, 1.7 µm, 100 A, 150x2.1 mm	Phenomenex
RP-C <sub>18</sub> -Säule präparativ	VP250/21 Nucleodur C18 Isis, 5 µm	Macherey & Nagel

<b>Materialien</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
RP-C <sub>18</sub> -Säule semipräparativ	Vydac Protein and Peptide C18, 5 µm, 300 A, 250x10 mm	Grace
Serologische Pipetten	1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, steril	Sarstedt
SPR-Chip	SCB CMD200M	Xantec
Ultraschallbad	Sonorex Super RK106	Bandelin
Vakuum Filtrationssystem	Flaschenaufsatzfiltersystem (Nalgene)	Thermo Scientific
Ultrafiltrationsröhrchen	<i>Microsep &amp; Macrosep Advance Centrifugal Device, 1k MWCO</i>	Pall Corporation

Tabelle 8: Puffer und Medien

<b>Puffer/Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Acetatpuffer	10 mM Essigsäure, pH 4.0, 4.5, 5.0 und 5.5
Maleatpuffer	5 mM Maleinsäure, pH 6.0
PBS-Puffer	68 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.9 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4
Tris-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 8.2
Wachstumsmedium	RPMI 1640, 50 mL Fötale Kälberserum, 5 mL Penicillin/ Streptomycin
Einfriermedium	35 mL RPMI 1640, 5 mL DMSO (Ampulle), 10 mL Fötale Kälberserum

Tabelle 9: Zelllinien und Antikörper

<b>Zelllinie/Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-hCCR5, Ratte (PE)	BioLegend
GHOST(3)-Hi5	NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. V.N. Kewal Ramani & Dr. D.R. Littman
GHOST(3)-Parental	NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. V.N. Kewal Ramani & Dr. D.R. Littman

Tabelle 10: Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller</b>
CO <sub>2</sub> -Inkubator	BB6060	Heraeus
Durchflusszytometer	FACS Cantoll	Becton Dickinson

<b>Gerät</b>	<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller</b>
HPLC-Anlage	1200 Series	Agilent Technologies
HPLC-Anlage	Merck Hitachi LaChrom L-7000	Merck Hitachi
LC-ESI-Q/TOF-MS	UHPLC UltiMate 3000 (HPLC) & Maxis (MS)	Dionex Bruker Daltonics
LC-ESI-TOF-MS	1200 Series (HPLC) & 6224 TOF LC/MS (MS)	Agilent Technologies Agilent Technologies
MALDI-TOF-MS	Ultraflex MALDI TOF/TOF	Bruker Daltonics
Mikroskop	Typ S200, Okular: A10/0.25	Helmut Hund GmbH
Mikrowellensyntheseroboter	Liberty & Discover	CEM
NMR-Spektrometer	DRX 500 (11.67 T, $\nu_L(^1\text{H}) = 499.87$ MHz, inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf)	Bruker BioSpin GmbH
	Avance I, 700 MHz (16.35 T, inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf)	Bruker BioSpin GmbH
pH-Meter	pH 3110 mit pH-Messkette SenTix 41	WTW
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 M $\Omega$	SGwater
SPR-Spektrometer	Biacore J	Biacore
Sterilwerkbank	HeraSafe HS12	Heraeus
UV/Vis-Spektrometer	UV-160 A, UV mini 1240	Shimadzu
Zentrifugen	5417 R, 5804 R	Eppendorf

Tabelle 11: Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Illustrator CS 4	Adobe
Inkscape 0.91	Inkscape
MassHunter Qualitative Analysis B.04.00	Agilent Technologies
Data Analysis 4.2 SP 4 ESI Compass 1.3	Bruker Daltonics
LC/MSD Chemstation Rev.B.04.03	Agilent Technologies
otofControl 3.4 (Build 16)	Bruker Daltonics
HyStar 3.2 (Build 49.9)	Bruker Daltonics

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Chromeleon Xpress	Dionex
flexAnalysis 3.3	Bruker Daltonics
Topspin 3.1	Bruker Biospin
PepDriver 2.6.4	CEM
Biacore J Control Software 1.1	Biacore
BIAViewer 3.1	Biacore
BD FACSDiva 8.0.1	Becton Dickinson
FlowJo V.10.1	FlowJo, LLC
Origin Pro 9.1	OriginLab
Maestro 2015-4 (Version 10.4.018)	Schrödinger
CYANA 2.1	L.A. Systems Inc.
ChemDraw 11.0	PerkinElmer

## 7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Die unterschiedlichen Peptide wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach folgenden Verfahren dargestellt, gereinigt und charakterisiert.

### AAV1 Automatisierte Festphasensynthese

Die Peptide wurden vom C- zum N-Terminus durch den Mikrowellensyntheseroboter synthetisiert. Die Synthesen wurden mit Ansatzgrößen von 50 bzw. 100  $\mu\text{mol}$  Fmoc-Rink Amide AM-PS-Harz (Belegung: 0.72 mmol/g) durchgeführt und das Harz wurde in DMF gequollen. Die Fmoc-Entschützung erfolgte für 3 min mit Piperidin/DMF (1:4) (35 W bzw. 42 W, 75 °C). Die Kupplung der Fmoc-geschützten L-Aminosäuren (0.2 M) wurde im zehnfachen (50  $\mu\text{mol}$  Ansatz) bzw. fünffachen (100  $\mu\text{mol}$  Ansatz) Überschuss in einer fünfminütigen Zweifachkupplung (15 W bzw. 30 W, 75 °C) durchgeführt. Die Aminosäuren Cystein und Histidin wurden bei 50 °C (25 W) für 6 min und Arginin für 30 min bei 75 °C (25 W bzw. 30 W) gekuppelt. Der Aktivator TBTU (0.5 M in DMF) sowie die Base DIPEA (2.0 M in DMF) wurden hinsichtlich der verwendeten Menge Harz in zehnfachem und 20-fachem (50  $\mu\text{mol}$  Ansatz) bzw. in fünffachem und zehnfachem (100  $\mu\text{mol}$  Ansatz) Überschuss eingesetzt. Es wurde nach jeder Kupplung für 2 min mit Essigsäureanhydrid (10% (v/v) in DMF) acetyliert (40 W, 65 °C), um nicht umgesetzte Aminogruppen zu *cappen*. Nach dem letzten Zyklus wurde mit DMF gewaschen.

**AAV2 Manuelle Peptidsynthese der letzten fünf Aminosäuren**

Die eingesetzten Äquivalente beziehen sich auf die Stoffmenge, die sich beim Fmoc-Monitoring nach der Chitobiosylasparaginbaustein Kupplung ergab. Die Fmoc-Gruppe wurde durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für 30 min bei 50 °C abgespalten. Die Aminosäuren wurden jeweils für 1 h bei 50 °C zweifach gekuppelt. Dabei wurde die jeweilige Aminosäure im zehnfachen, TBTU und DIPEA im zwölffachen Überschuss eingesetzt. Die Aminosäuren, TBTU und DIPEA wurden jeweils in 0.5 mL DMF gelöst. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden zweimal durch 30-minütiges Versetzen mit 2 mL 10%iger (v/v) Acetanhydridlösung in DMF bei 50 °C acetyliert. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF gewaschen. Bei der terminalen Fmoc-Abspaltung wurde die Rohausbeute mittels Fmoc-Monitoring (AAV3) bestimmt.

**AAV3 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Fmoc-Monitoring**

Die terminalen Fmoc-Schutzgruppen wurden manuell abgespalten, um durch photometrische Messung des entstandenen Methylenfluorens die Rohausbeuten zu bestimmen. Dafür wurde das in DMF vorliegende Harz dreimal mit DMF gewaschen und nach Trocknung im Vakuum zweimal mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) versetzt und für 20 min bei Rt im Schüttler inkubiert. Die Lösungen wurden vereinigt und viermal mit 4 mL DMF gewaschen. Für das Fmoc-Monitoring wurden zwischen 20 und 100 µL der Abspalllösung 20-, 40- oder 80-fach verdünnt und die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm bestimmt. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz (10) lässt sich die Stoffmenge  $n_{\text{Fluoren}}$  des Methylenfluorens berechnen.

$$n_{\text{Fluoren}} = \frac{\text{OD} \cdot V}{d \cdot \varepsilon} \cdot F \quad (10)$$

Wobei:  $V$  = Gesamtvolumen der vereinigten Abspalllösungen, hier: 0.02 L,  $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient, hier: 7950 L/(mol·cm),  $d$  = Schichtdicke der Glasküvette, hier: 1 cm, OD = gemessene Absorption,  $F$  = Verdünnungsfaktor, hier: 20, 40 oder 80

**AAV4 Capping mit Z(2-Cl)OSu**

Zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen in Anwesenheit der ungeschützten Chitobiose wurden 4 Äq. Z(2-Cl)OSu in 1.5 mL DMF/DCM (1:1) gelöst und mit 8 Äq. DIPEA versetzt. Das Gemisch wurde zum Harz gegeben und der Ansatz für 15 min bei 60 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mehrfach mit DMF und DCM gewaschen.

**AAV5 Abspaltung der Peptide vom Harz**

Die Peptide wurden nach der Fmoc-Entschützung manuell vom Harz abgespalten. Gleichzeitig wurden alle Seitenkettenschutzgruppen bis auf die StBu-Gruppe abgespalten.

**Variante 1:**

Das Harz wurde zweimal mit 3 mL der Abspalllösung, bestehend aus TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:5:2), versetzt und für 90 min bei Rt geschüttelt. Das Harz wurde anschließend viermal mit je 2 mL Abspalllösung und viermal mit je 2 mL TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10 mL Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde bei -20 °C gelagert.

**Variante 2:**

Das Harz wurde einmal mit 3 mL TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) versetzt und für 2 h bei Rt geschüttelt. Anschließend wurde mehrfach mit je 2 mL TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10 mL Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde bei -20 °C gelagert.

**Variante 3:**

Das Harz wurde zweimal mit 3 mL TFA/TIPS (95:5) versetzt und für 1 h bei Rt geschüttelt. Das Harz wurde zwischendurch und anschließend mehrfach mit je 2 mL TFA gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10 mL Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde bei -20 °C gelagert.

**AAV6 O-Deacetylierung an der festen Phase**

Die Deacetylierung wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zur Entfernung der Acetylschutzgruppen der Chitobiose wurde das Harz kurz im Wasserstrahlvakuum getrocknet und mehrmals mit abs. Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Harz mit 6.0 mL 20%iger Hydrazinhydrat-Lösung in abs. Methanol versetzt und für 6 h bei Rt geschüttelt. Danach wurde das Harz mehrfach mit Methanol und DCM gewaschen und das Peptid vom Harz abgespalten (AAV4).

**AAV7 O-Deacetylierung nach Zemplén**

Die Deacetylierung der Chitobiose wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Das gefriergetrocknete Glycopeptid wurde in 10 mL abs. Methanol aufgenommen und mit einer frisch hergestellten 1%igen Natriummethanolatlösung in Methanol auf pH 9 eingestellt. Die

Reaktion wurde nach 19 h durch Neutralisierung mit Trockeneis abgebrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

#### **AAV8 Entschützung der StBu-Cysteine mit Dithiothreitol**

Die Entschützung wurde unter Stickstoffatmosphäre in einer entgasten 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung (pH 8.0) durchgeführt. Dazu wurden 2 bis 10 mg Peptid in der entgasten  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit einer Konzentration von etwa 120  $\mu\text{M}$  gelöst und mit 5 Äq. DTT versetzt. Die Lösung wurde für 24 h bei 30 °C geschüttelt und mit MALDI-MS (AAV13) auf die vollständige Entschützung überprüft.

#### **AAV9 Zyklisierung durch Ausbilden einer Disulfidbrücke**

Die Reaktionslösung der vollständig entschützten Peptide wurde durch Zugabe einer entgasten 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung (pH 8.0) unter Stickstoffatmosphäre auf eine Konzentration von 48  $\mu\text{M}$  verdünnt. Anschließend wurde die Lösung in einem offenem Gefäß für 2 h kräftig gerührt, wobei die Reaktion mittels MALDI-MS (AAV13) verfolgt wurde. Die Zyklisierung wurde durch die nachfolgende Ultrafiltration (AAV10) abgebrochen.

#### **AAV10 Ultrafiltration**

Die Ultrafiltration wurde mit Hilfe eines Ultrafiltrationsröhrchens (*Microsep* bzw. *Macrosep Advance Centrifugal Device*, 1k MWCO) durchgeführt. Die Lösungen wurden bei 7000 g (*Microsep*) bzw. 5000 g (*Macrosep*) bei 4 °C zentrifugiert und eingengt. Durch mehrmalige Zugabe von  $\text{ddH}_2\text{O}$  wurde die Lösung entsalzt. Die eingengte Lösung wurde schließlich gefriergetrocknet und das zyklisierte Peptid nach AAV11 und AAV12 gereinigt.

#### **AAV11 Etherextraktion**

Die Rohprodukte wurden mit Hilfe einer Etherextraktion vorgereinigt. Dazu wurden 5 mL gekühlter Diethylether zum Rohprodukt gegeben. Es wurde im Ultraschallbad suspendiert, anschließend für 10 min zentrifugiert (15 °C, 8000 rpm) und der Überstand dekantiert. Der Rückstand wurde in 10 mL Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde bei -20 °C gelagert.

#### **AAV12 Reinigung der Produkte mittels HPLC**

Die Rohprodukte von **P2** wurden über eine HPLC (Agilent) mit Hilfe einer präparativen (Nucleodur Isis) und/oder semipräparativen (Vydac) RP-Säule gereinigt. Bei der präparativen RP-Säule wurde eine Flussrate von 20 mL/min bei einem *column volume* (CV) von 86.61 mL verwendet. Bei der semipräparativen RP-Säule wurde eine Flussrate von 5 mL/min bei einem

CV von 19.63 mL verwendet. Als Laufmittelsystem dienten ddH<sub>2</sub>O/MeCN/FA im Verhältnis 95:5:0.1 (Laufmittel A) und MeCN/ddH<sub>2</sub>O/FA im Verhältnis 95:5:0.1 (Laufmittel B). Für die Reinigung wurden etwa 30 mg Rohprodukt in 2 mL Laufmittel A gelöst, wobei unlösliche Bestandteile durch ein Minifiltrationstube (Spin-X, 0.22 µm, 1 min, Rt, 7500 rpm) abgetrennt wurden.

**Tabelle 12:** Verwendete Gradienten für die Reinigung mittels RP-Säule an der Agilent HPLC-Anlage

Peptid	Gradient Laufmittel B
<b>P2</b> nach Variante 1-4 (Nucleodur Isis)	2 min 0%→15%, 16 min 15%→30%, 20 min 30%→100%, 22 min 100%→100%, 26 min 100%→0%
<b>P2</b> nach Variante 4 & 5 (Grace Vydac)	5 min 0%→0%, 15 min 0%→27%, 35 min 27%→30%, 39 min 30%→100%, 41 min 100%→100%, 45 min 100%→0%

Die Reinigung der zyklischen Peptide **P3** und **P4** erfolgte mit Hilfe einer analytischen RP-Säule bei 45 °C an der Merck Hitachi HPLC-Anlage. Das Nonasaccharid (**19**) wurde mit Hilfe einer PGC-Säule gereinigt. Als Laufmittelsystem dienten jeweils ddH<sub>2</sub>O + 0.1% FA (Laufmittel A) und MeCN + 0.1% FA (Laufmittel B). Für die analytischen Läufe wurde ca. 1 mg vom Rohprodukt in 200 µL Laufmittel A gelöst und für die PGC-Läufe ca. 30 mg in 300 µL. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Minifiltrationssäule (s.o.) abgetrennt.

Sowohl an der Agilent HPLC als auch an der Merck Hitachi HPLC erfolgte die Detektion photometrisch bei den Wellenlängen 215 nm und 254 nm. Mit Hilfe von MALDI-TOF-MS (AAV13) bzw. ESI-MS (AAV14) wurden die Fraktionen auf Anwesenheit des Produktes untersucht und gegebenenfalls vereinigt. Das Acetonitril wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 13:** Verwendete Gradienten für die Reinigung mittels RP-Säule an der Merck Hitachi HPLC-Anlage

Produkt	Gradient Laufmittel B
<b>P3</b> (Nucleodur Isis)	3 min 5%→5%, 15 min 5%→16%, 25 min 16%→19%, 29 min 19%→95%, 30 min 95%→95%, 34 min 95%→5%
<b>P4</b> (Nucleodur Isis)	3 min 5%→5%, 15 min 5%→15%, 25 min 15%→20%, 29 min 20%→95%, 31 min 95%→95%, 35 min 95%→5%
<b>(19)</b> (Hypercarb)	10 min 0%→2%, 22 min 2%→9%, 75 min 9%→17%, 95 min 17%→40%, 105 min 40%→100%, 115 min 100%→100%, 120 min 100%→0%

**AAV13 MALDI-TOF-MS Probenpräparation und Messung**

Als Matrix für die MALDI-TOF-MS Messungen diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (10 mg/mL in Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA (3:7, v/v)). Von der Matrix wurden 0.5 µL auf den Probenteller (*Ground Steel MALDI Target Plate*) gegeben und getrocknet. Anschließend wurden je 0.5 µL der Proben auf den Probenteller gegeben und getrocknet. Die Messungen erfolgten am Ultraflex MALDI TOF/TOF. Es wurde jeweils im Positivionen- und Reflektormodus im Bereich von  $m/z = 600-4500$  gemessen. Der Bereich bis  $m/z = 550$  wurde unterdrückt. Es wurden 4000 Laserpulse mit einer Frequenz von 1000 Hz auf die Probe geschossen. Mit den in Tabelle 14 genannten Substanzen wurde kalibriert.

**Tabelle 14:** Kalibranten für die Akquisition von MALDI-Spektren am MALDI-TOF/TOF

Kalibrant	$m/z$
Bradykinin (1-7)	757.3992
Angiotensin II	1046.5418
Angiotensin I	1296.6848
Substance P	1347.7354
Bombesin	1619.8223
Renin Substrat	1758.9326
ACTH (1-17)	2093.0862
ACTH (18-39)	2465.1983
Somatostatin	3147.4710

**AAV14 ESI-TOF-MS Probenpräparation und Messung**

Die Proben wurden, falls sie noch nicht in Lösung vorlagen, in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die erhaltene Lösung wurde gegebenenfalls auf etwa 20 µmol/L verdünnt, falls nötig filtriert (0.22 µm, 7000 g) und in *vials* oder *well plates* überführt. Es wurden jeweils 2 µL der Probe injiziert und im Positivionenmodus vermessen. Die Flussrate betrug 0.3 mL/min und die Gastemperatur 325 °C bei einem Gasfluss von 10 L/min. Der *Nebulizer* wurde auf 15 psi eingestellt und die Kapillarspannung betrug 4000 V.

**AAV15 LC-ESI-MS Probenpräparation und Messung**

Die Proben wurden mit ddH<sub>2</sub>O + 0.1% FA auf etwa 50 µM verdünnt und mit Hilfe eines Zentrifugenfilters (Spin-X, 0.22 µm) von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt. Von der Probe wurden jeweils 100 µL injiziert und mit einer Flussrate von 0.25 mL/min über eine

analytische Säule (Kinetex) aufgetrennt. Die Temperatur wurde auf 40 °C eingestellt und die MS-Messung erfolgte im Positivionenmodus. Die Gastemperatur lag bei 190 °C bei einem Fluss von 8.5 L/min. Der Nebulizer wurde auf 8.5 bar eingestellt und die Kapillarspannung betrug 5000 V mit einem *Offset* von -500 V. Der *in source CID* betrug 0.0 eV und es wurde mit dem *ESI Tuning Mix* (Bruker) im *enhanced quadratic* mode kalibriert.

### AAV16 NMR Probenpräparation und Messung

Die Charakterisierung der Peptide und Glycopeptide mittels NMR-Spektroskopie wurde an einem *Avance* 700-MHz-Spektrometer durchgeführt. Die Aminosäuren-Signale wurden anhand von 2D-TOCSY-Spektren der Pulssequenz *dipsi2esgpph* ( $d_9 = 0.1$  s bzw. 0.07 s) sowie 2D-H,H-COSY-Spektren des Pulsprogramms *cosydfesgpph* zugeordnet. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe von 2D-NOESY-Spektren des Pulsprogramms *noesyegpph* ( $d_8 = 0.2$  s). Die vom Produkt eingesetzten Mengen lagen bei etwa 0.5 bis 2.0 mg und wurden jeweils in 600  $\mu$ L bzw. 170  $\mu$ L H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) (pH 1.9) gelöst. Die Experimente wurden bei 300 K durchgeführt und die Spektrenweite betrug jeweils 10 ppm. 1D-Spektren wurden mit 32k Datenpunkten, 2D-Spektren mit 4k bis 8k Datenpunkten in F2 und 768 in F1 aufgenommen. Die Wasserunterdrückung wurde durch *excitation sculpting* ( $P_{12} = 2$  bis 8 ms) erreicht. Um die Auflösung zu erhöhen wurde ein *zerofilling* durchgeführt. Prozessierung, Phasen- und Basislinienkorrektur sowie Kalibrierung ( $\delta_{\text{HDO}} = 4.746$  ppm) und Auswertung der Spektren erfolgten mit der Software TOPSPIN 3.1.

### AAV17 Konzentrationsbestimmung mittels NMR

Anhand der Gleichung (11) lässt sich die Konzentration einer Probe mittels NMR bestimmen. Dazu werden die Integrale  $I$  sowie die Anzahl der Protonen  $nH$  des entsprechenden Signals der zu bestimmenden Substanzkonzentration  $c_{\text{Sub}}$  und einer Referenz bekannter Konzentration  $c_{\text{Ref}}$  ins Verhältnis gesetzt. Weiterhin ist ein Faktor  $F$  nötig, der sich aus dem Verhältnis von  $D1_{\text{max}}$  zu dem  $D1$ -Wert ergibt ( $F = \frac{D1_{\text{max}}}{D1}$ ), der für das Spektrum verwendet wurde, aus dem das Integral bestimmt wurde.

$$c_{\text{Sub}} = \frac{I_{\text{Sub}}}{I_{\text{Ref}}} * \frac{F_{\text{Sub}}}{F_{\text{Ref}}} * \frac{nH_{\text{Ref}}}{nH_{\text{Sub}}} * c_{\text{Ref}} \quad (11)$$

Wobei:  $c_{\text{Sub}}$  = Konzentration der Substanz,  $I_{\text{Sub}}$  = abs. Integral der Substanz,  $F_{\text{Sub}}$  = Faktor, abh. von  $D1$ -Zeit der Substanz,  $nH_{\text{Sub}}$  = Anzahl Protonen des verw. Substanz-Integrals,  $c_{\text{Ref}}$  = Konzentration der Referenz,  $I_{\text{Ref}}$  = abs. Integral der Referenz,  $F_{\text{Ref}}$  = Faktor, abh. von  $D1$ -Zeit der Referenz,  $nH_{\text{Sub}}$  = Anzahl Protonen des verw. Referenz-Integrals.

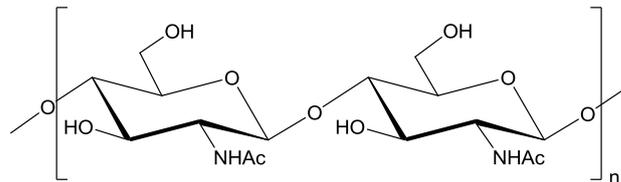
Zur Bestimmung des  $D1_{\max}$ -Wertes wurden zunächst sowohl von der Probe mit unbekannter Konzentration sowie von einer Sucrose-Probe der Konzentration 350 mM mehrere  $^1\text{H}$ -Spektren (zgesgp, 512 Scans, RG = 203) mit D1-Zeiten von 0.5, 1, 2, 3.5, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 s aufgenommen. Bei der Sucrose-Probe wurden vom Signal des anomeren Protons bei 5.360 ppm die Integrale gemessen und gegen die D1-Zeiten aufgetragen. Bei der Probe unbekannter Konzentration wurde ein isoliertes Signal ausgewählt und ebenso verfahren. Dabei waren eine gute Phasen- sowie Basislinienkorrektur äußerst wichtig, um aussagekräftige Integralwerte zu erhalten. Durch Anpassung an die exponentielle Gleichung (12) ließ sich jeweils aus  $y_0$  der  $D1_{\max}$ -Wert ablesen, sodass die Konzentration nach Gleichung (11) berechnet werden konnte.

$$y = A \cdot e^{\frac{-x}{t_1}} + y_0 \quad (12)$$

### 7.3 Darstellung der $N_\gamma$ -Chitobiosylasparaginbausteine

Die Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, in kommerziell erhältlichen, absolutierten Lösungsmitteln durchgeführt.

#### 7.3.1 Darstellung von kolloidalem Chitin (2)

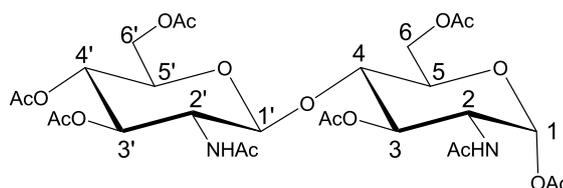


Basierend auf der Vorschrift von Nishimura *et al.*<sup>158</sup> wurden 51 g Chitinflakes in 350 mL konz. Salzsäure (37%) suspendiert und 45 min im Ultraschallbad sonifiziert. Alle 15 min wurde das Reaktionsgemisch durchmischt. Anschließend wurde das Gemisch auf 2 L Eiswasser gegeben und für 48 h bei 4 °C gelagert. Der Niederschlag wurde filtriert, mit 1 M Natronlauge neutralisiert und mit ddH<sub>2</sub>O, Aceton sowie Diethylether gewaschen. Nach Gefriertrocknung wurde der erhaltene Feststoff gesiebt, um größere Chitinreste abzutrennen.

**Ausbeute:** Es wurden 39.8 g eines beigefarbenen, amorphen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 78 Gew-% bezogen auf die eingesetzte Menge Chitinflakes.

**Charakterisierung:** Auf eine Charakterisierung des Polymers wurde verzichtet.

### 7.3.2 Synthese von Chitbioseoctaacetat (3)



Basierend auf der Vorschrift von Nishimura *et al.*<sup>158</sup> wurden 37.74 g (entspricht 92.9 mmol Dimereinheiten) kolloidales Chitin (**2**) bei einer Innentemperatur von 54 °C unter Rühren zu einem Gemisch aus 500 mL Essigsäureanhydrid und 50 mL konz. Schwefelsäure (97%) gegeben. Dabei stieg die Temperatur auf 60 °C an. Nach 3 h Rühren bei 55 °C wurde die weinrote Lösung auf 35 °C abgekühlt und weitere 68 h bei dieser Temperatur gerührt.

Nach Abkühlen auf Rt wurde die Reaktionslösung zu 250 g Natriumacetat in 1 L Eiswasser gegeben und für 2 h gerührt. Anschließend wurde das Produkt mehrfach mit Chloroform extrahiert und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung sowie ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel größtenteils entfernt. Das reine Produkt wurde durch Säulenfiltration über Kieselgel (Chloroform/Methanol 60:1 bis 20:1 (v/v)) und anschließende Umkristallisation aus Ethanol erhalten.

**Ausbeute:** Es wurden 3.33 g (4.92 mmol) eines farblosen, kristallinen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 5.3% bezogen auf die theoretisch möglichen Dimereinheiten von (**2**).

#### Charakterisierung:

*Farbloser Feststoff*

IUPAC-Name: 2-Acetamido-1,3,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-4-*O*-(2'-acetamido-3',4',6'-tri-*O*-acetyl-2'-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-α-D-glucopyranose

Summenformel: C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>

Molmasse: 676.63 g/mol

Drehwert:  $[\alpha]_{589}^{24} = +289^\circ$  (c = 0.10, CHCl<sub>3</sub>)

Rf-Wert: R<sub>f</sub> = 0.44 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 9:1)

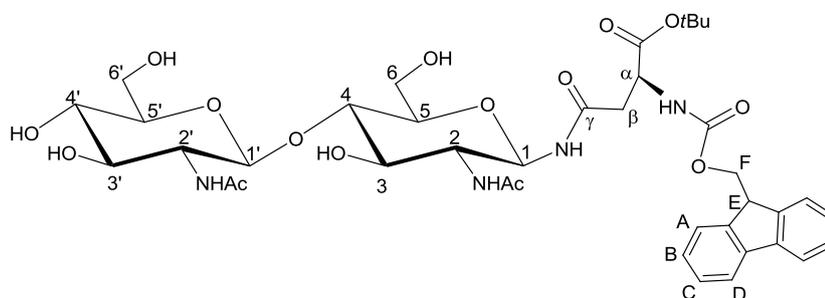
HR-ESI-MS: m/z = 677.2405 [M+H]<sup>+</sup> (gef.), 677.2400 (ber.); 699.2226 [M+Na]<sup>+</sup> (gef.), 699.2219 (ber.)

<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 6.10 (*d*, 1H, <sup>3</sup>*J* = 3.6 Hz, **H1**), 5.99 (*d*, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.2 Hz, **NH'**), 5.63 (*d*, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.1 Hz, **NH**), 5.22 (*dd*, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 11.1 Hz, **H3**), 5.13 (*dd* (app. *t*), 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 9.8 Hz, **H3'**), 5.06 (*dd* (app. *t*), 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.5 Hz, <sup>3</sup>*J* = 9.5 Hz, **H4'**), 4.48-4.32 (*m*, 4H,

**H6a'**, **H2**, **H6a**, **H1'**), 4.18 (*dd*, 1H,  $^3J = 2.0$  Hz,  $^2J = 12.2$  Hz, **H6b**), 4.05-3.92 (*m*, 2H, **H6b'**, **H2'**), 3.89 (*ddd*, 1H,  $^3J = 2.1$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz,  $^3J = 10.1$  Hz, **H5**), 3.73 (*dd* (app. *t*), 1H,  $^3J = 9.5$  Hz,  $^3J = 9.5$  Hz, **H4**), 3.62 (*ddd*, 1H,  $^3J = 2.3$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz,  $^3J = 9.6$  Hz, **H5'**), 2.19, 2.15, 2.08, 2.05, 2.01, 2.01 (6 x *s*, 18H, C(O)CH<sub>3</sub>), 1.96, 1.93 (2 x *s*, 6H, NH-C(O)CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 197.1, 171.6, 171.0, 170.7 (C(O)CH<sub>3</sub>), 170.5, 170.3 (NH-C(O)CH<sub>3</sub>), 169.5, 169.0 (C(O)CH<sub>3</sub>), 101.9 (C1'), 90.7 (C1), 76.1 (C4), 72.7 (C3'), 72.1 (C5'), 70.9 (C5), 70.8 (C3), 68.0 (C4'), 61.8 (C6'), 61.6 (C6), 54.6 (C2'), 51.3 (C2), 23.3, 23.2 (NH-C(O)CH<sub>3</sub>), 21.2, 21.1, 20.8, 20.8, 20.7 (C(O)CH<sub>3</sub>).

### 7.3.3 Synthese des *t*-Butyl-geschützten N<sub>γ</sub>-Chitobiosylasparaginbausteins (7)



Basierend auf der Vorschrift von J. Tost<sup>65</sup> wurden unter Stickstoffatmosphäre 555.0 mg (1.311 mmol) **(5)** in 15 mL DMF gelöst und auf -12 °C gekühlt. Weiterhin wurden 1.2 Äq. (500.4 mg, 1.558 mmol) TBTU, 0.7 Äq. (150 µL, 882 µmol) DIPEA und 0.9 Äq. (477.8 mg, 1.161 mmol) Fmoc-L-Asp-OtBu in 5.0 mL DMF gelöst. Nach 10 min Aktivierungszeit wurde diese Lösung zur gekühlten Amin-Lösung zugegeben und für 6.5 h bei -14 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt entweder direkt weiter zu **(9)** umgesetzt (Variante 1) oder mehrfach in MeOH sonifiziert und filtriert. Der unlösliche Rückstand gab das reine Produkt (Variante 2).

**Ausbeute:** Es wurden 551.7 mg (675.4 µmol) eines farblosen, amorphen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 58% bezogen auf die eingesetzte Menge Aminosäure.

#### Charakterisierung:

*Farbloser Feststoff*

**IUPAC-Name:** O<sub>α</sub>-*t*Butyl-N<sub>α</sub>-(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N<sub>γ</sub>-[2-acetamido-2-desoxy-4-O-(2'-acetamido-2'-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-asparagin

**Summenformel:** C<sub>39</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>

**Molmasse:** 816.85 g/mol

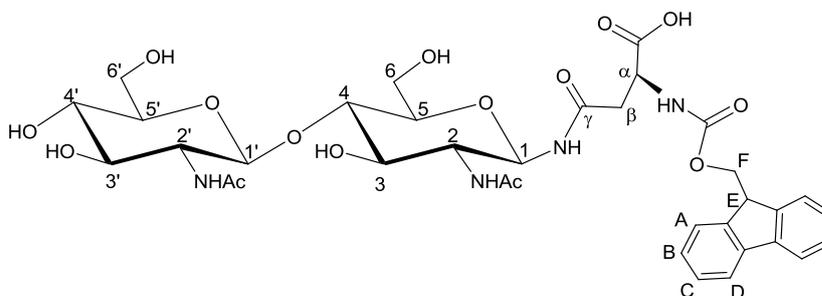
Drehwert:  $[\alpha]_{589}^{24} = +51^\circ$  ( $c = 0.05$ , DMSO)

HR-ESI-MS:  $m/z = 817.3520$   $[M+H]^+$  (gef.), 817.3502 (ber.)

$^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.22 (*d*, 1H,  $^3J = 8.8$  Hz,  $\text{NH}\gamma$ ), 7.89 (*d*, 2H,  $^3J = 7.1$  Hz,  $\text{HA/HD}$ ), 7.85 (*d*, 1H,  $^3J = 8.8$  Hz,  $\text{NHAc}$ ), 7.74-7.68 (*m*, 3H,  $\text{NHAc}'$ ,  $\text{HA/HD}$ ), 7.46 (*d*, 1H,  $\text{NH}\alpha$ ,  $^3J = 8.4$  Hz), 7.42 (*t*, 2H,  $^3J = 7.2$  Hz,  $\text{HC}$ ), 7.32 (*t*, 2H,  $^3J = 7.2$  Hz,  $\text{HB}$ ), 4.83 (*dd* (app. *t*), 1H,  $^3J = 9.2$  Hz,  $^3J = 9.2$  Hz,  $\text{H1}$ ), 4.36 (*d*, 1H,  $\text{H1}'$ ,  $^3J = 8.4$  Hz), 4.33-4.18 (*m*, 4H,  $\text{H}\alpha$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{HE}$ ), 3.78-3.70 (*m*, 1H,  $\text{H6a}'$ ), 3.64-3.55 (*m*, 2H,  $\text{H6a}$ ,  $\text{H2}$ ), 3.52-3.40 (*m*, 3H,  $\text{H6b}$ ,  $\text{H6b}'$ ,  $\text{H2}'$ ), 3.07-3.00 (*m*, 1H,  $\text{H5}'$ ), 2.58 (*dd*, 1H,  $^3J = 4.9$  Hz,  $^3J = 16.2$  Hz,  $\text{H}\beta$ ), 2.45 (*dd*, 1H,  $^3J = 7.4$  Hz,  $^3J = 15.7$  Hz,  $\text{H}\beta'$ ), 1.82 (*s*, 3H,  $\text{NH-C(O)CH}_3'$ ), 1.76 (*s*, 3H,  $\text{NH-C(O)CH}_3$ ),  $\text{H3}$ ,  $\text{H4}$ ,  $\text{H5}$ ,  $\text{H3}'$ ,  $\text{H4}'$  konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

$^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.6 ( $\text{COO}^t\text{Bu}$ ) 169.6 ( $\text{C(O)CH}_3$ ), 169.5 ( $\text{C}\gamma$ ), 169.2 ( $\text{C(O)CH}_3'$ ), 155.8 ( $\text{C(O)-OFmoc}$ ), 143.8 ( $\text{CG}$ ), 140.7 ( $\text{CH}$ ), 127.7 ( $\text{CC}$ ), 127.1 ( $\text{CB}$ ), 125.2 ( $\text{CA/D}$ ), 120.1 ( $\text{CA/D}$ ), 102.1 ( $\text{C1}'$ ), 81.4 ( $\text{C4}$ ), 80.7 ( $\text{C(CH}_3)_3$ ) 78.8 ( $\text{C1}$ ), 77.0, 76.7, 74.0, 72.9 ( $\text{C3}$ ,  $\text{C5}$ ,  $\text{C3}'$ ,  $\text{C4}'$ ), 70.7 ( $\text{C5}'$ ), 65.7 ( $\text{CF}$ ), 61.0 ( $\text{C6}'$ ), 59.9 ( $\text{C6}$ ), 55.5 ( $\text{C2}'$ ), 53.8 ( $\text{C2}$ ), 50.8 ( $\text{C}\alpha$ ), 46.6 ( $\text{CE}$ ), 37.0 ( $\text{C}\beta$ ), 27.6 ( $\text{C(CH}_3)_3$ ) 23.0 ( $\text{NH-C(O)CH}_3'$ ), 22.8 ( $\text{NH-C(O)CH}_3$ ).

### 7.3.4 Synthese des $N_\gamma$ -Chitobiosylasparaginbausteins (**9**)



Analog zur Vorschrift von J. Tost<sup>65</sup> wurden 544.0 mg (666.0  $\mu\text{mol}$ ) (**7**) mit 10.5 mL TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (19:1) versetzt und für 15 min gerührt. Anschließend wurde das TFA im Vakuum entfernt und mehrfach mit Toluol codestilliert. Zuletzt wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Falls das Edukt als Rohprodukt (7.3.3, Variante 1) eingesetzt wurde, erfolgte eine Säulenfiltration über Kieselgel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} + 1\%$  HOAc 4:1 bis 1:1). Lag das Edukt bereits rein vor (7.3.3, Variante 2), war keine weitere Reinigung nötig.

**Ausbeute:** Es wurden 533 mg (701  $\mu\text{mol}$ ) eines farblosen, amorphen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer quantitativen Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge (**7**).

**Charakterisierung:***Farbloser Feststoff*

**IUPAC-Name:**  $N_{\alpha}$ -(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- $N_{\gamma}$ -[2-acetamido-2-desoxy-4-*O*-(2'-acetamido-2'-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-asparagin

**Summenformel:**  $C_{35}H_{44}N_4O_{15}$

**Molmasse:** 760.28 g/mol

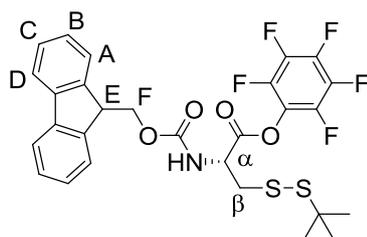
**Drehwert:**  $[\alpha]_{589}^{24} = +29^{\circ}$  ( $c = 0.11$ , DMSO)

**Rf-Wert:**  $R_f = 0.3$  ( $CHCl_3/MeOH + 1\% HOAc$  2:1)

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 761.2875$   $[M+H]^+$  (gef.), 761.2876 (ber.); 783.2668  $[M+Na]^+$  (gef.), 783.2695 (ber.)

**$^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 12.58 (bs, 1H, COOH), 8.21 (*d*, 1H,  $^3J = 8.9$  Hz, NH $\gamma$ ), 7.89 (*d*, 2H,  $^3J = 7.1$  Hz, HA/HD), 7.84 (*d*, 1H,  $^3J = 8.9$  Hz, NHAc), 7.74-7.67 (*m*, 3H, NHAc', HA/HD), 7.45-7.42 (*m*, 1H, NH $\alpha$ ), 7.42 (*t*, 2H,  $^3J = 7.6$  Hz, HB/HC), 7.32 (*t*, 2H,  $^3J = 7.6$  Hz, HB/HC), 4.84 (*dd* (app. *t*), 1H,  $^3J = 9.4$  Hz,  $^3J = 9.4$  Hz, H1), 4.39-4.33 (*m*, 2H, H1', H $\alpha$ ), 4.30-4.17 (*m*, 3H, HF, HE), 3.78-3.71 (*m*, 1H, H6a'), 3.64-3.54 (*m*, 2H, H6a, H2), 3.52-3.40 (*m*, 2H, H6b, H2'), 3.07-3.00 (*m*, 1H, H5'), 2.62 (*dd*, 1H,  $^3J = 5.0$  Hz,  $^3J = 16.3$  Hz, H $\beta$ ), 1.82 (*s*, 3H, NH-C(O)CH $_3$ '), 1.76 (*s*, 3H, NH-C(O)CH $_3$ ), H $\beta$ ' liegt unter dem DMSO-Signal, H3, H4, H5, H3', H4' konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

**$^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 173.0 (COOH) 169.7 (C(O)CH $_3$ ), 169.7 (C $\gamma$ ), 169.3 (C(O)CH $_3$ '), 155.9 (C(O)-OFmoc), 143.8 (CG), 140.7 (CH), 127.6 (CB/C), 127.1 (CB/C), 125.3 (CA/D), 120.2 (CA/D), 102.1 (C1'), 81.4 (C4), 78.8 (C1), 77.0, 76.8, 74.0, 72.9 (C3, C5, C3', C4'), 70.7 (C5'), 65.8 (CF), 61.1 (C6'), 59.9 (C6), 55.5 (C2'), 53.8 (C2), 50.1 (C $\alpha$ ), 46.6 (CE), 36.9 (C $\beta$ ), 23.1 (NH-C(O)CH $_3$ '), 22.8 (NH-C(O)CH $_3$ ).

**7.4 Synthese von Fmoc-L-Cys(StBu)-OPfp (16)**

**Variante 1:**

Analog zu einer anderen Synthese von Twibanire *et al.*<sup>167</sup> wurden unter Stickstoffatmosphäre 200.6 mg (464.8  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-L-Cys(StBu)-OH in 1.2 mL DMF (*peptide grade*) gelöst und mit 1 Äq. (151.2 mg, 470.9  $\mu\text{mol}$ ) TBTU und 2 Äq. (158  $\mu\text{L}$ , 120 mg 928  $\mu\text{mol}$ ) DIPEA versetzt. Die Lösung wurde für 15 min bei Rt gerührt, wobei sie sich über gelb nach orange färbte. Anschließend wurde 1 Äq. (48.5  $\mu\text{L}$ , 85.2 mg, 463  $\mu\text{mol}$ ) Pentafluorphenol, gelöst in 0.4 mL DMF, zugegeben und weitere 3 h bei Rt gerührt. Nach Zugabe von 10 mL DCM wurde mit 5%iger HCl, 1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. sowie  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Toluol/Aceton 19:1) gereinigt, aber massenspektrometrisch konnte kein Produkt nachgewiesen werden.

**Variante 2:**

Analog zu einer ähnlichen Synthese von Geiermann *et al.*<sup>168</sup> wurden 200.5 mg (465  $\mu\text{mol}$ ) Fmoc-L-Cys(StBu)-OH in 10.0 mL abs. DCM gelöst und mit 1.1 Äq. (54.0  $\mu\text{L}$ , 94.2 mg, 512  $\mu\text{mol}$ ) Pentafluorphenol, 1.2 Äq. (88  $\mu\text{L}$ , 70.4 mg, 558  $\mu\text{mol}$ ) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid und 0.2 Äq. (11.5 mg, 94.1  $\mu\text{mol}$ ) 4-(Dimethylamino)pyridin versetzt. Die Lösung wurde für 18 h bei Rt gerührt, anschließend mit 20 mL DCM versetzt und mit 10%iger HCl, halbges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. sowie ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mehrfach mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Toluol/Aceton, 19:1) gereinigt. Die Lagerung erfolgte bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Ausbeute:** Es wurden 186.1 mg (311.4  $\mu\text{mol}$ ) eines gelblichen, hochviskosen Sirups erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 67% bezogen auf die eingesetzte Menge AS.

**Charakterisierung:**

*Gelblicher hochviskoser Sirup*

IUPAC-Name: *S*-*t*Butylthio- $N_\alpha$ -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- $O_\alpha$ -pentafluorphenyl-L-cystein

Summenformel:  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_5\text{NO}_4\text{S}_2$

Molmasse: 597.62 g/mol

Rf-Wert:  $R_f = 0.76$  (Toluol/Aceton, 19:1)

HR-ESI-MS:  $m/z = 620.0953$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> (gef.), 620.0959 (ber.)

$^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.77 (d, 2H,  $^3J = 7.7$  Hz, HA/HD), 7.61 (d, 2H,  $^3J = 7.5$  Hz, HA/HD), 7.40 (t, 2H,  $^3J = 7.5$  Hz, HB/HC), 7.31 (t, 2H,  $^3J = 7.5$  Hz, HB/HC), 5.71 (d, 1H,  $^3J = 8.2$  Hz, NH), 5.08-5.01 (m, 1H, H $\alpha$ ), 4.45 (d, 2H,  $^3J = 7.3$  Hz, HF), 4.27 (t, 1H,  $^3J = 6.9$  Hz, HE),

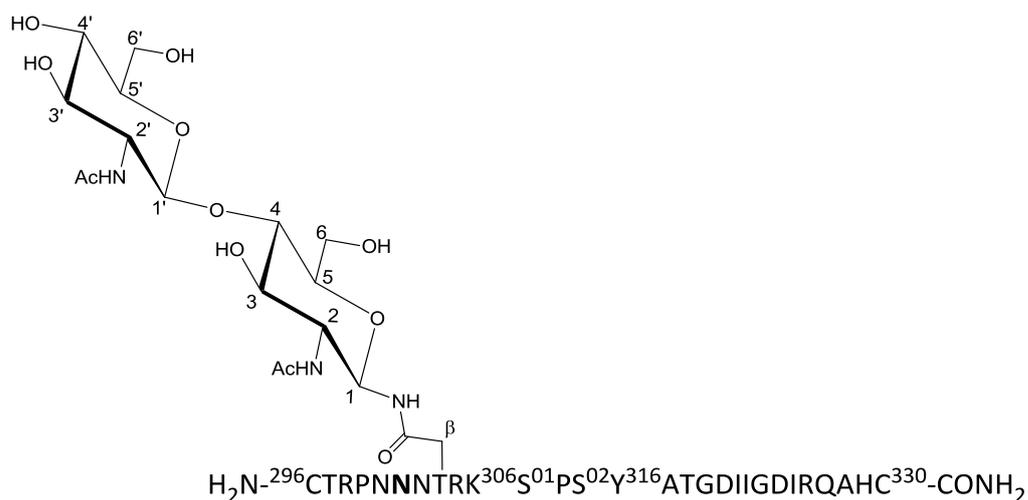
3.36 (dd, 1H,  $^3J = 4.2$  Hz,  $^3J = 13.7$  Hz, **H $\beta$** ), 3.26 (dd, 1H,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^3J = 13.3$  Hz, **H $\beta$** ), 1.37 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 167.2 (C(O)-OPfp), 157.1 (Pfp), 155.9 (C(O)-OFmoc), 143.8 (CG/H), 141.5 (CG/H), 129.2, 128.4, 125.4 (Pfp), 127.9 (CB/C), 127.3 (CB/C), 125.3 (CA/D), 120.2 (CA/D), 67.7 (CF), 53.9 (C $\alpha$ ), 48.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.2 (CE), 41.9 (C $\beta$ ), 29.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = -151.5 (d, 2F,  $^3J = 18.4$  Hz, F<sub>ortho</sub>), -156.9 (dd (app. t), 1F,  $^3J = 21.9$  Hz, F<sub>para</sub>), -161.7 (dd (app. t), 2F,  $^3J = 19.2$  Hz, F<sub>meta</sub>)

## 7.5 Synthese und Charakterisierung der Peptide und Glycopeptide

### 7.5.1 Darstellung des offenkettigen V3-Glycopeptids P2



#### Variante 1:

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 50.5  $\mu$ mol nach AAV1 bis zur Glycosylierungsstelle N301 synthetisiert. Die Rohausbeute wurde mittels Fmoc-Monitoring nach AAV3 bestimmt (23.2  $\mu$ mol, 46%). Die nachfolgende Bausteinkupplung wurde auf 25  $\mu$ mol bezogen und zweifach unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Dazu wurden je 1.5 Äq. TBTU (12.5 mg, 38.9  $\mu$ mol) und DIPEA (6.2  $\mu$ L, 4.68 mg, 36.2  $\mu$ mol) sowie 1 Äq. (24.4 mg, 25.1  $\mu$ mol) Baustein (**8**) in jeweils 0.5 mL DMF gelöst. Die Lösungen von TBTU und DIPEA wurden zusammen gegeben und dann zur Baustein-Lösung pipettiert. Die gesamte Lösung wurde schließlich zum Harz gegeben und der Ansatz für 24 h bei 40 °C geschüttelt. Nach allen Arbeitsschritten wurde mehrmals mit DMF gewaschen. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden mittels Essigsäureanhydrid *gcappt* und die letzten fünf AS wieder nach AAV1 gekuppelt. Schließlich wurde das Peptid nach AAV5 Variante 1 vom Harz

abgespalten, nach AAV7 deacetyliert und nach AAV11 und AAV12 gereinigt. Die Charakterisierung erfolgte nach AAV14 und AAV16 mittels ESI-MS und NMR.<sup>65</sup>

**Ausbeute:** Es wurden 8.9 mg (2.4  $\mu\text{mol}$ ) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 5% bezogen auf die Ansatzgröße von 50.5  $\mu\text{mol}$ .

### **Variante 2:**

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 98.5  $\mu\text{mol}$  nach AAV1 bis zur Glycosylierungsstelle N301 synthetisiert und in zwei Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde weiter verwendet und eine Rohausbeute mittels Fmoc-Monitoring nach AAV3 bestimmt (20.6  $\mu\text{mol}$ , 42%). Die andere Hälfte wurde nach Variante 3 (s.u.) weiter umgesetzt. Die Bausteinkupplung wurde auf 21  $\mu\text{mol}$  bezogen und zweifach unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Dazu wurden je 1.5 Äq. TBTU (10.6 mg, 33.0  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (5.32  $\mu\text{L}$ , 4.05 mg, 31.3  $\mu\text{mol}$ ) sowie 1 Äq. (21.1 mg, 21.7  $\mu\text{mol}$ ) Baustein (**8**) in jeweils 0.4 mL DMF gelöst und zum Harz gegeben. Der Ansatz wurde für 24 h bei 50 °C geschüttelt. Nach allen Arbeitsschritten wurde mehrmals mit DMF gewaschen. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden mittels Essigsäureanhydrid *gecappt* und die letzten fünf AS manuell nach AAV2 gekuppelt. Die Deacetylierung der saccharidischen Hydroxylgruppen erfolgte nach AAV6 und die Abspaltung des Peptids vom Harz nach AAV5 Variante 1. Zuletzt wurde das Peptid nach AAV11 und AAV12 gereinigt und mittels ESI-MS und NMR nach AAV14 und AAV16 charakterisiert.<sup>65</sup>

**Ausbeute:** Es wurden 4.6 mg (1.3  $\mu\text{mol}$ ) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 2.5% bezogen auf die halbe Ansatzgröße von 98.5  $\mu\text{mol}$ .

### **Variante 3:**

Die andere Hälfte des geteilten Ansatzes aus Variante 2 ergab mittels Fmoc-Monitoring nach AAV3 eine Rohausbeute von 40% (19.6  $\mu\text{mol}$ ). Die Bausteinkupplung wurde auf 20  $\mu\text{mol}$  bezogen. Dazu wurden 2.5 Äq. (19.2 mg, 50.0  $\mu\text{mol}$ ) HATU und 5 Äq. (11.0  $\mu\text{L}$ , 12.9 mg, 100.1  $\mu\text{mol}$ ) NMM sowie 1 Äq. (39.3 mg, 40.5  $\mu\text{mol}$ ) Baustein (**8**) in jeweils 0.4 mL NMP gelöst. Das Harz wurde mit 0.6 mL NMP in einen Kolben überführt und mit den Lösungen versetzt. Außerdem wurden noch 5 Äq. (169.0  $\mu\text{L}$ , 100.2  $\mu\text{mol}$ ) HOAt/DMF (593 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde zweifach für 15 min bei 18 W und 50 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Zwischen und nach den Bausteinkupplungen wurde das Harz wieder in eine Fritte überführt und mehrmals mit DMF und DCM gewaschen. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden mittels Essigsäureanhydrid *gecappt* und die letzten fünf AS manuell nach AAV2

gekuppelt. Dabei wurde der Fmoc-Entschützungsprozess nach der Bausteinkupplung vergessen, weshalb das erhaltene Peptid nicht **P2** entspricht sondern dem Deletionspeptid (**13**). Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte nach AAV5 Variante 1 und die Deacetylierung der saccharidischen Hydroxylgruppen nach AAV7. Zuletzt wurde das Peptid nach AAV11 und AAV12 gereinigt und mittels ESI-MS und NMR nach AAV14 und AAV16 charakterisiert (s. Anhang 10.7).<sup>65,165</sup>

**Ausbeute:** Es wurden 4.3 mg (1.2  $\mu\text{mol}$ ) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 2.4% bezogen auf die halbe Ansatzgröße von 98.5  $\mu\text{mol}$ . Es handelt sich allerdings um das Deletionspeptid (**13**), nicht um **P2**.

#### **Variante 4:**

Die manuelle Peptidsynthese bis zur Glycosylierungsstelle N301 wurde mit einer Ansatzgröße von 300  $\mu\text{mol}$  unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zwischen sämtlichen Arbeitsschritten wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF gewaschen. Das Harz wurde über Nacht in DMF gequollen. Die Fmoc-Gruppe wurde durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für 8 min bei 60 °C abgespalten. Etwa nach jeder fünften Kupplung wurde die Rohausbeute über Fmoc-Monitoring (AAV3) bestimmt und die Menge der Reagenzien entsprechend angepasst. Die Aminosäuren wurden jeweils für 20 min bei 60 °C dreifach gekuppelt. Cystein, und Histidin wurden bei nur 50 °C und Arginin für 60 min bei Rt gekuppelt. Dabei wurde die jeweilige Aminosäure im vierfachen (0.4 M in DMF) und Aktivator (0.5 M in DMF) und DIPEA (1 M in DMF) im fünffachen Überschuss eingesetzt. Für die Kupplung der ersten Aminosäure an das Harz diente HATU als Aktivator, für alle anderen Kupplungen wurde TBTU verwendet. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden bis zur Glycosylierungsstelle durch achtminütiges Versetzen mit 1.5 mL 10%iger (v/v) Acetanhydridlösung in DMF bei 60 °C acetyliert. Bei der terminalen Fmoc-Abspaltung ergab sich eine Ausbeute von 5% (15  $\mu\text{mol}$ ) im Fmoc-Monitoring.

Die Äquivalente zur Kupplung des ungeschützten Glycosylbausteins wurden auf 30  $\mu\text{mol}$  bezogen. Dazu wurden 3 Äq. (26.8 mg, 89.6  $\mu\text{mol}$ ) DEPBT in 250  $\mu\text{L}$  NMP gelöst und mit 1.5 Äq. (7.7  $\mu\text{L}$ , 5.8 mg, 45  $\mu\text{mol}$ ) DIPEA versetzt. Diese Lösung wurde zu 2 Äq. (46.0 mg, 60.5  $\mu\text{mol}$ ) Baustein (**9**) in 1.5 mL NMP gegeben und die gesamte Lösung zum Harz pipettiert. Der Ansatz wurde zweimal für 24 h bei 35 °C geschüttelt. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden nach AAV4 blockiert.

Die restlichen fünf Aminosäuren wurden gekuppelt indem jeweils 5 Äq. Aminosäure in 1 mL DMF gelöst wurden und zusammen mit je 5 Äq. DIC und HOAt/DMF (593 mM) zum Harz

gegeben wurden. Die Kupplung erfolgte zweifach bei 60 °C für 45 min bzw. bei Arg für 1 h bei Rt. Die Fmoc-Entschützung wurde ebenso wie vor der Bausteinkupplung durchgeführt und das *Capping* erfolgte nach AAV4. Nach Synthese des vollständigen Peptids wurde der Ansatz geteilt und das Peptid wurde sowohl nach AAV5 Variante 2 als auch nach Variante 3 vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgte für beide erhaltenen Peptide erst über eine präparative und zur weiteren Reinigung noch über eine semipräparative RP-Säule nach AAV11 und AAV12. Die Charakterisierung wurde nach AAV13, AAV14 und AAV16 durchgeführt.<sup>103,123,124,166</sup>

**Ausbeute:** Bei der Abspaltung nach AAV5 Variante 2 wurden 3.0 mg (0.82 µmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 0.6% bezogen auf die halbe Ansatzgröße von 300 µmol. Bei der Abspaltung nach AAV5 Variante 3 wurden 1.2 mg (0.33 µmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 0.2% bezogen auf die halbe Ansatzgröße von 300 µmol.

#### **Variante 5:**

Die manuelle Peptidsynthese bis zur Glycosylierungsstelle N301 wurde mit einer Ansatzgröße von 100 µmol unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Das Harz wurde für 72 h in DMF gequollen. Die Fmoc-Gruppe wurde durch zweimaliges Versetzen des Harzes mit 4 mL Piperidin/DMF (1:4) für 8 min bei 65 °C abgespalten. Etwa nach jeder fünften Kupplung wurde die Rohausbeute über *Fmoc-Monitoring* (AAV3) bestimmt. Die Aminosäuren wurden jeweils für 20 min bei 65 °C zweifach gekuppelt. Cystein, und Histidin wurden bei nur 50 °C für 30 min und Arginin für 60 min bei Rt gekuppelt. Dabei wurde die jeweilige Aminosäure im vierfachen (0.4 M in DMF) und Aktivator (0.5 M in DMF) und DIPEA (1 M in DMF) im fünffachen Überschuss eingesetzt. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden bis zur Glycosylierungsstelle durch achtminütiges Versetzen mit 2 mL 10% (v/v) Acetanhydrid in DMF bei 65 °C acetyliert. Bei der terminalen Fmoc-Abspaltung ergab sich eine Ausbeute von 22% (22 µmol) im *Fmoc-Monitoring*.

Die Äquivalente zur Kupplung des ungeschützten Glycosylbausteins wurden auf 25 µmol bezogen. Dazu wurden 3 Äq. (22.7 mg, 75.9 µmol) DEPBT in 250 µL NMP gelöst und mit 1.5 Äq. (6.4 µL, 4.9 mg, 38 µmol) DIPEA in 244 µL DMF versetzt. Diese Lösung wurde zu 2 Äq. (38.2 mg, 50.2 µmol) Baustein (**9**) in 1.5 mL NMP gegeben und die gesamte Lösung zum Harz pipettiert. Der Ansatz wurde zweimal für 24 h bei 50 °C geschüttelt. Nicht umgesetzte Aminofunktionen wurden nach AAV4 blockiert.

Die restlichen fünf Aminosäuren wurden gekuppelt, indem jeweils 5 Äq. Aminosäure-Pfp-Ester in 2 mL NMP gelöst zum Harz gegeben wurden. Die Kupplung erfolgte zweifach bei 65 °C für 30 min bzw. bei Arg für 1 h bei Rt. Die Fmoc-Entschützung wurde ebenso wie vor der Bausteinkupplung durchgeführt und das *Capping* erfolgte nach AAV4. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF gewaschen. Nach Synthese des vermeintlich vollständigen Peptids wurde der Ansatz geteilt und das Peptid wurde sowohl nach AAV5 Variante 2 als auch nach Variante 3 vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgte für beide erhaltenen Peptide nach AAV11 und AAV12. Das gewünschte Peptid **P2** konnte weder mittels MALDI-MS oder ESI-MS nach AAV13 bzw. AAV14 noch über NMR nach AAV16 nachgewiesen werden.<sup>103,121-124,166</sup>

**Ausbeute:** Das Produkt konnte nicht mittels MALDI-MS, ESI-MS oder NMR nachgewiesen werden.

### Charakterisierung:

*Farbloser Feststoff*

Summenformel: C<sub>150</sub>H<sub>249</sub>N<sub>47</sub>O<sub>52</sub>S<sub>4</sub>

Molmasse: 3671.13 g/mol

Retentionszeit: 7.6 min (21% Laufmittel B)

HR-ESI-MS: m/z = 1223.9152 [M+3H]<sup>3+</sup> (gef.), 1223.9129 (ber.); 918.1884 [M+4H]<sup>4+</sup> (gef.), 918.1865 (ber.); 734.7528 [M+5H]<sup>5+</sup> (gef.), 734.7506 (ber.); 612.4621 [M+6H]<sup>6+</sup> (gef.), 612.4601 (ber.)

**Tabelle 15:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebung [ppm] von **P2** in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), pH 1.9. Das Spektrum wurde bei 300 K an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.746 ppm kalibriert. Die <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

	NH ( <sup>3</sup> J <sub>NH<math>\alpha</math></sub> )	H $\alpha$	H $\beta$	H $\beta'$	H $\gamma$	H $\gamma'$	H $\delta$	H $\delta'$	Sonstige
<b>C</b> <sub>296</sub>	-	4.326	3.230	3.197	-	-	-	-	StBu: 1.257
<b>T</b> <sub>297</sub>	8.721 (8.5)	4.380	4.047	-	1.145	-	-	-	-
<b>R</b> <sub>298</sub>	8.500 (6.8)	4.544	1.792	1.792	1.662	1.662	3.146	3.181	He: 7.156
<b>P</b> <sub>299</sub>	-	4.363	2.237	2.237	1.966	1.858	3.773	3.589	-
<b>N</b> <sub>300</sub>	8.458 (6.8)	4.597	2.768	2.727	-	-	7.577	6.883	-
<b>N</b> <sub>301</sub>	8.467 (7.1)	4.661	2.775	2.723	-	-	8.586	-	-
<b>N</b> <sub>302</sub>	8.393 (6.3)	4.678	2.790	2.715	-	-	7.525	6.858	-
<b>T</b> <sub>303</sub>	8.045 (8.6)	4.213	4.150	-	1.145	-	-	-	-
<b>R</b> <sub>304</sub>	8.251 (7.3)	4.249	1.776	1.695	1.575	1.529	3.125	3.125	He: 7.141

<b>K<sub>305</sub></b>	8.383 (7.4)	4.265	1.739	1.650	1.347	1.347	1.585	1.585	Hε: 2.911, Hζ: 7.446
<b>S<sub>306</sub></b>	8.329 (4.5)	4.668	3.795	3.768	-	-	-	-	-
<b>P<sub>01</sub></b>	-	4.358	2.170	1.935	1.692	1.742	3.659	3.767	-
<b>S<sub>02</sub></b>	8.225 (8.7)	4.320	3.722	3.722	-	-	-	-	-
<b>Y<sub>316</sub></b>	8.016 (6.8)	4.522	3.019	2.886	-	-	7.052	7.052	Hε: 6.752
<b>A<sub>317</sub></b>	8.123 (7.8)	4.314	1.301	-	-	-	-	-	-
<b>T<sub>318</sub></b>	8.010 (8.8)	4.233	4.189	-	1.161	-	-	-	-
<b>G<sub>319</sub></b>	8.306 (6.5)	3.907	-	-	-	-	-	-	-
<b>D<sub>320</sub></b>	8.252 (7.2)	4.661	2.836	2.754	-	-	-	-	-
<b>I<sub>321</sub></b>	8.078 (8.9)	4.106	1.817	-	1.387	1.100	0.777	-	γ'': 0.795
<b>I<sub>322</sub></b>	8.151 (7.8)	4.060	1.795	-	1.413	1.134	0.783	-	γ'': 0.842
<b>G<sub>323</sub></b>	8.343 (6.6)	3.874	-	-	-	-	-	-	-
<b>D<sub>324</sub></b>	8.224 (7.6)	4.662	2.849	2.779	-	-	-	-	-
<b>I<sub>325</sub></b>	8.036 (8.2)	4.077	1.833	-	1.398	1.137	0.791	-	γ'': 0.829
<b>R<sub>326</sub></b>	8.311 (7.8)	4.251	1.773	1.700	1.586	1.531	3.129	3.129	Hε: 7.107
<b>Q<sub>327</sub></b>	8.212 (8.0)	4.234	2.020	1.894	2.294	2.294	-	-	Hε: 7.471*, 6.825*
<b>A<sub>328</sub></b>	8.253 (6.9)	4.186	1.282	-	-	-	-	-	-
<b>H<sub>329</sub></b>	8.457 (7.5)	4.649	3.231	3.150	-	-	7.242	-	Hζ: 8.550
<b>C<sub>330</sub></b>	8.348 (7.4)	4.551	3.116	2.947	-	-	-	-	*CONH <sub>2</sub> : 7.614, 7.156 StBu: 1.257

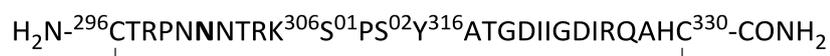
\*: Die Signale der Säureamidgruppen konnten nicht anhand von NOE-Kontakten validiert werden.

	NH ( <sup>3</sup> J)	NHAc ( <sup>3</sup> J)	1	2	3 / 4 / 5 <sup>§</sup>	6	NHAc
<b>GlcNAc</b>	8.586 (9.3)	8.154 (11.0)	4.962	3.784	3.679 / 3.575 / 3.480	*	1.943
<b>GlcNAc'</b>	-	8.335 (10.3)	4.521	3.687	3.865 / 3.505 / 3.425	*	1.997

\*Signale sind von anderen Protonen überlagert

§ Signale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden

## 7.5.2 Darstellung des zyklischen V3-Peptids P3



10.63 mg (3.26  $\mu\text{mol}$ ) des Peptids **P1** wurden nach AAV8 entschützt und nach AAV9 oxidiert. Anschließend wurde eine Ultrafiltration nach AAV10 mit dem Macrosep Ultrafiltrationsröhrchen durchgeführt, um die Lösung einzuengen, zu entsalzen und überschüssiges DTT abzutrennen. Da sich die ersten zwei Membranen der Röhrchen als defekt erwiesen, musste dieser Schritt insgesamt dreimal durchgeführt werden. Die Reinigung erfolgte erst über eine präparative RP-Säule (Nucleodur ISIS, Agilent HPLC) und dann in mehreren Läufen über eine analytische RP-Säule (Nucleodur ISIS, Merck HPLC) nach AAV12. Die Charakterisierung wurde mittels MALDI-MS und NMR nach AAV13 und AAV16 durchgeführt. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die Konzentration mit Hilfe von NMR nach AAV17 ermittelt.

**Ausbeute:** Es wurden 1.59 mg (514 nmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 16% bezogen auf die eingesetzte Menge **P1**.

**Charakterisierung:**

*Farbloser Feststoff*

Summenformel:  $\text{C}_{126}\text{H}_{205}\text{N}_{45}\text{O}_{42}\text{S}_2$

Molmasse: 3086.38 g/mol

Retentionszeit: 17.0 min (16% Laufmittel B)

MALDI-MS:  $m/z = 3085.411$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (gef.), 3085.4803 (ber.)

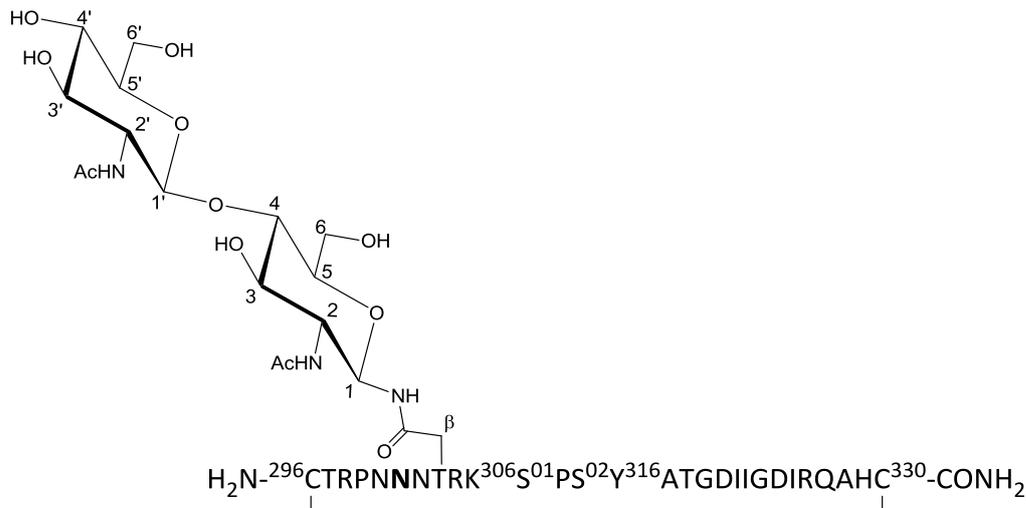
**Tabelle 16:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung [ppm] von **P3** in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 2.2. Das Spektrum wurde bei 300 K an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.746 ppm kalibriert. Die  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

	NH ( $^3\text{J}_{\text{NH}\alpha}$ )	H $\alpha$	H $\beta$	H $\beta'$	H $\gamma$	H $\gamma'$	H $\delta$	H $\delta'$	Sonstige
<b>C</b> <sub>296</sub>	-	4.409	3.293	3.150	-	-	-	-	-
<b>T</b> <sub>297</sub>	8.811 (7.8)	4.372	4.066	-	1.154	-	-	-	-
<b>R</b> <sub>298</sub>	8.524 (6.6)	4.556	1.785	1.611	1.684	1.596	3.152	3.152	He: 7.137
<b>P</b> <sub>299</sub>	-	4.349	2.209	1.843	1.941	1.941	3.753	3.587	-
<b>N</b> <sub>300</sub>	8.482 (7.5)	4.617	2.780	2.735	-	-	*	*	-
<b>N</b> <sub>301</sub>	8.400 (6.9)	4.650	2.787	2.715	-	-	*	*	-
<b>N</b> <sub>302</sub>	8.439 (6.7)	4.695	2.813	2.724	-	-	*	*	-

	NH ( $^3J_{\text{NH}\alpha}$ )	H $\alpha$	H $\beta$	H $\beta'$	H $\gamma$	H $\gamma'$	H $\delta$	H $\delta'$	Sonstige
<b>T</b> <sub>303</sub>	8.040 (8.2)	4.238	4.197	-	1.140	-	-	-	-
<b>R</b> <sub>304</sub>	8.201 (8.5)	4.227	1.788	1.576	1.703	1.529	3.122	3.122	H $\epsilon$ : 7.110
<b>K</b> <sub>305</sub>	8.221 (8.3)	4.257	1.745	1.660	1.335	1.335	1.580	1.580	H $\epsilon$ : 2.909, H $\zeta$ : 7.451
<b>S</b> <sub>306</sub>	8.207 (6.3)	4.686	3.787	3.787	-	-	-	-	-
<b>P</b> <sub>01</sub>	-	4.371	2.182	1.715	1.935	1.935	3.671	3.763	-
<b>S</b> <sub>02</sub>	8.184 (6.7)	4.318	3.725	3.725	-	-	-	-	-
<b>Y</b> <sub>316</sub>	7.957 (7.2)	4.507	3.020	2.913	-	-	7.050	7.050	H $\epsilon$ : 6.750
<b>A</b> <sub>317</sub>	8.088 (5.8)	4.309	1.302	-	-	-	-	-	-
<b>T</b> <sub>318</sub>	7.976 (6.9)	4.230	4.191	-	1.160	-	-	-	-
<b>G</b> <sub>319</sub>	8.304 (5.6)	3.946	-	-	-	-	-	-	H $\alpha'$ : 3.878
<b>D</b> <sub>320</sub>	8.231 (6.8)	4.652	2.821	2.733	-	-	-	-	-
<b>I</b> <sub>321</sub>	8.070 (9.2)	4.105	1.825	-	1.392	1.129	0.780	-	$\gamma''$ : 0.803
<b>I</b> <sub>322</sub>	8.141 (8.2)	4.052	1.800	-	1.417	1.104	0.786	-	$\gamma''$ : 0.841
<b>G</b> <sub>323</sub>	8.340 (5.3)	3.896	-	-	-	-	-	-	H $\alpha'$ : 3.844
<b>D</b> <sub>324</sub>	8.185 (6.8)	4.646	2.830	2.749	-	-	-	-	-
<b>I</b> <sub>325</sub>	8.052 (8.7)	4.075	1.861	-	1.401	1.147	0.801	-	$\gamma''$ : 0.846
<b>R</b> <sub>326</sub>	8.309 (8.5)	4.219	1.790	1.600	1.721	1.534	3.132	3.132	H $\epsilon$ : 7.198
<b>Q</b> <sub>327</sub>	8.129 (7.9)	4.242	2.030	1.890	2.288	2.288	-	-	H $\epsilon$ : *
<b>A</b> <sub>328</sub>	8.214 (8.1)	4.188	1.275	-	-	-	-	-	-
<b>H</b> <sub>329</sub>	8.480 (7.6)	4.659	3.240	3.158	-	-	7.243	-	H $\zeta$ : 8.566
<b>C</b> <sub>330</sub>	8.499 (7.6)	4.620	3.209	2.945	-	-	-	-	CONH <sub>2</sub> : 7.741, 7.233

\*: Die Signale der Säureamidgruppen (7.473/6.843, 7.538/6.860, 7.562/6.869, 7.570/6.882) konnten durch fehlende NOE-Kontakte nicht eindeutig den entsprechenden Asparaginen bzw. dem Glutamin zugeordnet werden.

### 7.5.3 Darstellung des zyklischen V3-Glycopeptids P4



#### Variante 1:

Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre und mit entgasten Lösungen durchgeführt. Dafür wurden 3 Äq. (250  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{mol}$ ) TCEP-Agarose (8  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) filtriert und mehrfach mit ddH<sub>2</sub>O (pH 8.4) gewaschen. Anschließend wurden 2.1 mg (0.6  $\mu\text{mol}$ ) **P2**, gelöst in 1 mL ddH<sub>2</sub>O (pH 8.4), zum Harz gegeben und zweimal mit 1 mL ddH<sub>2</sub>O (pH 8.4) nachgespült, sodass ein Reaktionsvolumen von insgesamt 3 mL vorlag. Die Mischung wurde für 8 h bei 30 °C geschüttelt und schließlich mittels LC-ESI-MS nach AAV15 untersucht. Das StBu-entschützte Peptid konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Lösung wurde filtriert, um TCEP-Agarose abzutrennen, mit 4 Äq. (0.4 mg, 2.6  $\mu\text{mol}$ ) DTT versetzt und für 18 h bei 30 °C gerührt. Der Fortschritt der Entschützung wurde wieder mittels LC-ESI-MS nach AAV15 untersucht, wobei aber kein entschütztes Peptid detektiert wurde. Zuletzt wurden weitere 6 Äq. (0.6 mg, 3.9  $\mu\text{mol}$ ) DTT zugegeben, für 3 h bei 30 °C gerührt und mittels LC-ESI-MS nach AAV15 untersucht. Es konnte kein StBu-entschütztes Peptid nachgewiesen werden.

#### Variante 2:

1.93 mg (520 nmol) des Glycopeptids **P2** wurden nach AAV8 entschützt und nach AAV9 oxidiert. Anschließend wurde eine Ultrafiltration nach AAV10 mit dem Macrosep Ultrafiltrationsröhrchen durchgeführt, um die Lösung einzuengen, zu entsalzen und überschüssiges DTT abzutrennen. Die Reinigung erfolgte erst über eine präparative RP-Säule (Nucleodur ISIS, Agilent HPLC) und dann in mehreren Läufen über eine analytische RP-Säule (Nucleodur ISIS, Merck HPLC) nach AAV12. Die Charakterisierung wurde mittels MALDI-MS

und NMR nach AAV13 und AAV16 durchgeführt. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die Konzentration mit Hilfe von NMR nach AAV17 ermittelt.

**Ausbeute:** Es wurden 1.07 mg (306 nmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 59% bezogen auf die eingesetzte Menge **P2**.

### Charakterisierung:

*Farbloser Feststoff*

Summenformel: C<sub>142</sub>H<sub>231</sub>N<sub>47</sub>O<sub>52</sub>S<sub>2</sub>

Molmasse: 3492.77 g/mol

Retentionszeit: 16.2 min (15% Laufmittel B)

MALDI-MS: m/z = 3491.482 [M+H]<sup>+</sup> (gef.), 3491.6391 (ber.)

**Tabelle 17:** <sup>1</sup>H-chemische Verschiebung [ppm] von **P4** in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), pH 2.2. Das Spektrum wurde bei 300 K an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.746 ppm kalibriert. Die <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

	NH ( <sup>3</sup> J <sub>NH-Hα</sub> )	Hα	Hβ	Hβ'	Hγ	Hγ'	Hδ	Hδ'	Sonstige
<b>C</b> <sub>296</sub>	-	4.415	3.294	3.140	-	-	-	-	-
<b>T</b> <sub>297</sub>	8.800 (7.6)	4.376	4.068	-	1.159	-	-	-	-
<b>R</b> <sub>298</sub>	8.521 (6.2)	4.556	1.784	1.692	1.606	1.606	3.154	3.154	7.136
<b>P</b> <sub>299</sub>	-	4.351	2.210	1.856	1.954	1.954	3.758	3.584	-
<b>N</b> <sub>300</sub>	8.423 (6.1)	4.596	2.774	2.754	-	-	*	*	-
<b>N</b> <sub>301</sub>	8.462 (6.9)	4.647	2.790	2.728	-	-	8.581	-	-
<b>N</b> <sub>302</sub>	8.377 (6.5)	4.678	2.799	2.719	-	-	*	*	-
<b>T</b> <sub>303</sub>	8.025 (7.5)	4.231	4.184	-	1.140	-	-	-	-
<b>R</b> <sub>304</sub>	8.200 (9.8)	4.224	1.789	1.705	1.573	1.528	3.120	3.120	7.102
<b>K</b> <sub>305</sub>	8.222 (8.5)	4.254	1.746	1.665	1.344	1.344	1.585	1.585	Hε: 2.912, Hζ: 7.448
<b>S</b> <sub>306</sub>	8.212 (6.5)	4.678	3.788	3.788	-	-	-	-	-
<b>P</b> <sub>01</sub>	-	4.366	2.171	1.705	1.936	1.936	3.670	3.758	-
<b>S</b> <sub>02</sub>	8.185 (7.4)	4.318	3.727	3.727	-	-	-	-	-
<b>Y</b> <sub>316</sub>	7.954 (6.9)	4.508	3.022	2.916	-	-	7.047	7.047	Hε: 6.745
<b>A</b> <sub>317</sub>	8.070 (5.4)	4.310	1.306	-	-	-	-	-	-
<b>T</b> <sub>318</sub>	7.968 (6.2)	4.232	4.192	-	1.159	-	-	-	-

	NH ( $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ )	H $\alpha$	H $\beta$	H $\beta'$	H $\gamma$	H $\gamma'$	H $\delta$	H $\delta'$	Sonstige
<b>G</b> <sub>319</sub>	8.299 (6.5)	3.913	-	-	-	-	-	-	-
<b>D</b> <sub>320</sub>	8.240 (6.7)	4.666	2.851	2.761	-	-	-	-	-
<b>I</b> <sub>321</sub>	8.056 (9.0)	4.112	1.826	-	1.394	1.099	0.777	-	$\gamma''$ : 0.799
<b>I</b> <sub>322</sub>	8.137 (9.6)	4.056	1.803	-	1.411	1.129	0.785	-	$\gamma''$ : 0.838
<b>G</b> <sub>323</sub>	8.337 (n.b.)	3.870	-	-	-	-	-	-	-
<b>D</b> <sub>324</sub>	8.212 (6.1)	4.675	2.867	2.795	-	-	-	-	-
<b>I</b> <sub>325</sub>	8.014 (8.0)	4.077	1.848	-	1.403	1.135	0.793	-	$\gamma''$ : 0.834
<b>R</b> <sub>326</sub>	8.300 (9.0)	4.243	1.785	1.718	1.596	1.536	3.133	3.133	H $\epsilon$ : 7.113
<b>Q</b> <sub>327</sub>	8.164 (8.4)	4.251	2.022	1.885	2.290	2.290	-	-	H $\epsilon$ : *
<b>A</b> <sub>328</sub>	8.245 (7.7)	4.196	1.277	-	-	-	-	-	-
<b>H</b> <sub>329</sub>	8.485 (6.6)	4.664	3.241	3.157	-	-	7.238	-	H $\zeta$ : 8.556
<b>C</b> <sub>330</sub>	8.501 (7.2)	4.621	3.214	2.946	-	-	-	-	CONH <sub>2</sub> : 7.738, 7.233

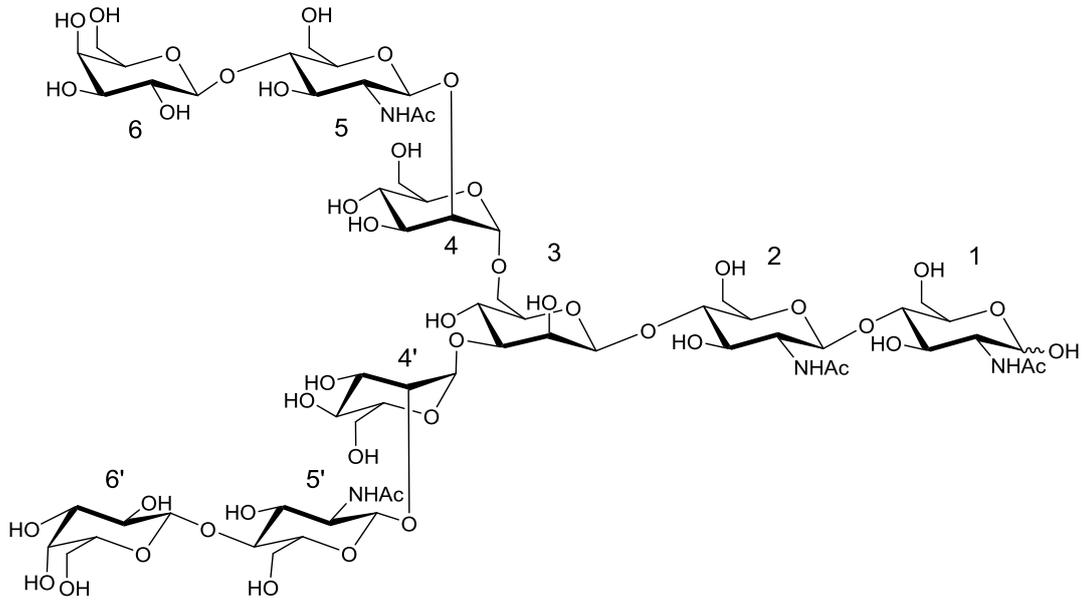
\*: Die Signale der Säureamidgruppen (7.576/6.891, 7.523/6.867, 7.459/6.843) konnten durch fehlende NOE-Kontakte nicht eindeutig den entsprechenden Asparaginen bzw. dem Glutamin zugeordnet werden.

n.b.:  $^3J$ -Kopplungskonstante ließ sich wegen Überlagerung mit anderen Signalen nicht bestimmen

	NH ( $^3J$ )	NHAc ( $^3J$ )	1	2	3	4 / 5 / 6*	NHAc
<b>GlcNAc</b>	8.581 (8.1)	8.149 (10.2)	4.969	3.784	3.695	3.679 / 3.579 / 3.487	1.943
<b>GlcNAc'</b>	-	8.333 (9.6)	4.525	3.688	3.510	3.863 / 3.413 / 3.336 / 3.174	2.001

\* Signale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden bzw. sind von anderen Protonen überlagert

## 7.6 Isolierung des Nonasaccharids (21)



### Variante 1:

3.52 g (10.4  $\mu\text{mol}$ ) bovines Fibrinogen wurden in 28 mL 8 M Guanidiniumchlorid in 200 mM Tris-HCl (pH 8.2) bei 30 °C gelöst und mit 0.85 g DTT versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei Rt gerührt, mit 1.20 g Iodacetamid versetzt und weitere 30 min bei Rt gerührt. Anschließend wurde die viskose Flüssigkeit viermal gegen 10 L ddH<sub>2</sub>O dialysiert (6-8 k MWCO) und das ausgefallene Protein gefriergetrocknet. Das alkylierte Protein wurde bei 40 °C in 10 mL 8 M Guanidiniumchlorid in Tris-Puffer gelöst, mit 80 mL Tris-Puffer verdünnt und auf einen pH von 8.0 eingestellt. Das Trypsin wurde bei 96 °C für 3 min inaktiviert und anschließend wurden 7 U PNGase F zugesetzt. Die Lösung wurde für 30 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Ethanol versetzt, sodass der Ethanolanteil 80% des Endvolumens ausmachte und für 30 min bei -20 °C gelagert. Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation (20 min, 11k rpm, -5 °C) entfernt und das Ethanol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und schließlich dialysiert (1000 MWCO), um Salze zu entfernen. Die dialysierte Lösung wurde gefriergetrocknet und mittels ESI-MS (AAV14) auf Anwesenheit von Glycanen getestet. Es konnten jedoch keinerlei Glycane detektiert werden.

### Variante 2:

Basierend auf der Vorschrift von Kötzer et al.<sup>177</sup> wurden 7.48 g (22.0  $\mu\text{mol}$ ) bovines Fibrinogen in 60 mL 8 M Guanidiniumchlorid in Tris-Puffer bei 30 °C gelöst und mit 1.80 g DTT versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei Rt gerührt, mit 2.55 g Iodacetamid versetzt und weitere 30 min bei Rt gerührt. Anschließend wurde die viskose Flüssigkeit 4 x gegen 10 L

ddH<sub>2</sub>O dialysiert (6-8 k MWCO) und das ausgefallene Protein gefriergetrocknet. Das alkylierte Protein wurde in 11.5 mL 8 M Guanidiniumchlorid in Tris-Puffer bei 40 °C gelöst, mit 90 mL Tris-Puffer verdünnt und mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 7.6 eingestellt. Eine Hälfte von 22.2 mg Trypsin (1:20 zum Fibrinogen) wurde zugesetzt, bei 37 °C inkubiert und nach 19 h wurde die andere Hälfte zugesetzt und für weitere 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wurde für 3 min bei 96 °C inaktiviert und die Lösung innerhalb von 24 h dreimal gegen 10 L Wasser dialysiert (1000 MWCO). Durch Zentrifugation (4 °C, 4k rpm, 50 min) wurde präzipitiertes Protein entfernt und der Überstand gefriergetrocknet. Die Glycopeptide und Peptide wurden in 37.5 mL 50 mM Ammoniumacetat-Lsg. (pH 7.5) gelöst, noch einmal für 10 min bei 96 °C sterilisiert und mit 5 U PNGase F versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurde der pH-Wert erneut auf 7.5 eingestellt, weitere 4 U PNGase F zugegeben und erneut für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Eisessig ein pH-Wert von 5.0 eingestellt, 1 U Neuraminidase zugegeben und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde durch Filtration (0.45 µm) entfernt und die Lösung gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 7.5 mL Wasser gelöst und in zwei gleichen Teilen über eine gemischte Ionentauscher-Säule (2 x 30 cm, oben: Dowex 50Wx2, H<sup>+</sup>-Form, unten: Dowex 1x2, Acetat-Form) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden mittels ESI-MS nach AAV14 identifiziert, vereinigt und weiter nach AAV12 über eine PGC-Säule an der HPLC gereinigt. Die mittels ESI-MS identifizierten Fraktionen mit Nonasaccharid wurden gepoolt und mittels ESI-MS und NMR nach AAV14 und AAV16 charakterisiert.

**Ausbeute:** Es wurden 4.19 mg (2.6 µmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 3% bezogen auf die eingesetzte Menge Fibrinogen, welches vier Glycosylierungsstellen aufweist.

#### **Charakterisierung:**

*Farbloser Feststoff*

Name: Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc

Summenformel: C<sub>62</sub>H<sub>104</sub>N<sub>4</sub>O<sub>46</sub>

Molmasse: 1641.49 g/mol

ESI-MS: m/z = 821.3038 [M+2H]<sup>2+</sup> (gef.), 821.3034 (ber.)

**Tabelle 18:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung [ppm] von **21** in  $\text{D}_2\text{O}$ . Das Spektrum wurde bei 300 K an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.746 ppm kalibriert. Es wurden nur die *structural reporter groups* zugeordnet.

Rest	Proton	$\delta$ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)
D-GlcNAc ( <b>1</b> )	H1 $\alpha$	5.182	d	2.5
	NAc $\alpha$	2.033	s	-
	NAc $\beta$	2.032	s	-
$\beta$ -D-GlcNAc ( <b>2</b> )	H1 $\alpha$	4.607	d	8.8
	H1 $\beta$	4.598	d	8.8
	NAc $\alpha$	2.077	s	-
	NAc $\beta$	2.075	s	-
$\beta$ -D-Man ( <b>3</b> )	H2	4.245	d	2.9
$\alpha$ -D-Man ( <b>4</b> )	H1	4.923	*	*
	H2	4.106	dd	1.8, 3.6
$\beta$ -D-GlcNAc ( <b>5</b> )	H1	4.576	d	9.1
	NAc	2.041	s	-
$\beta$ -D-Gal ( <b>6</b> )	H1	4.468	d	8.4
$\alpha$ -D-Man ( <b>4'</b> )	H1	5.112	*	*
	H2	4.186	*	*
$\beta$ -D-GlcNAc ( <b>5'</b> )	H1	4.576	d	9.1
	NAc	2.046	s	-
$\beta$ -D-Gal ( <b>6'</b> )	H1	4.462	d	8.4

\* Kopplungskonstante konnte nicht bestimmt werden

## 7.7 Zellkultur der GHOST(3)-Zellen

Die verwendeten GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Das FKS wurde vor Verwendung hitzedeaktiviert (56 °C, 20 min). Der PBS-Puffer wurde autoklaviert und die Zellen einmal im Monat mit Antibiotikum selektiert (Hi5: Puromycin (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Parental: Neomycin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )). Eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle auf bakterielle Kontamination wurde ebenfalls durchgeführt.

### 7.7.1 Aussaat und Kultur der GHOST(3)-Zellen

Ein bei -80 °C eingefrorenes Aliquot der Zellen wurde aufgetaut, zentrifugiert (4 °C, 1k x g, 5 min) und das DMSO enthaltende Einfriermedium entfernt. Die Zellen wurden in 1 mL

Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Kulturschale (175 cm<sup>2</sup>) mit 24 mL Wachstumsmedium überführt. Die Vermehrung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit. Wenn die adhären wachsenden Zellen 90% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 8 mL Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C im Brutschrank von der Kulturschale gelöst. Durch Zugabe von 12 mL Wachstumsmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Die gelösten Zellen wurden zentrifugiert (1k x g, 4 °C, 5 min) und der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet einer Kulturschale wurde entweder zur Lagerung in 1.5 mL Einfriermedium suspendiert und zuerst für 2 h bei -20 °C und anschließend bei -80 °C eingefroren. Oder das Pellet wurde zur Kultivierung weiterer Zellen in 15 mL neuem Wachstumsmedium aufgenommen und auf drei Kulturschalen mit je 20 mL Medium aufgeteilt. Die Zellen wurden maximal siebenmal passagiert, um eine Veränderung des Phänotyps auszuschließen.

### 7.7.2 Zellzählung

Für die SPR-Messungen wurde jeweils ein Aliquot der entsprechenden Zellen aufgetaut und zentrifugiert (1k x g, 4 °C, 5 min). Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und zuletzt in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen. Zur Zellzählung wurden 10 µL der Zellen mit 30 µL PBS-Puffer verdünnt und 10 µL dieser Lösung mit 10 µL Trypanblau versetzt. Von den eingefärbten Zellen wurden 10 µL in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und unter dem Mikroskop gezählt. Die Anzahl der vitalen Zellen aller vier Quadranten  $n_z$  ergab mit Hilfe von Gleichung (13) die Anzahl der Zellen/mL.

$$\frac{n_z}{4} * 10000 * 4 * 2 = \text{Zellen/mL} \quad (13)$$

## 7.8 SPR-Experimente

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden für die SPR-Experimente filtriert (0.2 µm) und autoklaviert. Die bei -20 °C gelagerten Sensorchips wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Als Laufmittel diente PBS-Puffer (pH 7.4).

### 7.8.1 pH-Wert-Scouting des Immobilisierungspuffers

Zur Bestimmung des am besten geeigneten pH-Werts für die Immobilisierung, wurden 10 mM Acetatpuffer mit pH-Werten zwischen 4.0 und 5.5 sowie ein 5 mM Maleatpuffer

(pH 6.0) getestet. Dazu wurden je 200  $\mu\text{L}$  Puffer mit 50  $\mu\text{L}$  einer **P1**-Stammlösung (0.62 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt und für 2 min bei einer Flussrate von 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  über beide Flusszellen injiziert. Um das Peptid anschließend wieder von der Chip-Oberfläche zu entfernen, wurde für 1 min Ethanolamin (1 M, pH 8.5) injiziert. Der Puffer mit der höchsten RU-Antwort wurde schließlich für die Immobilisierung verwendet.

### 7.8.2 Immobilisierung des Peptids auf dem CMD200M Sensorchip

Zur Immobilisierung des Peptids wurden zunächst beide Flusszellen eines Sensorchips für 12 min mit 1:1 NHS (0.1 M) und EDC (0.4 M) aktiviert. Das Peptid wurde anschließend für 6 min über drei Zyklen auf der ersten Flusszelle immobilisiert. Dafür wurde eine Peptidstammlösung (ca. 1 mg/mL) 1:1 mit Maleatpuffer (pH 6.0) verdünnt und injiziert. Nach jedem Zyklus wurde mit PBS-Puffer gespült, um nicht kovalent gebundenes Peptid zu entfernen. Nach der Immobilisierung wurden die freien Bindungsstellen beider Flusszellen für 8 min mit Ethanolamin-HCl (1 M, pH 8.5) blockiert. Die Flussrate betrug jeweils 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Die Belegung ergab sich aus der Differenz der RU-Werte der ersten ( $\Delta\text{RU1}$ ) und der zweiten Flusszelle ( $\Delta\text{RU2}$ ) vor der Aktivierung und nach der Blockierung mit Ethanolamin (Gleichung (14)). Für die Berechnung der Stoffmenge wurde angenommen, dass 1 RU etwa 1 pg Peptid entspricht. Die Belegung der Sensorchips ist in Tabelle 19 gezeigt.

$$\begin{aligned} \text{Belegung} &= \Delta\text{RU1} - \Delta\text{RU2} \\ &= (\text{RU1}_{\text{capping}} - \text{RU1}_{\text{Aktivierung}}) - (\text{RU2}_{\text{capping}} - \text{RU2}_{\text{Aktivierung}}) \end{aligned} \quad (14)$$

**Tabelle 19:** Belegung der verschiedenen Sensorchips.

Peptid	Belegung
<b>P1</b>	1675 RU, ca. 513 fmol
<b>P2</b>	4499 RU, ca. 1.2 pmol
<b>P3</b>	2630 RU, ca. 852 fmol
<b>P4</b>	1270 RU, ca. 363 fmol

### 7.8.3 Durchführung der Messung

Die GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen wurden gezählt (s. Abschnitt 7.7.2) und auf die Konzentrationen 3600, 1800, 1200, 900, 720, 360, 180 und 36 Z/ $\mu\text{L}$  verdünnt. Von jeder Konzentration wurden ein bis drei Zyklen gemessen, die jeweils 10 min dauerten. Die

verschiedenen Konzentrationen wurden in unterschiedlichen Reihenfolgen vermessen. Die Zellen wurden mit einer Flussrate von 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  über beide Flusszellen geleitet, um die Sensorgramme aufzunehmen. Nach Ende der Injektion wurde mit 0.5% SDS-Lösung regeneriert. Da dieser Schritt problematisch verlief, wurde z.T. bis zu neun Mal für 1 bis 10 min regeneriert und gewartet, bis die Basislinie ungefähr den Anfangswert erreicht hatte. Für die Auswertung wurden von jeder Konzentration die maximalen RU-Antworten zum gleichen Zeitpunkt kurz vor Ende der Injektion abgelesen und gegen die Rezeptorkonzentrationen aufgetragen.

## 7.9 Durchflusszytometrischer Nachweis des CCR5-Rezeptors mit einem Anti-CCR5-Antikörper

Die GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen wurden gezählt (s. Abschnitt 7.7.2) und jeweils auf zwei verschiedene Konzentrationen verdünnt. Für die ungefärbten Negativkontrollen wurden jeweils 300000 Zellen in 400  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer suspendiert und für die Proben, die mit dem Farbstoff-markierten Antikörper versetzt werden sollten, wurden je  $10^6$  Zellen in 100  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer suspendiert. Die Zellen wurden die ganze Zeit auf Eis gelagert, um ihre Vitalität bis zur Messung zu erhalten. Die anzufärbenden Proben wurden mit je 5  $\mu\text{L}$  des Anti-CCR5-PE-Antikörpers (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt und für 20 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min, 500 x g) und der Überstand verworfen. Die Antikörper-markierten Zellen wurden erneut in 400  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer resuspendiert und im FL2-PE-A-Kanal des FACS Cantoll durch das UKE FACS *Sorting Core Unit* vermessen. Es wurden die Emissionen von jeweils 10000 Zellen erfasst.

## 7.10 Konformationsanalyse

### 7.10.1 NOESY-Experimente und Berechnung der Protonenabstände

Die NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten von 30, 50, 100, 200, 300, 600 und 1000 ms von **P3** und **P4** wurden mit dem Pulsprogramm *noesyegpph* bei 300 K an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Wasserunterdrückung erfolgte dabei mittels *excitation sculpting*. Die Peptide wurden in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) (pH 2.2) gelöst, mit Konzentrationen von 3.2 mM für **P3** und 1.9 mM für **P4**.

Mit Hilfe von Topspin 3.1 wurden in dem Spektrum mit der höchsten Intensität (**P3**: 300 ms, **P4**: 600 ms) Integrale über das jeweils gesamte Signal (positiver und negativer Anteil) gesetzt und mittels eines *integral regions files* auf alle anderen Spektren übertragen. Die

Integralwerte wurden zweifach normiert, um aus ihnen die Aufbaukurven erstellen zu können. Zuerst wurde der prozentuale Anteil eines Kreuzsignals von der Summe aller Kreuzsignale der jeweiligen Spur (inklusive Diagonalpeak) berechnet, um NOE-Prozente zu erhalten. Anschließend wurde die Eigenrelaxation herausnormiert. Dazu wurde das isolierte Integral des Diagonalpeaks eines amidischen Protons der Asparagine bzw. des Glutamins (konnte nicht genau zugeordnet werden) im Spektrum mit der Mischzeit von 30 ms als Eigenrelaxation definiert. Die Summe einer Spur wurde durch dieses Integral der Eigenrelaxation geteilt, um den Normierungsfaktor zu erhalten, der anschließend auf alle berechneten NOE-Prozente angewandt wurde.

Zur Berechnung der Aufbaukurven mittels Origin 9.1 wurden die NOE-Prozente gegen die jeweilige Mischzeit aufgetragen und an Gleichung (7) angepasst. Die Protonenabstände wurden nach Gleichung (8) aus den Anfangssteigungen der Aufbaukurven berechnet. Als Referenzprotonenpaar diente dabei das C-terminale Amid an C330 mit einem Abstand von 1.75 Å.

### 7.10.2 Berechnung der $\phi$ -Winkel

Die Diederwinkel  $\phi$  wurden mit Hilfe der  $^3J$ -Kopplungskonstanten der NH-H $\alpha$ -Kopplung berechnet. Die Bestimmung der Kopplungskonstanten erfolgte aus einem TOCSY-Spektrum der Pulssequenz *dipsi2esgpph* mit einer Mischzeit von 100 ms und *zerofilling* auf 32k Datenpunkte. Mit Hilfe der Karplus-Gleichung (4) wurden bis zu vier  $\phi$ -Winkel berechnet, von denen jeweils zwei Werte nach Ramachandran-*Plot* erlaubt waren.

### 7.10.3 DG-Rechnungen

Aus den berechneten Abständen und Winkeln wurden für das Programm CYANA Abstandsbeschränkungen von  $\pm 15\%$  und Winkelbeschränkungen von  $\pm 15^\circ$  festgelegt. Protonenpaare mit nicht verwertbaren Aufbaukurven wurden auf Werte zwischen 1.8 und 5.0 Å beschränkt. Nicht eindeutig zuzuordnende Methylen- und Methylprotonen wurden als Pseudoatome definiert. Für die Prolinone konnten keine  $\phi$ -Winkelbeschränkungen angegeben werden, weshalb die  $\psi$ -Winkel auf den im Ramachandran-*Plot* erlaubten Bereich von  $-70^\circ$  bis  $180^\circ$  beschränkt wurden. Die Chitobiose von **P4** konnte bei der DG-Rechnung nicht berücksichtigt werden, da in CYANA keine Kohlenhydrat-Nomenklatur implementiert ist. Da es je zwei mögliche  $\phi$ -Winkel pro Aminosäure gab, wurden mehrere Berechnungen durchgeführt. Mit CYANA wurden jeweils 500 randomisierte Strukturen unter Einhaltung der Abstands- und Winkelbeschränkungen generiert. Anhand der Zielfunktionswerte der 100

besten Strukturen wurde bewertet, welche  $\phi$ -Winkel die passenderen Strukturen lieferten und gegebenenfalls einzelne, nicht eingehaltene Werte verändert, um verbesserte Strukturen zu generieren.

## 7.11 Computergestützte Methoden

Die *In-silico*-Studien wurden mit Hilfe des Programms Maestro 2015-4 durchgeführt. Sofern keine anderen Werte angegeben sind, wurden für die Einstellungen jeweils die Standardparameter verwendet. Als Kraftfeld wurde in allen Berechnungen das OPLS\_2005-Kraftfeld verwendet. Im *Desmond System Builder* wurde jeweils eine orthorhombische Wasserbox mit *buffer* als *box size calculating method* und einer NaCl-Konzentration von 0.15 M definiert. Als *solvent model* wurde SPC gewählt und das System wurde durch Zugabe der entsprechenden Anzahl  $\text{Na}^+$ - bzw.  $\text{Cl}^-$ -Ionen neutralisiert. Bei den MD-Simulationen wurden das NPT-Ensemble, eine Temperatur von 300 K und ein Druck von 1.01325 bar eingestellt. Jeweils alle 1.2 ps wurden Energien und Trajektorien gespeichert. Falls nicht anders angegeben wurde *relax model system before simulation* aktiviert.

### 7.11.1 Constrained Energieminimierung und MD-Simulation der CYANA-Strukturen

Zur Verringerung der Energie der Strukturen aus der DG-Rechnung, unter Erhaltung der Winkel- und Abstandsbeschränkungen, wurde mit Hilfe von *MacroModel Minimization* eine Energieminimierung über 2500 Iterationen durchgeführt. Dazu wurden *constraints* mit denselben Werten wie für die Strukturgenerierung mit CYANA verwendet. Zusätzlich wurden weitere *constraints* für Abstände zum C-terminalen Amid und zur Chitobiose gesetzt, die bei der DG-Rechnung nicht berücksichtigt werden konnten. Das Strafpotenzial bei Nichteinhaltung der *constraints* betrug 100 kJ/mol für die Diederwinkel und 100 kJ/(mol·Å<sup>2</sup>) für die Abstände. Als Lösungsmittel wurde Wasser definiert und außerdem wurde *charges from force field* und *cutoff extended* eingestellt. Mit der energieminierten Endstruktur wurde im *Desmond System Builder* ein System aufgesetzt und mit *Desmond Molecular Dynamics* eine MD-Simulation über 2 ns durchgeführt. Die Simulation wurde mit den oben beschriebenen Standardparametern durchgeführt. Nur auf *relax model system before simulation* wurde verzichtet, da das System bereits energieminiert vorlag und für die Simulation keine *constraints* gesetzt werden konnten. Da im Laufe der Simulation sämtliche Winkel- und 30% der Abstandsbeschränkungen gebrochen wurden, wurde auf eine weitere Auswertung verzichtet.

### 7.11.2 MD-Simulationen der V3-Peptide zur Strukturvorhersage

Die Startstrukturen der V3-Peptide für die Strukturvorhersage stammen aus der Datei *Complex.mol2*, die die Endstruktur einer früheren MD-Simulation der gp120-Röntgenstruktur (2B4C)<sup>51</sup> im Komplex mit den membrangebundenen Rezeptoren CCR5 und CD4 vorlag. Bis auf den *V3-Loop* wurde alles gelöscht und im *loop* wurden die Mutationen T317A, E320D, I307P und F315S eingefügt. Die Aminosäuren 308-314 wurden gelöscht, die losen Enden manuell verbunden und zuletzt minimiert. In der Struktur war bereits ein Nonasaccharid mit N301 verbunden, das je nach V3-Peptid erhalten, gekürzt oder entfernt wurde.

Das jeweilige V3-Peptid wurde in den *Desmond System Builder* geladen und ein System aufgesetzt, das für eine 2 ns dauernde MD-Simulation mit den oben beschriebenen Standardparametern verwendet wurde. Zur Auswertung wurden *Desmond Simulation Event Analysis*, *Desmond Simulation Interactions Diagram* und *BioLuminate Protein Interaction Analysis* verwendet.

### 7.11.3 MD-Simulationen des trunkierten und des nativen gp120 mit dem CCR5-Rezeptor

Die Röntgenstrukturen von gp120 (2B4C)<sup>51</sup> und CCR5 (4MBS)<sup>2</sup> wurden geladen und mit dem *Protein Preparation Wizard* bearbeitet. Zusätzlich zu den Standardeinstellungen wurden die Optionen zum Generieren fehlender Seitenketten mittels *Prime* sowie das *Capping* der Termini aktiviert. Die gp120-Röntgenstruktur diente als natives gp120 und wurde folgend mutiert: Q301N, T317A und E320D. Weiterhin wurde an N301 ein Nonasaccharid als Glycan eingefügt. Das trunkierte gp120 entspricht dem *V3-Loop* aus Abschnitt 7.11.2, nur als vollständiges gp120. Maraviroc wurde aus der Bindungstasche des CCR5 gelöscht.

Das jeweilige gp120 wurde manuell in den CCR5-Rezeptor modelliert, um dem Modell von Tan *et al.*<sup>2</sup> möglichst nahe zu kommen. Davon ausgehend wurde mit dem *Desmond System Builder* ein System aufgesetzt und in einer 3 ns langen MD-Simulation mit den oben beschriebenen Standardparametern eingesetzt. Zur Auswertung der Simulation wurden *Desmond Simulation Event Analysis*, *Desmond Simulation Interactions Diagram* und *BioLuminate Protein Interaction Analysis* verwendet. Weiterhin wurde die Wechselwirkungsenergie des letzten *frames* der Simulation berechnet, indem mit *MacroModel Current Energy* die Energien des gp120-CCR5-Komplexes sowie beider einzelnen Proteine berechnet und voneinander abgezogen wurden (Tabelle 20). Dabei wurde kein Solvens verwendet, eine dielektrische Konstante von 80.0, *charges from force field* und *cutoff normal* eingestellt.

**Tabelle 20:** Wechselwirkungsenergien der V3-Loop-CCR5-Wechselwirkung, aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Komponenten der Wechselwirkung. Die Energien wurden jeweils für den letzten *frame* der MD-Simulation berechnet.

	Energie der MD mit nativem V3-Loop [kJ/mol]	Energie der MD mit trunkiertem V3-Loop [kJ/mol]	Differenz [kJ/mol]
<b>Total Energy</b>	-183.582	-291.7988	108.2168
<b>Stretch</b>	0.021	0.0044	0.0166
<b>Bend</b>	0.0596	0.0234	0.0362
<b>Torsion</b>	-0.0313	-0.0151	-0.0162
<b>Improper Torsion</b>	0.0011	-0.0013	0.0024
<b>Van der Waals</b>	-178.5896	-284.0598	105.4702
<b>Electrostatic</b>	-5.043	-7.7545	2.7115
<b>Explicit Hydrogen Bonds</b>	0	0	0
<b>Cross Terms</b>	0	0	0

## 8 Toxikologische Daten

Substanz <sup>189,190</sup>	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225, 319, 336 EUH066	210, 233, 305+351+338
Acetonitril		225, 302+312+332, 319	210, 305+351+338, 403+235
Ameisensäure		226, 314	260, 280, 301+330+331, 305+351+338
Ammoniumhydrogen- carbonat		302	-
Chitin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Chloroform		302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372	281, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310
Chloroform- <i>d</i>		302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372	281, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310
Deuteriumoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dichlormethan		351	281, 308+313
Diethylether		224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 403+235
2,5-Dihydroxy- benzoesäure	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Diisopropylethylamin		225, 301, 314, 412	210, 273, 280, 301+330+331, 305+351+338
4-(Dimethylamino)- pyridin		301, 310, 315, 319	280, 302+352, 305+351+338, 308+310
<i>N,N</i> -Dimethyl- formamid		360D, 226, 332, 312, 319	201, 302+352, 302+351+338, 308+313
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> <sub>6</sub>	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dimethylsulfoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		

## 140 | Toxikologische Daten

Substanz <sup>189,190</sup>	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
DEPBT		315, 319, 335	302+352, 305+351+338
<i>N,N'</i> -Diisopropyl-carbodiimid		226, 317, 318, 330, 334	210, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310
Dinatriumhydrogenphosphat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dithiothreitol		302, 319, 315	302+350, 305+351+338
DMSO	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
EDC	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Essigsäure 99%		226, 290, 314	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Essigsäureanhydrid		226, 332, 302, 314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanol		225	210
Ethanolamin		302+312+332, 314	280, 302+352, 301+330+331, 305+351+338
Fmoc-Aminosäure-derivate	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Fmoc-Rink Amide AM Harz	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Glycin-HCl	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Guanidiniumchlorid		302, 319, 315	305+351+338, 302+352
HATU		334, 317	280, 302+352, 304+341, 342+311
Hydrazinhydrat		301+311+331, 314, 317, 350, 410	201, 261, 273, 280, 301+310+330, 305+351+338
1-Hydroxy-7-azabenzotriazol		226, 302+312+332, 318, 360D	201, 280, 305+351+338, 308+313

Substanz <sup>189,190</sup>	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Iodacetamid		315, 317, 319, 335	280, 302+352, 304+340, 305+351+338
Kaliumchlorid		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Kaliumdihydrogenphosphat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Kieselgel 60	-	-	260
Maleinsäure		302+312, 315, 317, 318, 335	280, 302+352, 305+351+338, 313
Methanol		225, 301+311+331, 370	210, 280, 302+352, 403+235
<i>N</i> -Methylmorpholin		225, 302, 312, 314	210, 280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 308+310
<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon		360D, 315, 319, 335	201, 302+352, 305+351+338, 308+313
Natrium		260, 314, EUH014	280, 301+330+331, 305+351+338, 370+378, 308+310, 422
Natriumacetat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Natriumchlorid		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Natriumdodecylsulfat		228, 302, 311, 315, 319, 335	210, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338
Natriumhydrogencarbonat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Natriumhydroxid		219, 314	218, 301+330+331, 305+351+338
Natriummethanolat		251, 314, EUH014	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Natriumsulfat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG	
Pentafluorphenol		302+312	302+352

## 142 | Toxikologische Daten

Substanz <sup>189,190</sup>	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Piperidin		225, 331, 311, 314	210, 280, 302+352, 301+330+331, 305+351+338
Pyridin		225, 302+312+332	210, 302+352, 304+340, 403+235
Salzsäure 37%		290, 314, 335	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Schwefelsäure 98%		290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
TBTU		228, 315, 319, 335	210, 302+352, 304+340, 305+351+338
TCEP-Harz		314	280, 305+351+338, 310
Toluol		225, 304, 315, 336, 361d, 373	210, 240, 301+330+331, 302+352, 314, 403+233
Triethylamin		225, 332, 312, 314, 314, 335	210, 280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338
Trifluoressigsäure		332, 314, 412	271, 273, 301+330+331, 305+351+338
Triisopropylsilan		226	210, 260, 262
Trypanblau (0.4%)		350	210, 308+313
Trypsin		319, 335, 315, 334	302+352, 305+351+338, 304+341, 342+311
Z(2-Cl)OSu		317	280, 302+352

## 9 Literaturverzeichnis

1. B. Jürs. Synthese und Analyse von Liganden des CCR5-Rezeptors. Dissertation, Universität Hamburg, **2011**.
2. Q. Tan, Y. Zhu, J. Li, Z. Chen, G.W. Han, I. Kufareva, T. Li, L. Ma, G. Fenalti, W. Zhang, X. Xie, H. Yang, H. Jiang, V. Cherezov, H. Liu, S.R. C., Q. Zhao, B. Wu, Structure of the CCR5 Chemokine Receptor-HIV Entry Inhibitor Maraviroc Complex. *Science* **2013**, *341*, 1387-1390.
3. F. Barré-Sinoussi, J.-C. Chermann, F. Rey, M. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220* (4599), 868-871.
4. R.C. Gallo, S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **1984**, *224* (4648), 500-503.
5. Avert.org, Webseite von Avert.org, Global information and advice on HIV & AIDS. <http://www.avert.org/> (**26.04.2016**).
6. UNAIDS *AIDS by the numbers*; **2015**.
7. E. Lamontagne, M. Haacker, B. Ventelou, R. Greener, Macroeconomic impact of HIV: the need for better modelling *Curr Op HIV AIDS* **2010**, *5*, 249-254.
8. UNAIDS *Report on the Global Aids Epidemic*; **2013**.
9. C. Hoffmann, J.K. Rockstroh, *HIV 2014/2015*. Medizin Fokus Verlag: Hamburg, **2014**.
10. O.T. Campbell-Yesufu, R.T. Gandhi, Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin Infect Dis* **2011**, *52* (6), 780-787.
11. J. Hemelaar, The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* *18* (3), 182-192.
12. F. Gao, E. Bailes, D.L. Robertson, Y. Chen, C.M. Rodenburg, S.F. Michael, L.B. Cummins, L.O. Arthur, M. Peeters, G.M. Shaw, P.M. Sharp, B.H. Hahn, Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **1999**, *397* (6718), 436-441.
13. N.R. Faria, A. Rambaut, M.A. Suchard, G. Baele, T. Bedford, M.J. Ward, A.J. Tatem, J.D. Sousa, N. Arinaminpathy, J. Pépin, D. Posada, M. Peeters, O.G. Pybus, P. Lemey, The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* **2014**, *346* (6205), 56-61.
14. B. Korber, M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B.H. Hahn, S. Wolinsky, T. Bhattacharya, Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science* **2000**, *288*, 1789-1796.

15. V.M. Hirsch, R.A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R.H. Purcell, P.R. Johnson, An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **1989**, 339 (6223), 389-392.
16. W.E. Johnson, R.C. Desrosiers, Viral Persistence: HIV's Strategies of Immune System Evasion. *Annu Rev Med* **2002**, 53, 499,518.
17. S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl, *Molekulare Virologie*. 3; Spektrum Verlag: Heidelberg, **2010**.
18. P. Zhu, J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J.D. Lifson, H. Grise, G.A. Ofek, K.A. Taylor, K.H. Roux, Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **2006**, 441 (7095), 847-852.
19. R. Wyatt, P.D. Kwong, E. Desjardins, R.W. Sweet, J. Robinson, W.A. Hendrickson, J.G. Sodroski, The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **1998**, 393, 705-711.
20. C.B. Wilen, J.C. Tilton, R.W. Doms, HIV: cell binding and entry. *CSH Perspect Med* **2012**, 2 (8).
21. A.G. Dalgleish, P.C.L. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, R.A. Weiss, The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **1984**, 312, 763-767.
22. B.G. Turner, M.F. Summers, Structural Biology of HIV. *J Mol Biol* **1999**, 285, 1-32.
23. H. Deng, R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P.D. Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, N.R. Landau, Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **1996**, 381 (6584), 661-666.
24. Y. Feng, C.C. Broder, P.E. Kennedy, E.A. Berger, HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **1996**, 272, 872-877.
25. J.M. Cuevas, R. Geller, R. Garijo, J. López-Aldeguer, R. Sanjuán, Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol* **2015**, 13 (9), e1002251.
26. W.S. Hu, S.H. Hughes, HIV-1 reverse transcription. *CSH Perspect Med* **2012**, 2 (10).
27. B. Chen, HIV capsid assembly, mechanism and structure. *Biochemistry* **2016**.
28. F. Barré-Sinoussi, A.L. Ross, J.-F. Delfraissy, Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Micro* **2013**, 11 (12), 877-883.
29. M. Paterlini, Structure Modeling of the Chemokine Receptor CCR5: Implications for Ligand Binding and Selectivity. *Biophys J* **2002**, 83 (6), 3012-3031.
30. M.M. Lederman, A. Penn-Nicholson, M. Cho, D. Mosier, Biology of CCR5 and Its Role in HIV Infection and Treatment. *JAMA* **2006**, 296 (7), 815-826.

31. K. Allers, T. Schneider, CCR5 $\Delta$ 32 mutation and HIV infection: basis for curative HIV therapy. *Curr Opin Virol* **2015**, *14*, 24-29.
32. A. Zlotnik, O. Yoshie, Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity* **2000**, *12* (2), 121-127.
33. D.E. Metzler, *Biochemistry - The Chemical Reactions of Living Cells*. 2. Aufl.; Academic Press: San Diego, **2001**; Vol. 2.
34. S.S. Hwang, T.C. Boyle, H.K. Lyerly, B.R. Cullen, Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **1991**, *253*, 71-74.
35. G. Scarlatti, E. Tresoldi, A. Björndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H.K. Deng, M.S. Malnati, A. Plebani, A.G. Siccardi, D.R. Littman, E.M. Fenyö, P. Lusso, In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* **1997**, *3* (11), 1259-1265.
36. T. Cardozo, T. Kimura, S. Philpott, B. Weiser, H. Burger, S. Zolla-Pazner, Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retrov* **2007**, *23* (3), 415-426.
37. S. Polzer, M.T. Dittmar, H. Schmitz, M. Schreiber, The N-linked Glycan g15 within the V3 Loop of the HIV-1 External Glycoprotein gp120 Affects Coreceptor Usage, Cellular Tropism, and Neutralization. *Virology* **2002**, *304* (1), 70-80.
38. C.C. Huang, S.N. Lam, P. Acharya, M. Tang, S.H. Xiang, S.S. Hussan, R.L. Stanfield, J. Robinson, J. Sodroski, I.A. Wilson, R. Wyatt, C.A. Bewley, P.D. Kwong, Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* **2007**, *317* (5846), 1930-1934.
39. R. Liu, W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M.E. MacDonald, H. Stuhlmann, R.A. Koup, N.R. Landau, Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **1996**, *86* (3), 367-377.
40. G. Hütter, D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Müßig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kücherer, O. Blau, Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *New Engl J Med* **2009**, *360* (7), 692-698.
41. K. Allers, G. Hütter, J. Hofmann, C. Loddenkemper, K. Rieger, E. Thiel, T. Schneider, Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 stem cell transplantation. *Blood* **2010**, *117* (10), 2791-2799.
42. L. Kordelas, J. Verheyen, S. Esser, Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32 Mutation. *New Engl J Med* **2014**, *371* (9), 880-882.
43. C.K. Leonard, M.W. Spellman, L. Riddle, R.J. Harris, J.N. Thomas, T.J. Gregory, Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus

- envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **1990**, *265* (18), 10373-10382.
44. G. Férir, S. Gordts, D. Schols, HIV-1 and Its Resistance to Peptidic Carbohydrate-Binding Agents (CBAs): An Overview. *Molecules* **2014**, *19* (12), 21085.
45. C. Bonomelli, K.J. Doores, D.C. Dunlop, V. Thaney, R.A. Dwek, D.R. Burton, M. Crispin, C.N. Scanlan, The Glycan Shield of HIV Is Predominantly Oligomannose Independently of Production System or Viral Clade. *PLoS ONE* **2011**, *6* (8), e23521.
46. A. Varki, *Essentials of Glycobiology*. 2. Aufl.; New York, **1999**.
47. J. Balzarini, Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Micro* **2007**, *5* (8), 583-597.
48. L. Mathys, J. Balzarini, Several N-Glycans on the HIV Envelope Glycoprotein gp120 Preferentially Locate Near Disulphide Bridges and Are Required for Efficient Infectivity and Virus Transmission. *PLoS ONE* **2015**, *10* (6), e0130621.
49. W. Lee, W. Syu, B. Du, M. Matsuda, S. Tan, A. Wolf, M. Essex, T. Lee, Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *PNAS* **1992**, *98* (6), 2213-2217.
50. D. Wilhelm, H.N. Behnken, B. Meyer, Glycosylation Assists Binding of HIV Protein gp120 to Human CD4 Receptor. *ChemBioChem* **2012**, *13* (4), 524-527.
51. C.C. Huang, M. Tang, M.-Y.Y. Zhang, S. Majeed, E. Montabana, R.L. Stanfield, D.S. Dimitrov, B. Korber, J. Sodroski, I.A. Wilson, R. Wyatt, P.D. Kwong, Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **2005**, *310* (5750), 1025-1028.
52. P.D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski, W.A. Hendrickson, Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **1998**, *393* (6686), 648-659.
53. J.-P. Julien, A. Cupo, D. Sok, R.L. Stanfield, D. Lyumkis, M.C. Deller, P.-J. Klasse, D.R. Burton, R.W. Sanders, J.P. Moore, A.B. Ward, I.A. Wilson, Crystal Structure of a Soluble Cleaved HIV-1 Envelope Trimer. *Science* **2013**, *342* (6165), 1477-1483.
54. L. Kong, I.A. Wilson, P.D. Kwong, Crystal structure of a fully glycosylated HIV-1 gp120 core reveals a stabilizing role for the glycan at Asn262. *Proteins* **2015**, *83* (3), 590-596.
55. S. Zolla-Pazner, Improving on nature: focusing the immune response on the V3 loop. *Hum Antibodies* **2005**, *14* (3-4), 69-72.
56. X. Jiang, V. Burke, M. Totrov, C. Williams, T. Cardozo, M.K. Gorny, S. Zolla-Pazner, X.P. Kong, Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. *Nat Struct Mol Biol* **2010**, *17* (8), 955-961.
57. S. Zolla-Pazner, S.S. Cohen, D. Boyd, X.-P. Kong, M. Seaman, M. Nussenzweig, F. Klein, J. Overbaugh, M. Totrov, Structure/Function Studies Involving the V3 Region of the

- HIV-1 Envelope Delineate Multiple Factors That Affect Neutralization Sensitivity. *J Virol* **2016**, *90* (2), 636-649.
58. S. Chiou, E.O. Freed, A.T. Panganiban, W.R. Kenealy, Studies on the Role of the V3 Loop in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Function. *AIDS Res Hum Retrov* **1992**, *8* (9), 1611-1618.
59. E.G. Cormier, T. Dragic, The Crown and Stem of the V3 Loop Play Distinct Roles in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Interactions with the CCR5 Coreceptor. *J Virol* **2002**, *76* (17), 8953-8957.
60. J.P. Moore, Q.J. Sattentau, R. Wyatt, J. Sodroski, Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* **1994**, *68* (1), 469-484.
61. S. Polzer, M.T. Dittmar, H. Schmitz, B. Meyer, H. Müller, H.-G. Kräusslich, M. Schreiber, Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* **2001**, *11* (1), 11-19.
62. R.A. Ogert, M.K. Lee, W. Ross, A. Buckler-White, M.A. Martin, M.W. Cho, N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* **2001**, *75* (13), 5998-6006.
63. K. Tsuchiya, H. Ode, T. Hayashida, J. Kakizawa, H. Sato, S. Oka, H. Gatanaga, Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Sci Rep* **2013**, *3*, 2389.
64. J. Dojahn. Kombinatorische Synthese und Untersuchung von V3-Peptid- und Glycopeptidbibliotheken als potentielle HIV Impfstoffe. Dissertation, Universität Hamburg, **2002**.
65. J. Tost. Synthese von N-Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins GP120 und Untersuchung ihrer CCR5 Korezeptorspezifität. Dissertation, Universität Hamburg, **2004**.
66. N. Pfeifer, T. Lengauer, Improving HIV coreceptor usage prediction in the clinic using hints from next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **2012**, *28* (18), i589-i595.
67. J.P. Moore, P.L. Nara, The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *AIDS* **1991**, *5* Suppl 2, 33.
68. K. Javaherian, A.J. Langlois, C. McDanal, K.L. Ross, L.I. Eckler, C.L. Jellis, A.T. Profy, J.R. Rusche, D.P. Bolognesi, S.D. Putney, T.J. Matthews, Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *PNAS* **1989**, *86* (17), 6768-6772.
69. E.W. Carrow, L.K. Vujcic, W.L. Glass, K.B. Seamon, S.C. Rastogi, R.M. Hendry, R. Boulos, N. Nzila, G.V. Quinnan, High prevalence of antibodies to the gp120 V3 region

- principal neutralizing determinant of HIV-1MN in sera from Africa and the Americas. *AIDS Res Hum Retrov* **1991**, 7 (10), 831-838.
70. X. Wei, J.M. Decker, S.K. Wang, H. Hui, J.C. Kappes, X. Wu, J.F. Salazar-Gonzalez, M.G. Salazar, J.M. Kilby, M.S. Saag, N.L. Komarova, M.A. Nowak, B.H. Hahn, P.D. Kwong, G.M. Shaw, Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **2003**, 422 (6929), 307-312.
71. V. Burke, C. Williams, M. Sukumaran, S.S. Kim, H. Li, X.H. Wang, M.K. Gorny, S. Zolla-Pazner, X.P. Kong, Structural basis of the cross-reactivity of genetically related human anti-HIV-1 mAbs: implications for design of V3-based immunogens. *Structure* **2009**, 17 (11), 1538-1546.
72. U.S. Department of Health and Human Services, Webseite von AIDSinfo. <https://aidsinfo.nih.gov> (**13.05.2016**).
73. Department of Health and Human Services *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*; **2014**.
74. D. Looney, A. Ma, S. Johns, HIV Therapy - The State of ART. In *The Future of HIV-1 Therapeutics : Resistance Is Futile?* , 1 Aufl. ed.; Torbett, B. E.; Goodsell, D. S.; Richman, D. D., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 389.
75. A. Wong, The HIV pipeline. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, 13 (9), 649-650.
76. U.S. Department of Health and Human Services, Drug Database von AIDSinfo. <https://aidsinfo.nih.gov> (**14.05.2016**).
77. B.E. Torbett, D.S. Goodsell, D.D. Richman, *The Future of HIV-1 Therapeutics : Resistance Is Futile?* (389). 1 Aufl.; Springer International Publishing: Cham ;s.l., **2015**.
78. F. Klein, H. Mouquet, P. Dosenovic, J. Scheid, L. Scharf, M.C. Nussenzweig, Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. *Science (New York, N.Y.)* **2013**, 341 (6151), 1199-1204.
79. M. Caskey, F. Klein, J.C.C. Lorenzi, M.S. Seaman, A.P. West Jr, N. Buckley, G. Kremer, L. Nogueira, M. Braunschweig, J.F. Scheid, J.A. Horwitz, I. Shimeliovich, S. Ben-Avraham, M. Witmer-Pack, M. Platten, C. Lehmann, L.A. Burke, T. Hawthorne, R.J. Gorelick, B.D. Walker, T. Keler, R.M. Gulick, G. Fätkenheuer, S.J. Schlesinger, M.C. Nussenzweig, Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* **2015**, 522 (7557), 487-491.
80. F. Klein, A. Halper-Stromberg, J.A. Horwitz, H. Gruell, J.F. Scheid, S. Bournazos, H. Mouquet, L.A. Spatz, R. Diskin, A. Abadir, T. Zang, M. Dorner, E. Billerbeck, R.N. Labitt, C. Gaebler, P.M. Marcovecchio, R.-B. Incesu, T.R. Eisenreich, P.D. Bieniasz, M.S. Seaman, P.J. Bjorkman, J.V. Ravetch, A. Ploss, M.C. Nussenzweig, HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature* **2012**, 492 (7427), 118-122.

81. Anthony P. West Jr, L. Scharf, Johannes F. Scheid, F. Klein, Pamela J. Bjorkman, Michel C. Nussenzweig, Structural Insights on the Role of Antibodies in HIV-1 Vaccine and Therapy. *Cell* **2014**, 156 (4), 633-648.
82. T.r.H.V.S. Group, Placebo-Controlled Phase 3 Trial of a Recombinant Glycoprotein 120 Vaccine to Prevent HIV-1 Infection. *J Infect Dis* **2005**, 191 (5), 654-665.
83. P. Pitisuttithum, P. Gilbert, M. Gurwith, W. Heyward, M. Martin, F. van Griensven, D. Hu, Jordan W. Tappero, B.V.E. Group, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Efficacy Trial of a Bivalent Recombinant Glycoprotein 120 HIV-1 Vaccine among Injection Drug Users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* **2006**, 194 (12), 1661-1671.
84. S. Rerks-Ngarm, P. Pitisuttithum, S. Nitayaphan, J. Kaewkungwal, J. Chiu, R. Paris, N. Premisri, C. Namwat, M. de Souza, E. Adams, M. Benenson, S. Gurunathan, J. Tartaglia, J.G. McNeil, D.P. Francis, D. Stablein, D.L. Birx, S. Chunsuttiwat, C. Khamboonruang, P. Thongcharoen, M.L. Robb, N.L. Michael, P. Kunasol, J.H. Kim, M.-T. Investigators, Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **2009**, 361 (23), 2209-2220.
85. F. Klein, R. Diskin, J. Scheid, C. Gaebler, H. Mouquet, I. Georgiev, M. Pancera, T. Zhou, R.-B. Incesu, B. Fu, P. Gnanapragasam, T. Oliveira, M. Seaman, P. Kwong, P. Bjorkman, M. Nussenzweig, Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell* **2013**, 153 (1), 126-138.
86. H.-X. Liao, R. Lynch, T. Zhou, F. Gao, S.M. Alam, S.D. Boyd, A.Z. Fire, K.M. Roskin, C.A. Schramm, Z. Zhang, J. Zhu, L. Shapiro, J.C. Mullikin, S. Gnanakaran, P. Hraber, K. Wiehe, G. Kelsoe, G. Yang, S.-M. Xia, D.C. Montefiori, R. Parks, K.E. Lloyd, R.M. Scarce, K.A. Soderberg, M. Cohen, G. Kamanga, M.K. Louder, L.M. Tran, Y. Chen, F. Cai, S. Chen, S. Moquin, X. Du, M.G. Joyce, S. Srivatsan, B. Zhang, A. Zheng, G.M. Shaw, B.H. Hahn, T.B. Kepler, B.T.M. Korber, P.D. Kwong, J.R. Mascola, B.F. Haynes, Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* **2013**, 496 (7446), 469-476.
87. J.G. Jardine, D.W. Kulp, C. Havenar-Daughton, A. Sarkar, B. Briney, D. Sok, F. Sesterhenn, J. Ereño-Orbea, O. Kalyuzhniy, I. Deresa, X. Hu, S. Spencer, M. Jones, E. Georgeson, Y. Adachi, M. Kubitz, A.C. deCamp, J.-P. Julien, I.A. Wilson, D.R. Burton, S. Crotty, W.R. Schief, HIV-1 broadly neutralizing antibody precursor B cells revealed by germline-targeting immunogen. *Science* **2016**, 351 (6280), 1458-1463.
88. J.G. Jardine, T. Ota, D. Sok, M. Pauthner, D.W. Kulp, O. Kalyuzhniy, P.D. Skog, T.C. Thinnes, D. Bhullar, B. Briney, S. Menis, M. Jones, M. Kubitz, S. Spencer, Y. Adachi, D.R. Burton, W.R. Schief, D. Nemazee, Priming a broadly neutralizing antibody response to HIV-1 using a germline-targeting immunogen. *Science* **2015**, 349 (6244), 156-161.
89. A. Schafberger, S. Taubert *HIV Report Heilung*; Deutsche AIDS-Hilfe: **2014**.
90. A. Sáez-Cirión, C. Bacchus, L. Hocqueloux, V. Avettand-Fenoel, I. Girault, C. Lecroux, V. Potard, P. Versmisse, A. Melard, T. Prazuck, B. Descours, J. Guernon, J.-P. Viard, F. Boufassa, O. Lambotte, C. Goujard, L. Meyer, D. Costagliola, A. Venet, G. Pancino, B.

- Autran, C. Rouzioux, A.V.S. Group, Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* **2013**, *9* (3), e1003211.
91. J.v. Lunzen, J.S.z. Wiesch, U. Schuhmacher, I. Hauber, J. Hauber In *Functional cure after long-term HAART initiated during early HIV infection: a comprehensive case study (TUPE246)*, IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Kuala Lumpur, Kuala Lumpur, 2013.
92. T. Rasmussen, M. Tolstrup, A. Winckelmann, L. Østergaard, O. Schmeltz Søgaaard, Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies: Advancing to clinical trials. *Hum Vaccin Immunother* **2013**, *9* (4), 790-799.
93. W. Hu, R. Kaminski, F. Yang, Y. Zhang, L. Cosentino, F. Li, B. Luo, D. Alvarez-Carbonell, Y. Garcia-Mesa, J. Karn, X. Mo, K. Khalili, RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (31), 11461-11466.
94. J. Karpinski, I. Hauber, J. Chemnitz, C. Schafer, M. Paszkowski-Rogacz, D. Chakraborty, N. Beschorner, H. Hofmann-Sieber, U.C. Lange, A. Grundhoff, K. Hackmann, E. Schrock, J. Abi-Ghanem, M.T. Pisabarro, V. Surendranath, A. Schambach, C. Lindner, J. van Lunzen, J. Hauber, F. Buchholz, Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nat Biotech* **2016**, *advance online publication*.
95. H.K. Liao, Y. Gu, A. Diaz, J. Marlett, Y. Takahashi, M. Li, K. Suzuki, R. Xu, T. Hishida, C.J. Chang, C.R. Esteban, J. Young, J.C. Izpisua Belmonte, Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6413.
96. B. Owens, Zinc-finger nucleases make the cut in HIV. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13* (5), 321-322.
97. P. Tebas, D. Stein, W.W. Tang, I. Frank, S.Q. Wang, G. Lee, S.K. Spratt, R.T. Surosky, M.A. Giedlin, G. Nichol, M.C. Holmes, P.D. Gregory, D.G. Ando, M. Kalos, R.G. Collman, G. Binder-Scholl, G. Plesa, W.T. Hwang, B.L. Levine, C.H. June, Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med* **2014**, *370* (10), 901-910.
98. D.B. Cox, R.J. Platt, F. Zhang, Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* **2015**, *21* (2), 121-131.
99. K. Yazawa, K. Numata, Recent Advances in Chemoenzymatic Peptide Syntheses. *Molecules* **2014**, *19* (9), 13755.
100. R.B. Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis. *Endeavour* **1965**, *24*, 3-7.
101. L.A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F.J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B.M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, The

- Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41* (3), 441-445.
102. M. Bienert, P. Henklein, M. Beyermann, L.A. Carpino, *Methods of Organic Chemistry: Uronium/Guanidinium Salts*. 4. Aufl.; M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo: Stuttgart, **2002**.
103. W.C. Chan, P.D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical Approach*. Oxford, **2000**.
104. M. Gongora-Benitez, J. Tulla-Puche, M. Paradis-Bas, O. Werbitzky, M. Giraud, F. Albericio, Optimized Fmoc Solid-Phase Synthesis of the Cysteine-Rich Peptide Linaclotide. *Biopolymers* **2011**, *96* (1), 69-80.
105. C. Seung-Gu, C. Ki-Doo, J. Seung-Hwan, S. Hang-Cheol, Role of Disulfide Bonds in the Structure and Activity of Human Insulin. *Mol Cells* **2003**, *16* (3), 323-330.
106. D. Andreu, F. Albericio, N. Solé, G. Barany, Formation of Disulfide Bonds in Synthetic Peptides and Proteins. *Method Mol Biol* **1994**, *35*, 91-169.
107. J. Eichler, R. Houghten, Synthesis of cyclic disulfide peptides: comparison of oxidation methods. *Protein Peptide Lett* **1997**, *4*, 157,164.
108. F. Albericio, R. Hammer, C. Garciaecheverria, M. Molins, J. Chang, M. Munson, M. Pons, E. Giralt, G. Barany, Cyclization of Disulfide-Containing Peptides in Solid-Phase Synthesis. *Int J Pept Prot Res* **1991**, *37* (5), 402-413.
109. I. Annis, B. Hargittai, G. Barany, Disulfide bond formation in peptides. *Method Enzymol* **1997**, *289*, 198-221.
110. W. Cleland, Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* **1964**, *3* (4), 480-482.
111. L. Moroder, H. Musiol, N. Schaschke, L. Chen, B. Hargittai, G. Barany, Protection of the Thiol Group. In *Houben-Weyl*, Felix, A.; Moroder, L.; Goodman, M., Eds. Stuttgart, 2002; Vol. E22a, pp 384-424.
112. K.W. Moremen, M. Tiemeyer, A.V. Nairn, Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13* (7), 448-462.
113. B.G. Davis, Synthesis of Glycoproteins. *Chem Rev* **2002**, *102* (2), 579-602.
114. R.A. Dwek, Glycobiology: "Towards Understanding the Function of Sugars". *Biochem Soc T* **1995**, *23* (1), 1-25.
115. D.P. Gamblin, E.M. Scanlan, B.G. Davis, Glycoprotein Synthesis: An Update. *Chem Rev* **2008**, *109* (1), 131-163.
116. S.T. Cohen-Anisfeld, P.T. Lansbury, A practical, convergent method for glycopeptide synthesis. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (23), 10531-10537.

117. F. Ende. Untersuchung zur konvergenten Synthese von festphasengebundenen *N*-Typ Glycopeptiden durch Seitenkettenglycosylierung. Dissertation, Universität Hamburg, **2001**.
118. B. Claasen. Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus dem TSE verursachenden Prion Protein. Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2001**.
119. E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, R.A. Dwek, K. Bock, Novel sequential solid-phase synthesis of *N*-linked glycopeptides from natural sources. *J Chem Soc Perk T1* **1998**, (3), 549-560.
120. L. Otvos, Jr., K. Wroblewski, E. Kollat, A. Perczel, M. Hollosi, G.D. Fasman, H.C. Ertl, J. Thurin, Coupling strategies in solid-phase synthesis of glycopeptides. *Pept Res* **1989**, 2 (6), 362-366.
121. N. Shao, J. Xue, Z. Guo, Chemical Synthesis of CD52 Glycopeptides Containing the Acid-Labile Fucosyl Linkage. *J Org Chem* **2003**, 68 (23), 9003-9011.
122. J. Xue, Z. Guo, Efficient Synthesis of Complex Glycopeptides Based on Unprotected Oligosaccharides. *J Org Chem* **2003**, 68 (7), 2713-2719.
123. N. Yamamoto, A. Takayanagi, A. Yoshino, T. Sakakibara, Y. Kajihara, An Approach for a Synthesis of Asparagine-Linked Sialylglycopeptides Having Intact and Homogeneous Complex-Type Undecadisialyloligosaccharides. *Chem-Eur J* **2007**, 13 (2), 613-625.
124. A. Balasubramaniam, Z. Tao, W. Zhai, M. Stein, S. Sheriff, W. Chance, J. Fischer, P. Eden, J. Taylor, C. Liu, D. McFadden, T. Voisin, C. Roze, M. Laburthe, Structure-activity studies including a  $\Psi(\text{CH}_2\text{-NH})$  scan of peptide YY (PYY) active site, PYY(22-36), for interaction with rat intestinal PYY receptors: development of analogues with potent in vivo activity in the intestine. *J Med Chem* **2000**, 43 (18), 3420-3427.
125. H. Hojo, E. Haginoya, Y. Matsumoto, Y. Nakahara, K. Nabeshima, B.P. Toole, Y. Watanabe, The first synthesis of peptide thioester carrying *N*-linked core pentasaccharide through modified Fmoc thioester preparation: synthesis of an *N*-glycosylated Ig domain of emmprin. *Tetrahedron Lett* **2003**, 44 (14), 2961-2964.
126. M. Bodanszky, J.Z. Kwei, Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependence in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides. *Int J Pept Protein Res* **1978**, 12 (2), 69-74.
127. M. Mergler, F. Dick, B. Sax, P. Weiler, T. Vorherr, The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part I. *J Pept Sci* **2003**, 9 (1), 36-46.
128. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensor Actuator* **1983**, 4, 299-304.
129. E. Kretschmann, H. Raether, Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch A* **1968**, 23, 2135.
130. A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys* 216 (4), 398-410.

131. G. Klebe, *Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Aufl.; Spektrum Akademischer Verlag: **2009**.
132. R.B.M. Schasfoort, A.J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge, **2008**; p - P001.
133. E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J Colloid Interface Sci* **1991**, *143* (2), 513-526.
134. GE Healthcare, Webseite der Firma GE Healthcare. <http://www.biacore.com> (**15.04.2016**).
135. V.R. Preedy, V.B. Patel, *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. Springer: Dordrecht, **2015**.
136. M. Leach, M. Drummond, A. Doig, *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. 1. Aufl.; John Wiley & Sons: **2013**.
137. U. Sack, A. Artonk, G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 1. Aufl.; Karger: Basel, **2007**.
138. H.M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*. 4. Aufl.; John Wiley & Sons, Inc.: **2005**.
139. L. Stryer, J. Berg, J. Tymoczko, *Biochemistry*. 7. Aufl.; Heidelberg, **2010**.
140. M. Karplus, Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (18), 2870-2871.
141. S. Ludvigsen, K.V. Andersen, F.M. Poulsen, Accurate measurements of coupling constants from two-dimensional nuclear magnetic resonance spectra of proteins and determination of  $\phi$ -angles. *J Mol Biol* **1991**, *217* (4), 731-736.
142. G.N. Ramachandran, V. Sasisekharan, Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem* **1968**, *23*, 283-438.
143. N. Jacobsen, *NMR Spectroscopy Explained - Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. 1. Aufl; Hoboken, NJ, **2007**.
144. D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. 1. Aufl.; Weinheim, **1989**.
145. I. Solomon, Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys Rev* **1955**, *99* (2), 559-565.
146. A. Kumar, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich, Buildup Rates of the Nuclear Overhauser Effect Measured by Two-Dimensional Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Implications for Studies of Protein Conformation. *J Am Chem Soc* **1981**, *103*, 3654-3658.

147. Y.A. Arnautova, A. Jagielska, H.A. Scheraga, A new force field (ECEPP-05) for peptides, proteins, and organic molecules. *J Phys Chem B* **2006**, *110* (10), 5025-5044.
148. F.A. Momany, R.F. McGuire, A.W. Burgess, H.A. Scheraga, Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids. *J Phys Chem-US* **1975**, *79* (22), 2361-2381.
149. P. Güntert, Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol* **2004**, *278*, 353-378.
150. P. Güntert, C. Mumenthaler, K. Wüthrich, Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* **1997**, *273* (1), 283-298.
151. A. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications* 2. Aufl.; Prentice Hall: **2001**.
152. O.M. Becker, A.D.M. Jr., B. Roux, M. Watanabe, *Computational Biochemistry and Biophysics*. M. Dekker: New York, **2001**.
153. J. Copps, R.F. Murphy, S. Lovas, Molecular Dynamics Simulations of Peptides. In *Peptide-Based Drug Design*, Otvos, L., Ed. New York, 2008; Vol. 494, pp 115-126.
154. V. Schünemann, *Biophysik*. 1. Aufl.; Springer: Berlin, **2005**.
155. J.L. Banks, H.S. Beard, Y. Cao, A.E. Cho, W. Damm, R. Farid, A.K. Felts, T.A. Halgren, D.T. Mainz, J.R. Maple, R. Murphy, D.M. Philipp, M.P. Repasky, L.Y. Zhang, B.J. Berne, R.A. Friesner, E. Gallicchio, R.M. Levy, Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J Comput Chem* **2005**, *26* (16), 1752-1780.
156. W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, The OPLS potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J Am Chem Soc* **1988**, *110* (6), 1657-1666.
157. N. Diedrich. Synthese und Charakterisierung von Peptiden aus dem GP120 des HIV. Examensarbeit, Universität Hamburg, **2008**.
158. S.-I. Nishimura, H. Kuzuhara, Y. Takiguchi, K. Shimahara, Peracetylated chitobiose: Preparation by specific degradations of chitin, and chemical manipulations. *Carbohydr Res* **1989**, *194*, 223-231.
159. G. Zemplén, A. Kunz, Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker. *Ber Dtsch Chem Ges (A and B Series)* **1923**, *56* (7), 1705-1710.
160. M. Bejugam, S.L. Flitsch, An Efficient Synthetic Route to Glycoamino Acid Building Blocks for Glycopeptide Synthesis. *Org Lett* **2004**, *6* (22), 4001-4004.
161. N. Haberz. Synthese und Analyse eines gp120 Peptids aus dem V3 Loop des HI-Virus und Optimierung der mikrowellengestützten Festphasenpeptidsynthese. Masterarbeit, Universität Hamburg, **2011**.

162. C. Flügge. Einfluss der Glycosylierung auf Struktur und Bindungsverhalten der dritten variablen Loop des HIV-1 Glycoproteins GP120. Dissertation, Universität Hamburg, **2008**.
163. S. Meyer. Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des GP120 aus dem HIV. Dissertation, Universität Hamburg, **1999**.
164. K. Wallach. Charakterisierung der Wechselwirkung von V3-Peptiden aus dem HIV-1 GP120 mit dem humanen Corezeptor CCR5 mittels SPR und STDD-NMR. Dissertation, Universität Hamburg, **2012**.
165. H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, Synthesis of Tn/T Antigen MUC1 Glycopeptide BSA Conjugates and Their Evaluation as Vaccines. *Eur J Org Chem* **2011**, 2011 (20-21), 3685-3689.
166. L. Urge, D.C. Jackson, L. Gorbics, K. Wroblewski, G. Graczyk, L. Otvos Jr, Synthesis and conformational analysis of N-glycopeptides that contain extended sugar chains. *Tetrahedron* **1994**, 50 (8), 2373-2390.
167. J.K. Twibanire, T.B. Grindley, Efficient and Controllably Selective Preparation of Esters Using Uronium-Based Coupling Agents. *Org Lett* **2011**, 13 (12), 2988-2991.
168. A.-S. Geiermann, N. Polacek, R. Micura, Native chemical ligation of hydrolysis-resistant 3'-peptidyl-tRNA mimics. *J Am Chem Soc* **2011**, 133 (47), 19068-19071.
169. B. Neises, W. Steglich, Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **1978**, 17 (7), 522-524.
170. G. Biosciences, *TCEP Reducing Resin - Reduction of Peptides & Proteins (Manual)*, **2012**.
171. P. Debeire, J. Montreuil, E. Moczar, H. Van Halbeek, J.F.G. Vliegenthart, Primary structure of two major glycans of bovine fibrinogen. *Eur J Biochem* **1985**, 151 (3), 607-611.
172. A. Henschen, F. Lottspeich, M. Kehl, C. Southan, Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* **1983**, 408, 28-43.
173. H.N. Behnken, M. Fellenberg, M.P. Koetzler, R. Jirmann, T. Nagel, B. Meyer, Resolving the problem of chromatographic overlap by 3D cross correlation (3DCC) processing of LC, MS and NMR data for characterization of complex glycan mixtures. *Anal Bioanal Chem* **2012**, 404 (5), 1427-1437.
174. M.L.C. Dasilva, T. Tamura, T. McBroom, K.G. Rice, Tyrosine Derivatization and Preparative Purification of the Sialyl and Asialyl N-Linked Oligosaccharides from Porcine Fibrinogen. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 312 (1), 151-157.
175. T. Nagel. LC-MS von intakten Glycoproteinen – Eine vergleichende Untersuchung von humanem Fibrinogen aus Blutplasmaproben. Masterarbeit, Universität Hamburg, **2013**.

176. K.G. Rice, M.L. Corradi Da Silva, Preparative purification of tyrosinamide N-linked oligosaccharides. *J Chromatogr A* **1996**, 720 (1-2), 235-249.
177. M.P. Kötzler, S. Blank, H.N. Behnken, D. Alpers, F.I. Bantleon, E. Spillner, B. Meyer, Formation of the immunogenic  $\alpha$ 1,3-fucose epitope: Elucidation of substrate specificity and of enzyme mechanism of core fucosyltransferase A. *Insect Biochem Molec* **2012**, 42 (2), 116-125.
178. J.A. van Kuik, K. Hard, J.F. Vliegthart, A  $^1\text{H}$  NMR database computer program for the analysis of the primary structure of complex carbohydrates. *Carbohydr Res* **1992**, 235, 53-68.
179. J.F.G. Vliegthart, L. Dorland, H.v. Halbeek, High-resolution,  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **1983**, 41, 209-374.
180. A. Mörner, Å. Björndal, J. Albert, V.N. KewalRamani, D.R. Littman, R. Inoue, R. Thorstensson, E.M. Fenyö, E. Björling, Primary Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates, Like HIV-1 Isolates, Frequently Use CCR5 but Show Promiscuity in Coreceptor Usage. *J Virol* **1999**, 73 (3), 2343-2349.
181. H. Rehm, T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Aufl.; Springer Spektrum: Heidelberg, **2010**.
182. C. Hahnefeld, S. Drewianka, F.W. Herberg, Determination of Kinetic Data Using Surface Plasmon Resonance Biosensors. In *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*, Decler, J.; Reischl, U., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, 2004; pp 299-320.
183. G. Healthcare, *Sensor Surface Handbook*, **2008**.
184. S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl.; Springer Spektrum: Heidelberg, **2011**.
185. S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure validation by  $\text{C}\alpha$  geometry:  $\phi, \psi$  and  $\text{C}\beta$  deviation. *Proteins* **2003**, 50 (3), 437-450.
186. B.J. Doranz, S.S.W. Baik, R.W. Doms, Use of a gp120 Binding Assay To Dissect the Requirements and Kinetics of Human Immunodeficiency Virus Fusion Events. *J Virol* **1999**, 73 (12), 10346-10358.
187. G. Lin, F. Baribaud, J. Romano, R.W. Doms, J.A. Hoxie, Identification of gp120 Binding Sites on CXCR4 by Using CD4-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 2 Env Proteins. *J Virol* **2003**, 77 (2), 931-942.
188. G.A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press: **1997**.
189. Merck, Webseite der Firma. [www.merck-chemicals.com](http://www.merck-chemicals.com) (**02.08.2016**).
190. Sigma Aldrich, Webseite der Firma. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (**02.08.2016**).

## 10 Anhang

### 10.1 Experimentell bestimmte Protonenabstände von P3

**Tabelle 21:** Berechnete Korrelationskonstanten und Abstände sämtlicher für die Konformationsanalyse verwendeten Protonenpaare des Peptids **P3**. Die Referenzprotonenpaare sind grün dargestellt und die Referenzdaten der jeweiligen Spalte sind fett gedruckt. Die unsinnigen Referenzdaten sind kursiv gedruckt. Grau sind Protonenpaare dargestellt, deren Werte zu klein sind, um sinnvoll zu sein und die für die Abstandsbeschränkungen auf 1.8-5.0 Å gesetzt wurden. *Long-range*-Kontakte sind violett. Der Fehler ist die Standardabweichung, basierend auf den Werten der anderen Referenzprotonen.

Protonenpaar	C330 CONH <sub>2</sub>			C330 Hβ'/Hβ		C330 Hβ/Hβ'		Y316 Hδ/Hε	
	σ	Abstand [Å]	Fehler [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]
C330 CONH <sub>2</sub>	<b>9.75E-02</b>	<b>1.75</b>	0.12	9.75E-02	1.63	9.75E-02	1.50	9.75E-02	1.83
C330 Hβ'-Hβ	7.70E-02	1.82	0.13	<b>7.70E-02</b>	<b>1.70</b>	7.70E-02	1.56	7.70E-02	1.90
C330 Hβ-Hβ'	4.60E-02	1.98	0.14	4.60E-02	1.85	<b>4.60E-02</b>	<b>1.70</b>	4.60E-02	2.07
Y316 Hδ-Hε	1.67E-02	2.35	0.17	1.67E-02	2.19	1.67E-02	2.01	<b>1.67E-02</b>	<b>2.45</b>
Y316 Hβ-Hβ'	<i>1.65E+00</i>	<i>1.09</i>	<i>0.08</i>	<i>1.65E+00</i>	<i>1.02</i>	<i>1.65E+00</i>	<i>0.94</i>	<i>1.65E+00</i>	<i>1.14</i>
H329 Hβ-Hβ'	<i>1.92E+01</i>	<i>0.73</i>	<i>0.05</i>	<i>1.92E+01</i>	<i>0.68</i>	<i>1.92E+01</i>	<i>0.62</i>	<i>1.92E+01</i>	<i>0.76</i>
Y316 Hβ-Hα	4.30E-03	2.94	0.21	4.30E-03	2.75	4.30E-03	2.52	4.30E-03	3.07
Y316 Hβ-Hα	6.40E-03	2.76	0.19	6.40E-03	2.57	6.40E-03	2.36	6.40E-03	2.87
H329 Hβ-Hα	2.90E-03	3.14	0.22	2.90E-03	2.94	2.90E-03	2.70	2.90E-03	3.28
A317 NH-Hβ	5.23E-03	2.85	0.20	5.23E-03	2.66	5.23E-03	2.44	5.23E-03	2.97
A317 NH-T318 Hβ	4.77E-03	2.89	0.20	4.77E-03	2.70	4.77E-03	2.48	4.77E-03	3.02
A317 NH-Y316 Hα	6.96E-03	2.72	0.19	6.96E-03	2.54	6.96E-03	2.33	6.96E-03	2.84
C330 CONH <sub>2</sub> -Hα	3.22E-03	3.09	0.22	3.22E-03	2.89	3.22E-03	2.65	3.22E-03	3.22
<b>C330 Hβ-C296 Hβ</b>	6.98E-01	1.26	0.09	6.98E-01	1.18	6.98E-01	1.08	6.98E-01	1.32
D320 NH-G319 Hα	5.03E-03	2.87	0.20	5.03E-03	2.68	5.03E-03	2.46	5.03E-03	2.99
D320 NH-Hβ'	3.26E-03	3.08	0.22	3.26E-03	2.88	3.26E-03	2.64	3.26E-03	3.22
D320 NH-I321 NH	5.84E-03	2.80	0.20	5.84E-03	2.61	5.84E-03	2.40	5.84E-03	2.92
D324 NH-G323 Hα	6.98E-03	2.72	0.19	6.98E-03	2.54	6.98E-03	2.33	6.98E-03	2.83
D324 NH-Hβ	3.24E-03	3.09	0.22	3.24E-03	2.88	3.24E-03	2.65	3.24E-03	3.22
D324 NH-I325 NH	1.52E-02	2.39	0.17	1.52E-02	2.23	1.52E-02	2.05	1.52E-02	2.49
G323 NH-Hα	1.99E-02	2.28	0.16	1.99E-02	2.13	1.99E-02	1.96	1.99E-02	2.38
G323 NH-I322 Hβ	2.33E-03	3.26	0.23	2.33E-03	3.05	2.33E-03	2.79	2.33E-03	3.40
I321 NH-D320 Hβ	1.56E-03	3.49	0.25	1.56E-03	3.26	1.56E-03	2.99	1.56E-03	3.64
I321 NH-Hγ	4.35E-03	2.94	0.21	4.35E-03	2.74	4.35E-03	2.52	4.35E-03	3.07
I321 NH-I322 NH	2.93E-01	1.46	0.10	2.93E-01	1.36	2.93E-01	1.25	2.93E-01	1.52
I322 NH-G323 NH	8.01E-03	2.65	0.19	8.01E-03	2.48	8.01E-03	2.28	8.01E-03	2.77
I322 NH-Hβ	8.22E-03	2.64	0.19	8.22E-03	2.47	8.22E-03	2.27	8.22E-03	2.76
I322 NH-I321 Hα	1.52E-02	2.39	0.17	1.52E-02	2.23	1.52E-02	2.04	1.52E-02	2.49
I325 NH-D324 Hα	1.11E-02	2.51	0.18	1.11E-02	2.35	1.11E-02	2.15	1.11E-02	2.62
I325 NH-Hβ	7.28E-03	2.70	0.19	7.28E-03	2.52	7.28E-03	2.31	7.28E-03	2.81
I325 NH-Hγ'	5.01E-03	2.87	0.20	5.01E-03	2.68	5.01E-03	2.46	5.01E-03	2.99
I325 NH-R326 NH	7.79E-03	2.67	0.19	7.79E-03	2.49	7.79E-03	2.29	7.79E-03	2.78
I3215 NH-D324 Hβ'	1.55E-03	3.49	0.25	1.55E-03	3.26	1.55E-03	2.99	1.55E-03	3.64
N301 NH-Hβ	3.98E-03	2.98	0.21	3.98E-03	2.79	3.98E-03	2.56	3.98E-03	3.11

Protonenpaar	C330 CONH <sub>2</sub>			C330 Hβ'/Hβ		C330 Hβ/Hβ'		Y316 Hδ/Hε	
	σ	Abstand [Å]	Fehler [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]
N301 NH-N300 Hα	7.77E-03	2.67	0.19	7.77E-03	2.49	7.77E-03	2.29	7.77E-03	2.78
N301 NH-N302 NH	2.91E+00	0.99	0.07	2.91E+00	0.93	2.91E+00	0.85	2.91E+00	1.04
N302 NH-Hβ'	6.12E-03	2.78	0.20	6.12E-03	2.59	6.12E-03	2.38	6.12E-03	2.90
N302 NH-N301 Hα	7.22E-03	2.70	0.19	7.22E-03	2.52	7.22E-03	2.31	7.22E-03	2.82
N302 NH-T303 NH	2.84E-03	3.15	0.22	2.84E-03	2.95	2.84E-03	2.70	2.84E-03	3.29
P01 Hδ'-Hδ	1.71E+00	1.09	0.08	1.71E+00	1.01	1.71E+00	0.93	1.71E+00	1.13
P01 Hδ-Hδ'	1.24E-01	1.68	0.12	1.24E-01	1.57	1.24E-01	1.44	1.24E-01	1.75
P01 Hδ'-S306 Hα	5.68E-03	2.81	0.20	5.68E-03	2.63	5.68E-03	2.41	5.68E-03	2.93
P01 Hδ-S306 Hα	9.91E-03	2.56	0.18	9.91E-03	2.39	9.91E-03	2.20	9.91E-03	2.67
P299 Hδ'-Hδ	1.85E-01	1.57	0.11	1.85E-01	1.47	1.85E-01	1.35	1.85E-01	1.64
P299 Hδ'-R298 Hα	8.58E-03	2.62	0.18	8.58E-03	2.45	8.58E-03	2.25	8.58E-03	2.74
P299 Hδ-R298 Hα	1.27E-02	2.46	0.17	1.27E-02	2.30	1.27E-02	2.11	1.27E-02	2.57
Q327 NH-Hβ'	5.16E-03	2.86	0.20	5.16E-03	2.67	5.16E-03	2.45	5.16E-03	2.98
Q327 NH-R326 Hβ	4.19E-03	2.96	0.21	4.19E-03	2.76	4.19E-03	2.53	4.19E-03	3.09
Q327 NH-R326 NH	9.38E-03	2.59	0.18	9.38E-03	2.41	9.38E-03	2.22	9.38E-03	2.70
R298 NH-Hα	4.04E-03	2.97	0.21	4.04E-03	2.78	4.04E-03	2.55	4.04E-03	3.10
R298 NH-Hγ	5.44E-03	2.83	0.20	5.44E-03	2.64	5.44E-03	2.43	5.44E-03	2.95
S02 NH-Hβ	3.54E-03	3.04	0.21	3.54E-03	2.84	3.54E-03	2.61	3.54E-03	3.17
S02 NH-Y316 NH	2.76E-03	3.17	0.22	2.76E-03	2.96	2.76E-03	2.72	2.76E-03	3.31
S02 NH-P01 Hβ	3.20E-04	4.54	0.32	3.20E-04	4.24	3.20E-04	3.89	3.20E-04	4.74
T297 NH-C296 Hβ'	2.31E-03	3.27	0.23	2.31E-03	3.05	2.31E-03	2.80	2.31E-03	3.41
T297 NH-Hβ	2.64E-03	3.19	0.22	2.64E-03	2.98	2.64E-03	2.74	2.64E-03	3.33
T303 NH-Hα	8.87E-03	2.61	0.18	8.87E-03	2.44	8.87E-03	2.24	8.87E-03	2.72
T303 NH-N302 Hα	6.98E-03	2.72	0.19	6.98E-03	2.54	6.98E-03	2.33	6.98E-03	2.83
T303 NH-N302 Hβ	1.15E-03	3.67	0.26	1.15E-03	3.43	1.15E-03	3.15	1.15E-03	3.83
T303 NH-N302 Hβ'	1.29E-03	3.60	0.25	1.29E-03	3.36	1.29E-03	3.09	1.29E-03	3.76
T303 NH-R304 NH	2.29E-02	2.23	0.16	2.29E-02	2.08	2.29E-02	1.91	2.29E-02	2.32
T318 NH-A317 Hβ	1.62E-03	3.46	0.24	1.62E-03	3.24	1.62E-03	2.97	1.62E-03	3.61
T318 NH-G319 NH	3.30E-03	3.08	0.22	3.30E-03	2.87	3.30E-03	2.64	3.30E-03	3.21
T318 NH-Hβ	2.47E-03	3.23	0.23	2.47E-03	3.02	2.47E-03	2.77	2.47E-03	3.37
Y316 NH-A317 Hβ	1.58E-03	3.48	0.24	1.58E-03	3.25	1.58E-03	2.98	1.58E-03	3.63
Y316 NH-A317 NH	2.36E-02	2.22	0.16	2.36E-02	2.07	2.36E-02	1.90	2.36E-02	2.31
Y316 NH-Hβ	2.56E-03	3.21	0.23	2.56E-03	3.00	2.56E-03	2.75	2.56E-03	3.35
Y316 NH-S02 Hβ	1.85E-03	3.39	0.24	1.85E-03	3.17	1.85E-03	2.91	1.85E-03	3.54

## 10.2 Experimentell bestimmte Protonenabstände von P4

**Tabelle 22:** Berechnete Korrelationskonstanten und Abstände sämtlicher für die Konformationsanalyse verwendeten Protonenpaare des Peptids **P4**. Die Referenzprotonenpaare sind grün dargestellt und die Referenzdaten der jeweiligen Spalte sind fett gedruckt. Die unsinnigen Referenzdaten sind kursiv gedruckt. Grau sind Protonenpaare dargestellt, deren Werte zu klein sind, um sinnvoll zu sein und die für die Abstandsbeschränkungen auf 1.8-5.0 Å gesetzt wurden. *Long-range*-Kontakte sind violett. Der Fehler ist die Standardabweichung, basierend auf den Werten der anderen Referenzprotonen.

Protonenpaar	C330 CONH <sub>2</sub>			C330 Hβ'/Hβ		C330 Hβ/Hβ'		Y316 Hδ/He	
	σ	Abstand [Å]	Fehler	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]
<b>C330 CONH<sub>2</sub></b>	<b>8.37E-02</b>	<b>1.75</b>	<b>0.14</b>	<i>8.37E-02</i>	<i>1.57</i>	<i>8.37E-02</i>	<i>1.62</i>	<i>8.37E-02</i>	<i>1.94</i>
<i>C330 Hβ'-Hβ</i>	<i>5.23E-02</i>	<i>1.89</i>	0.15	<b>5.23E-02</b>	<b>1.70</b>	<i>5.23E-02</i>	<i>1.75</i>	<i>5.23E-02</i>	<i>2.09</i>
<i>C330 Hβ-Hβ'</i>	<i>6.21E-02</i>	<i>1.84</i>	0.15	<i>6.21E-02</i>	<i>1.65</i>	<b>6.21E-02</b>	<b>1.70</b>	<i>6.21E-02</i>	<i>2.03</i>
<i>Y316 Hδ-He</i>	<i>2.03E-02</i>	<i>2.22</i>	0.18	<i>2.03E-02</i>	<i>1.99</i>	<i>2.03E-02</i>	<i>2.05</i>	<b>2.03E-02</b>	<b>2.45</b>
<i>Y316 Hδ-Hδ'</i>	<i>1.57E+00</i>	<i>1.07</i>	0.09	<i>1.57E+00</i>	<i>0.96</i>	<i>1.57E+00</i>	<i>0.99</i>	<i>1.57E+00</i>	<i>1.19</i>
<i>H329 Hδ-Hδ'</i>	<i>4.33E-03</i>	<i>2.87</i>	0.23	<i>4.33E-03</i>	<i>2.58</i>	<i>4.33E-03</i>	<i>2.65</i>	<i>4.33E-03</i>	<i>3.17</i>
<i>C330 Hβ-C296 Hβ</i>	1.05E-01	1.68	0.14	1.05E-01	1.51	1.05E-01	1.56	1.05E-01	1.86
N300 NH-N301 NH	1.10E+02	0.53	0.04	1.10E+02	0.48	1.10E+02	0.49	1.10E+02	0.59
A317 NH-Hβ	6.92E-03	2.65	0.21	6.92E-03	2.38	6.92E-03	2.45	6.92E-03	2.93
A317 NH-Y316 Hα	8.07E-03	2.58	0.21	8.07E-03	2.32	8.07E-03	2.39	8.07E-03	2.86
A317 NH-Y316 Hβ'	2.53E-03	3.14	0.25	2.53E-03	2.82	2.53E-03	2.90	2.53E-03	3.47
C296 Hβ'-C330 Hβ'	6.82E-02	1.81	0.15	6.82E-02	1.63	6.82E-02	1.67	6.82E-02	2.00
C330 CONH <sub>2</sub> -Hα	3.93E-03	2.91	0.24	3.93E-03	2.62	3.93E-03	2.69	3.93E-03	3.22
C330 CONH <sub>2</sub> -NH	1.82E-02	2.26	0.18	1.82E-02	2.03	1.82E-02	2.09	1.82E-02	2.50
C330 NH-CONH <sub>2</sub>	7.69E-03	2.60	0.21	7.69E-03	2.34	7.69E-03	2.41	7.69E-03	2.88
C330 NH-H329 Hα	1.57E-02	2.31	0.19	1.57E-02	2.08	1.57E-02	2.14	1.57E-02	2.56
C330 NH-Hβ	8.84E-03	2.55	0.21	8.84E-03	2.29	8.84E-03	2.35	8.84E-03	2.82
C330 NH-T297 Hα	1.80E-01	1.54	0.12	1.80E-01	1.38	1.80E-01	1.42	1.80E-01	1.70
<i>GlcNAc' H3-R298 Hδ</i>	1.29E-02	2.39	0.19	1.29E-02	2.15	1.29E-02	2.21	1.29E-02	2.64
GlcNAc NH-H2	1.20E-02	2.42	0.20	1.20E-02	2.17	1.20E-02	2.24	1.20E-02	2.68
GlcNAc NH-N301 Hα	7.40E-03	2.62	0.21	7.40E-03	2.36	7.40E-03	2.42	7.40E-03	2.90
GlcNAc NH-N301 Hβ	9.61E-03	2.51	0.20	9.61E-03	2.25	9.61E-03	2.32	9.61E-03	2.78
GlcNAc NHAc-H1	3.90E-03	2.92	0.24	3.90E-03	2.62	3.90E-03	2.70	3.90E-03	3.23
GlcNAc NHAc-H2	5.34E-03	2.77	0.22	5.34E-03	2.49	5.34E-03	2.56	5.34E-03	3.06
H329 NH-A328 Hα	1.31E-02	2.38	0.19	1.31E-02	2.14	1.31E-02	2.20	1.31E-02	2.64
H329 NH-A328 Hβ	7.19E-03	2.63	0.21	7.19E-03	2.37	7.19E-03	2.43	7.19E-03	2.91
H329 NH-A328 NH	8.42E-03	2.57	0.21	8.42E-03	2.31	8.42E-03	2.37	8.42E-03	2.84
H329 NH-Hβ'	6.21E-03	2.70	0.22	6.21E-03	2.42	6.21E-03	2.49	6.21E-03	2.99
H329 NH-Hζ	1.83E-02	2.26	0.18	1.83E-02	2.03	1.83E-02	2.08	1.83E-02	2.49
I321 NH-D320 Hα	2.53E-02	2.14	0.17	2.53E-02	1.92	2.53E-02	1.97	2.53E-02	2.36
I321 NH-Hβ	1.07E-02	2.46	0.20	1.07E-02	2.21	1.07E-02	2.28	1.07E-02	2.73
I321 NH-I322 NH	2.96E-02	2.08	0.17	2.96E-02	1.87	2.96E-02	1.92	2.96E-02	2.30
I322 NH-G323 NH	7.91E-03	2.59	0.21	7.91E-03	2.33	7.91E-03	2.40	7.91E-03	2.87
I322 NH-Hβ	9.25E-03	2.53	0.20	9.25E-03	2.27	9.25E-03	2.33	9.25E-03	2.79
I322 NH-I321 Hα	1.73E-02	2.28	0.18	1.73E-02	2.04	1.73E-02	2.10	1.73E-02	2.52

Protonenpaar	C330 CONH <sub>2</sub>			C330 Hβ'/Hβ		C330 Hβ/Hβ'		Y316 Hδ/Hε	
	σ	Abstand [Å]	Fehler	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]
I325 NH-D324 Hα	1.27E-02	2.40	0.19	1.27E-02	2.15	1.27E-02	2.21	1.27E-02	2.65
I325 NH-Hβ	9.21E-03	2.53	0.20	9.21E-03	2.27	9.21E-03	2.34	9.21E-03	2.80
I325 NH-R326 NH	6.52E-03	2.68	0.22	6.52E-03	2.41	6.52E-03	2.48	6.52E-03	2.96
I3215 NH-D324 Hβ	4.90E-03	2.81	0.23	4.90E-03	2.52	4.90E-03	2.60	4.90E-03	3.11
N300 NH-Hα	6.48E-03	2.68	0.22	6.48E-03	2.41	6.48E-03	2.48	6.48E-03	2.96
N300 NH-N301 Hα	4.55E-03	2.84	0.23	4.55E-03	2.55	4.55E-03	2.63	4.55E-03	3.14
N300 NH-P299 Hα	1.76E-02	2.27	0.18	1.76E-02	2.04	1.76E-02	2.10	1.76E-02	2.51
N301 NH-GlcNAc NH	6.20E-03	2.70	0.22	6.20E-03	2.43	6.20E-03	2.50	6.20E-03	2.99
N301 NH - Hβ'	1.22E-02	2.41	0.19	1.22E-02	2.17	1.22E-02	2.23	1.22E-02	2.67
N301 NH-N300 Hα	1.19E-02	2.42	0.20	1.19E-02	2.18	1.19E-02	2.24	1.19E-02	2.68
N301 NH-N302 Hα	1.25E-02	2.40	0.19	1.25E-02	2.16	1.25E-02	2.22	1.25E-02	2.66
N301 NH-N302 NH	5.42E-02	1.88	0.15	5.42E-02	1.69	5.42E-02	1.74	5.42E-02	2.08
N301 NH-P299 Hα	5.62E-03	2.74	0.22	5.62E-03	2.47	5.62E-03	2.54	5.62E-03	3.04
N302 NH-Hβ	6.78E-03	2.66	0.21	6.78E-03	2.39	6.78E-03	2.46	6.78E-03	2.94
N302 NH-N301 Hα	6.78E-03	2.66	0.21	6.78E-03	2.39	6.78E-03	2.46	6.78E-03	2.94
N302 NH-T303 NH	9.01E-03	2.54	0.20	9.01E-03	2.28	9.01E-03	2.35	9.01E-03	2.81
P299 Hδ'-R298 Hα	2.38E-02	2.16	0.17	2.38E-02	1.94	2.38E-02	2.00	2.38E-02	2.39
P299 Hδ-R298 Hα	2.48E-02	2.14	0.17	2.48E-02	1.93	2.48E-02	1.98	2.48E-02	2.37
Q327 NH-A328 NH	3.06E-02	2.07	0.17	3.06E-02	1.86	3.06E-02	1.91	3.06E-02	2.29
Q327 NH-Hβ'	6.40E-03	2.69	0.22	6.40E-03	2.41	6.40E-03	2.48	6.40E-03	2.97
Q327 NH-R326 Hβ	3.37E-03	2.99	0.24	3.37E-03	2.69	3.37E-03	2.76	3.37E-03	3.31
R298 NH-Hβ	6.64E-03	2.67	0.22	6.64E-03	2.40	6.64E-03	2.47	6.64E-03	2.95
R298 NH-T297 Hα	1.65E-02	2.29	0.19	1.65E-02	2.06	1.65E-02	2.12	1.65E-02	2.54
R298 NH-T297 Hβ	3.08E-03	3.03	0.24	3.08E-03	2.73	3.08E-03	2.80	3.08E-03	3.36
R298 NH-T297 Hβ'	5.09E-03	2.79	0.23	5.09E-03	2.51	5.09E-03	2.58	5.09E-03	3.09
R304 NH-Hβ	1.01E-02	2.49	0.20	1.01E-02	2.24	1.01E-02	2.30	1.01E-02	2.75
R304 NH-T303 Hβ	1.82E-03	3.31	0.27	1.82E-03	2.98	1.82E-03	3.06	1.82E-03	3.66
R304 NH-T303 NH	4.16E-03	2.89	0.23	4.16E-03	2.59	4.16E-03	2.67	4.16E-03	3.19
S02 NH-Hβ	5.69E-03	2.74	0.22	5.69E-03	2.46	5.69E-03	2.53	5.69E-03	3.03
S02 NH-P01 Hα	1.08E-02	2.46	0.20	1.08E-02	2.21	1.08E-02	2.28	1.08E-02	2.72
S02 NH-Y316 NH	2.93E-03	3.06	0.25	2.93E-03	2.75	2.93E-03	2.83	2.93E-03	3.38
T297 Hβ-P299 Hδ	3.12E-02	2.06	0.17	3.12E-02	1.85	3.12E-02	1.91	3.12E-02	2.28
T297 NH-C296 Hα	1.64E-02	2.30	0.19	1.64E-02	2.06	1.64E-02	2.12	1.64E-02	2.54
T297 NH-C296 Hβ	2.88E-03	3.07	0.25	2.88E-03	2.76	2.88E-03	2.84	2.88E-03	3.39
T297 NH-Hβ	6.27E-03	2.69	0.22	6.27E-03	2.42	6.27E-03	2.49	6.27E-03	2.98
T297 NH-R298 NH	8.62E-03	2.56	0.21	8.62E-03	2.30	8.62E-03	2.36	8.62E-03	2.83
T303 NH-Hβ'	7.59E-03	2.61	0.21	7.59E-03	2.35	7.59E-03	2.41	7.59E-03	2.89
T303 NH-N302 Hα	1.47E-02	2.34	0.19	1.47E-02	2.10	1.47E-02	2.16	1.47E-02	2.59
T303 NH-N302 Hβ	3.43E-03	2.98	0.24	3.43E-03	2.68	3.43E-03	2.75	3.43E-03	3.30
T303 NH-R304 NH	8.74E-03	2.55	0.21	8.74E-03	2.29	8.74E-03	2.36	8.74E-03	2.82
T318 NH-A317 Hα	1.49E-02	2.33	0.19	1.49E-02	2.10	1.49E-02	2.16	1.49E-02	2.58
T318 NH-G319 NH	3.13E-03	3.03	0.24	3.13E-03	2.72	3.13E-03	2.80	3.13E-03	3.35
T318 NH-Hβ	3.16E-03	3.02	0.24	3.16E-03	2.71	3.16E-03	2.79	3.16E-03	3.34
Y316 Hβ-Hδ	6.36E-03	2.69	0.22	6.36E-03	2.42	6.36E-03	2.48	6.36E-03	2.97

Protonenpaar	C330 CONH <sub>2</sub>			C330 Hβ'/Hβ		C330 Hβ/Hβ'		Y316 Hδ/He	
	σ	Abstand [Å]	Fehler	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]	σ	Abstand [Å]
Y316 Hβ-NH	3.14E-03	3.02	0.24	3.14E-03	2.72	3.14E-03	2.79	3.14E-03	3.34
Y316 NH-A317 NH	7.42E-03	2.62	0.21	7.42E-03	2.35	7.42E-03	2.42	7.42E-03	2.90
Y316 NH-Hβ	3.29E-03	3.00	0.24	3.29E-03	2.70	3.29E-03	2.77	3.29E-03	3.32
Y316 NH-S02 Hβ	7.36E-02	1.79	0.14	7.36E-02	1.61	7.36E-02	1.65	7.36E-02	1.98
Y316 Hδ-Hα	7.65E-03	2.61	0.21	7.65E-03	2.34	7.65E-03	2.41	7.65E-03	2.88
Y316 Hδ-Hβ	1.08E-02	2.46	0.20	1.08E-02	2.21	1.08E-02	2.28	1.08E-02	2.72

### 10.3 φ-Winkel der experimentellen und berechneten Strukturen von P3

**Tabelle 23:** φ-Winkel der experimentellen sowie der berechneten P3-Strukturen vor und nach der MD-Simulation im Vergleich mit den gesetzten Winkelbeschränkungen. Grün hinterlegt sind die Winkel, die innerhalb der Winkelbeschränkung liegen, gelb die, die bis zu maximal 10° außerhalb der Beschränkung liegen.

Aminosäure	Winkelbeschränkung [°]	P3 experimentell [°]	P3 berechnet vor Simulation [°]	P3 berechnet nach Simulation [°]
T297	-164 bis -134	-114	-107	-78
R298	-174 bis -144	-141	-82	-75
N300	-166 bis -136	-126	-84	-94
N301	-171 bis -141	-159	-72	-79
N302	-173 bis -143	-164	-87	-78
T303	-160 bis -130	-143	-71	-129
R304	-157 bis -127	-151	-140	-102
K305	-159 bis -129	-116	-74	-84
S306	-176 bis -146	-144	-60	-105
S02	-173 bis -143	-159	86	-80
Y316	-169 bis -139	-125	77	79
A317	-180 bis -150	-139	-89	-92
T318	-100 bis -67	-80	-79	-60
G319	-180 bis -151	-135	-85	-93
D320	-172 bis -142	-131	-83	-105
I321	-147 bis -117	-110	-71	-113
I322	-114 bis -76	-79	-111	-120
G323	-180 bis -154	164	145	-86
D324	-172 bis -142	-132	-82	-85
I325	-154 bis -124	-131	-137	-113
R326	-118 bis -79	-79	-145	-91
Q327	-163 bis -133	-150	-72	-63
A328	-161 bis -131	-152	-121	-163
H329	-165 bis -135	-150	-107	-86

Aminosäure	Winkelbeschränkung [°]	P3 experimentell [°]	P3 berechnet vor Simulation [°]	P3 berechnet nach Simulation [°]
C330	-165 bis -135	-142	-144	179

#### 10.4 $\phi$ -Winkel der experimentellen und berechneten Strukturen von P4

**Tabelle 24:**  $\phi$ -Winkel der experimentellen sowie der berechneten P4-Strukturen vor und nach der MD-Simulation im Vergleich mit den gesetzten Winkelbeschränkungen. Grün hinterlegt sind die Winkel, die innerhalb der Winkelbeschränkung liegen, gelb die, die bis zu maximal 10° außerhalb der Beschränkung liegen.

Aminosäure	Winkelbeschränkung [°]	P4 experimentell [°]	P4 berechnet vor Simulation [°]	P4 berechnet nach Simulation [°]
T297	-165 bis -133	-161	-50	-142
R298	-93 bis -63	-105	-97	-67
N300	-178 bis -148	-158	-117	-145
N301	-171 bis -141	-139	-27	-115
N302	-174 bis -144	-149	-65	-66
T303	-104 bis -74	-63	-81	-86
R304	-180 bis -0	-139	-154	-80
K305	-157 bis -127	-138	-100	-152
S306	-174 bis -144	-143	-93	-159
S02	-167 bis -137	-95	102	80
Y316	-171 bis -141	-102	76	88
A317	-180 bis -153	-107	-51	-67
T318	-177 bis -147	-99	-112	-65
G319	-174 bis -144	-92	-77	-102
D320	-173 bis -143	-145	-82	-106
I321	-150 bis -120	-124	-121	-83
I322	-180 bis -0	-91	-123	-129
G323	-180 bis -0	-89	114	116
D324	-178 bis -148	-147	-80	-56
I325	-162 bis -132	-107	-131	-69
R326	-150 bis -120	-99	-105	-82
Q327	-158 bis -128	-133	-67	-127
A328	-165 bis -135	-97	-73	-113
H329	-96 bis -66	-68	-135	-70
C330	-169 bis -139	-140	177	-173

## 10.5 Kontakte zwischen dem Nonasaccharid-V3-Loop und dem CCR5-Rezeptor

**Tabelle 25:** Kontakte zwischen dem peptidischen Teil des Nonasaccharid-V3-Loops und dem CCR5-Rezeptor der 3 ns dauernden MD-Simulation zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Grau hinterlegt sind gleichbleibende Kontakte, rot sind Kontakte, die eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen und blau die, die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen.

V3-Loop Aminosäure	0-ns-Frame	1.5-ns-Frame	3-ns-Frame
<b>N301</b>		P19 3.8 Å	
<b>T303</b>		P19 3.7 Å	P19 4.0 Å E172 3.9 Å
<b>R304</b>	P19 3.6 Å	<b>E172</b> 2.7 Å P19 3.5 Å	<b>E172</b> 2.6 Å P19 3.5 Å
<b>K305</b>	Y184 3.4 Å P19 4.0 Å	Y184 3.2 Å	Y184 3.1 Å <b>Q170</b> 2.8 Å
<b>S306</b>	Y184 3.8 Å	Y184 3.9 Å Q170 3.2 Å Y187 3.6 Å	<b>H181</b> 2.9 Å Q170 3.7 Å
<b>P01</b>	Y187 3.2 Å E262 3.5 Å	Y187 3.6 Å K22 3.0 Å	Y187 3.4 Å <b>K22</b> 2.8 Å
<b>S02</b>	<b>D276</b> 2.6 Å	<b>D276</b> 2.5 Å <b>N258</b> 2.9 Å Y187 3.8 Å K22 3.6 Å	<b>D276</b> 3.5 Å N258 2.8 Å Y187 3.9 Å
<b>Y316</b>	H181 3.6 Å	<b>H181</b> 3.2 Å S180 3.3 Å Y187 3.0 Å <b>S179</b> 2.8 Å <b>D276</b> 2.7 Å K22 3.9 Å Q170 4.0 Å	<b>H181</b> 3.7 Å S180 3.8 Å Y187 3.5 Å S179 3.2 Å <b>D276</b> 3.1 Å M279 3.4 Å
<b>A317</b>	K26 3.6 Å N24 3.8 Å	K22 3.8 Å N24 3.5 Å D276 3.9 Å I23 3.5 Å V25 3.4 Å	K22 3.7 Å N24 3.6 Å D276 4.0 Å
<b>T318</b>	T177 3.2 Å E172 3.5 Å H175 3.7 Å	T177 3.7 Å N24 3.6 Å K26 3.6 Å V25 3.8 Å	Q280 3.5 Å <b>N24</b> 3.1 Å
<b>G319</b>	E172 3.7 Å	E172 3.8 Å N24 3.3 Å T177 3.5 Å	E172 3.8 Å N24 3.4 Å T177 3.9 Å
<b>D320</b>	<b>H175</b> 2.9 Å G173 3.3 Å <b>L174</b> 2.9 Å	<b>H175</b> 2.6 Å G173 3.9 Å E172 3.6 Å	<b>H175</b> 2.6 Å Q27 4.0 Å E172 3.5 Å
<b>I322</b>		G173 3.9 Å L174 3.7 Å	G173 3.6 Å

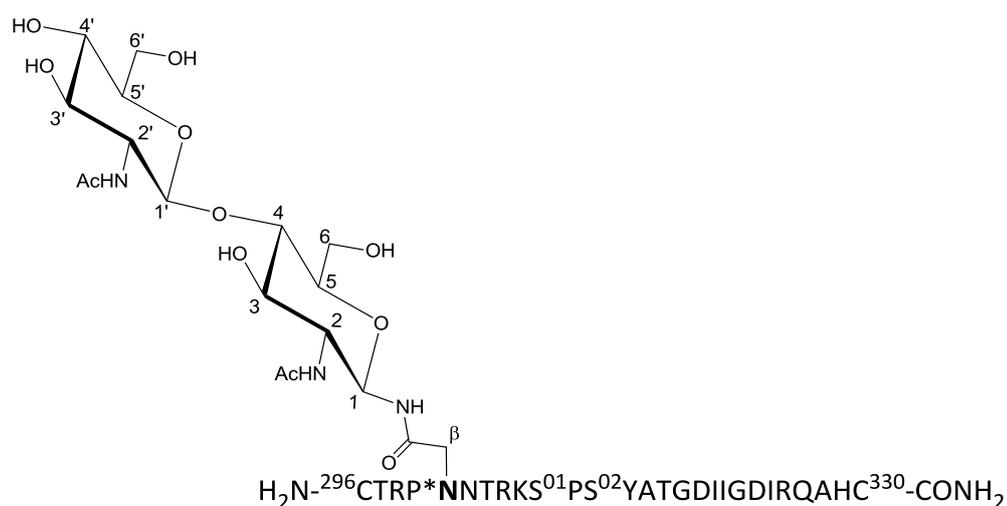
## 10.6 Kontakte zwischen dem nativen V3-Loop und dem CCR5-Rezeptor

**Tabelle 26:** Kontakte zwischen dem peptidischen Teil des nativen V3-Loops und dem CCR5-Rezeptor der 3 ns dauernden MD-Simulation zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Grau hinterlegt sind gleichbleibende Kontakte, rot sind Kontakte, die eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen und kursiv die, die ionische Wechselwirkungen eingehen.

V3-Loop Aminosäure	0-ns-Frame		1.5-ns-Frame		3-ns-Frame	
<b>R304</b>			<i>E172</i>	2.6 Å	<i>E172</i>	2.5 Å
			Q170	3.7 Å		
<b>S306</b>			N24	3.9 Å		
<b>I307</b>			N24	3.8 Å	N24	3.6 Å
<b>H308</b>	N24	3.6 Å	N24	3.5 Å	N24	3.6 Å
	K26	4.0 Å	I23	3.5 Å	I23	4.0 Å
			K22	3.7 Å	K22	4.0 Å
			Q280	3.6 Å	Q280	3.3 Å
<b>I309</b>	Y89	3.5 Å	Y89	3.6 Å	<i>Y89</i>	2.5 Å
	K26	3.7 Å	S179	3.5 Å	S179	3.8 Å
			T177	3.6 Å	T177	3.9 Å
			C178	3.9 Å	C178	3.3 Å
<b>G310</b>	<i>Y89</i>	2.9 Å	<i>S180</i>	2.8 Å	S180	3.7 Å
			<i>S179</i>	3.0 Å	S179	3.5 Å
			C178	3.4 Å		
<b>P311</b>	<i>S179</i>	2.7 Å	S180	3.9 Å	S180	3.4 Å
	E283	3.4 Å	E283	3.8 Å	E283	3.4 Å
	Q280	3.6 Å	W86	3.9 Å	W86	3.8 Å
					Y108	3.4 Å
				T105	3.6 Å	
<b>G312</b>	S180	3.2 Å	M279	3.5 Å	Y251	3.9 Å
	S179	3.6 Å	T282	4.0 Å		
	H181	3.6 Å				
<b>R313</b>	<i>D276</i>	2.8 Å	<i>D276</i>	2.6 Å	<i>D276</i>	2.7 Å
	N258	3.1 Å	N258	2.7 Å	S180	3.5 Å
	M279	3.8 Å	M279	3.6 Å	M279	3.6 Å
	S179	3.5 Å			Y187	3.0 Å
	Q280	3.9 Å				
<b>A314</b>	E172	3.6 Å	S180	3.3 Å	<i>S180</i>	2.9 Å
	T177	3.9 Å	H181	3.6 Å	H181	3.7 Å
			S179	3.6 Å		
<b>F315</b>	K22	3.7 Å	K22	3.7 Å		
	D276	3.4 Å				
	Q280	3.2 Å				
<b>Y316</b>	<i>K22</i>	2.7 Å	K22	4.0 Å		
	Q21	3.7 Å				
<b>A317</b>	E172	3.7 Å	<i>Q170</i>	3.2 Å		
<b>T318</b>			H181	3.2 Å	H181	3.6 Å
<b>G319</b>			H181	3.9 Å	<i>H181</i>	3.1 Å

V3-Loop Aminosäure	0-ns-Frame	1.5-ns-Frame		3-ns-Frame	
G319		R168	3.6 Å	R168	3.6 Å
		Q170	2.7 Å		
		Q172	3.9 Å		
D320		R168	2.5 Å	R168	2.6 Å
I322		E172	3.6 Å		

## 10.7 Charakterisierung des Deletionspeptids (13)



Farbloser Feststoff

Summenformel:  $\text{C}_{146}\text{H}_{243}\text{N}_{45}\text{O}_{50}\text{S}_4$

Molmasse: 3554.67 g/mol

ESI-MS:  $m/z = 1185.9017$   $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  (gef.), 1185.8986 (ber.);  $889.6780$   $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$  (gef.), 889.6757 (ber.);  $711.9453$   $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$  (gef.), 711.9420 (ber.);  $593.4545$   $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$  (gef.), 593.4529 (ber.)

**Tabelle 27:**  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung [ppm] von (13) in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 1.9. Das Spektrum wurde bei 300 K an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen und auf HDO bei 4.746 ppm kalibriert.

	NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\beta'$	H $\gamma$	H $\gamma'$	H $\delta$	H $\delta'$	Sonstige
<b>C<sub>296</sub></b>	-	4.321	3.234	3.192	-	-	-	-	*StBu: 1.257
<b>T<sub>297</sub></b>	8.722	4.374	4.042	-	1.142	-	-	-	-
<b>R<sub>298</sub></b>	8.498	4.532	1.790	1.790	1.669	1.625	3.142	3.142	H $\epsilon$ : 7.144
<b>P<sub>299</sub></b>	-	4.335	2.231	1.959	1.959	1.837	3.720	3.577	-
<b>N<sub>301</sub></b>	8.548	4.643	2.784	2.714	-	-	8.623	-	-
<b>N<sub>302</sub></b>	8.338	4.703	2.780	2.721	-	-	7.544	6.835	-

	NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\beta'$	H $\gamma$	H $\gamma'$	H $\delta$	H $\delta'$	Sonstige
T <sub>303</sub>	8.094	4.216	4.142	-	1.131	-	-	-	-
R <sub>304</sub>	8.266	4.246	1.770	1.691	1.570	1.528	3.122	3.122	He: 7.098
K <sub>305</sub>	8.323	4.271	1.735	1.653	1.363	1.327	1.584	1.584	He: 2.909, H $\zeta$ : 7.445
S <sub>306</sub>	8.338	4.667	3.799	3.765	-	-	-	-	-
P <sub>001</sub>	-	4.355	2.166	1.933	1.933	1.688	3.655	3.763	-
S <sub>002</sub>	8.225	4.317	3.718	3.718	-	-	-	-	-
Y <sub>316</sub>	8.022	4.523	3.017	2.885	-	-	7.054	7.054	He: 6.750, 6.752
A <sub>317</sub>	8.128	4.315	1.300	-	-	-	-	-	-
T <sub>318</sub>	8.014	4.233	4.186	-	1.160	-	-	-	-
G <sub>319</sub>	8.306	3.906	-	-	-	-	-	-	-
D <sub>320</sub>	8.253	4.658	2.829	2.749	-	-	-	-	-
I <sub>321</sub>	8.081	4.106	1.816	-	1.386	1.102	0.777	-	$\gamma''$ : 0.795
I <sub>322</sub>	8.152	4.059	1.793	-	1.412	1.133	0.783	-	$\gamma''$ : 0.841
G <sub>323</sub>	8.343	3.870	-	-	-	-	-	-	-
D <sub>324</sub>	8.224	4.660	2.849	2.779	-	-	-	-	-
I <sub>325</sub>	8.038	4.074	1.832	-	1.399	1.131	0.790	-	$\gamma''$ : 0.828
R <sub>326</sub>	8.311	4.245	1.771	1.699	1.585	1.529	3.128	3.128	He: 7.138
Q <sub>327</sub>	8.212	4.232	2.017	1.893	2.212	2.212	-	-	He: 7.473, 6.828
A <sub>328</sub>	8.255	4.183	1.280	-	-	-	-	-	-
H <sub>329</sub>	8.459	4.642	3.223	3.144	-	-	7.244	-	H $\zeta$ : 8.552
C <sub>330</sub>	8.348	4.551	3.116	2.945	-	-	-	-	CONH <sub>2</sub> : 7.615, 7.157, *StBu: 1.257

\*: Die Signale der <sup>t</sup>Butylthiogruppen konnten nicht anhand von NOE-Kontakten validiert werden.

	NH	NHAc	1	2	3 / 4 / 5 <sup>§</sup>	6	NHAc
GlcNAc	8.623	8.158	4.978	3.789	3.689 / 3.579 / 3.478	*	1.941
GlcNAc'	-	8.333	4.523	3.683	3.858 / 3.500 / 3.424	*	1.997

\*Signale sind von anderen Protonen überlagert

§ Signale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden

## 11 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich gerne bei allerhand Menschen bedanken.

Bei Christian will ich mich für all die Liebe, Motivation, Aufmunterung, Ablenkung und unzähligen leckeren Abendessen während meines Studiums und der Doktorarbeitszeit bedanken.

Bei meiner Mutter Karin, bei Moni und Charly und meiner neu dazugewonnenen Familie Pfeifer möchte ich mich für die jahrelange Unterstützung bedanken.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich für all die schönen Erlebnisse und Ablenkungen und den ganzen Quatsch.

Mein Dank gilt weiterhin dem ganzen AK Meyer für die tolle Zeit:

- Patrizia für all die Cupcakes, Madonna-Tanzeinlagen, Entdeck-the-Dreck-Parties, Regenbögen und Glitzer, außerdem für all die Knuddler, die Fürsorge und die fachlichen Diskussionen und Tipps.
- Alena für die Konzerte, all die niedlichen Häschen, ihre liebenswerte Tüdeligkeit und die ganze Hilfe bei dem MS-Kram und der Merck.
- Raffi für seine sehr liebe Art, seine Verpeiltheit, die schöne Zeit in der 13a und als Kollege im Admin-Team.
- Thomas für die vielen Biere, die Konzerte und die Hilfe beim NMR.
- Karsten für ganz viel Gekicher, Macho-Sprüche und die super HPLC-Betreuung.
- Alex für LUIGI, die tieffliegenden Witze und das Admin-Know-How.
- Tim für die Kreuzworträtsel- und Quiz-Runden und all die NMR-Unterstützung und gemessenen MS-Spektren.
- Hinnerk für die Dartrunden und die fachlichen Tipps.
- Wei für seine Ninjahaftigkeit und den leckersten Käsekuchen.
- Moritz für all die gemeinsamen Testpeptide, das NMR-Wissen und als Liberty-Buddy.
- Anna-Lena für all die Pflänzchen, die schöne Zeit in der 13a und das Bemühen um die Biacore J.
- Claas für seine norddeutsche Entspantheit und als Liberty-Buddy.
- Melissa für Ziegenbabies, feuchtfreuliche Abende und die Betreuung der HPLC.
- Martin für sein unglaubliches Lexikonwissen, ein sehr ansteckendes Lachen und die Maestrotipps.
- Anke und Rene für die gemeinsamen Mittagspausen und die Haselnüsse.
- Brita und Ilona für die vielen leckeren Waffeln und dass sie die Muttis und das Herz dieses AKs sind.
- Den Ehemaligen Bea und Katrin für die Aufnahme ins beste Labor 13a und viele versprühte Herzchen, Henning für die bierseligen Kicker- und Kochabende, Kalthi für das Niveau in der Mittagspause und Mo für die gute Laune.

Weiterhin möchte ich meinen Praktikanten Claas und Vanina sowie Insa für die Glycopeptidsynthesen danken.

Ich danke den NMR-Ladies und Thorsten für die gemessenen NMR-Spektren.

Der Massenabteilung danke ich für all die gemessenen MS-Spektren und besonders Dany für die vielen, vielen Wellplates.

Thies Köhli und dem gesamten Arbeitskreis T. Peters der Universität zu Lübeck danke ich für die Möglichkeit die Biacore J nutzen zu können und die nette Zeit.

Dem FACS Sorting Core Unit am UKE danke ich für die Messung der FACS-Proben.

Tim, Claas, Thomas, Karsten, Raffi, Chris und Frau Parsons danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

## 12 Erklärungen

### 12.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

---

Nadja Haberz

Hamburg, 13. Oktober 2016

### 12.2 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass vorher keine anderen Promotionsversuche unternommen worden sind oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

---

Nadja Haberz

Hamburg, 13. Oktober 2016