

Synthese von Peptiden aus dem
N-terminalen Bereich des
humanen CCR5 unter
Verwendung von Sulfotyrosinen
und deren Bindung an das
HIV-1 Glycoprotein GP120.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Thomas Kühnemund
aus Hamburg

Hamburg, 2005



Universität Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans Paulsen

Tag der Disputation: 27.01.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2001 bis August 2005 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die stets wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Der Mensch hat dreierlei Wege klug zu handeln: erstens durch nachdenken, das ist der edelste, zweitens durch nachahmen, das ist der leichteste, und drittens durch Erfahrung, das ist der bitterste.

Konfuzius

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	11
1.1. AIDS.....	11
1.1.1. <i>Der Erreger: HIV</i>	12
1.1.2. <i>HIV-Lebenszyklus</i>	14
1.1.3. <i>Krankheitsverlauf</i>	16
1.1.4. <i>Die Bekämpfung der HIV-Infektion</i>	16
1.2. HIV-ENTRY	18
1.2.1. <i>Membranfusion</i>	18
1.2.2. <i>Das Glycoprotein GP120</i>	19
1.2.3. <i>HIV-Corezeptoren</i>	21
1.2.3.1. CCR5	22
1.2.3.2. Wechselwirkungen des Corezeptors CCR5 mit dem GP120	22
1.2.4. <i>Bedeutung und Vorkommen von Sulfotyrosinen</i>	24
1.2.4.1. Sulfotyrosine im N-Terminus des CCR5	26
1.2.5. <i>HIV-Entry-Inhibitoren</i>	27
2. METHODEN	30
2.1. FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE.....	30
2.2. CHARAKTERISIERUNG UND KONFORMATIONSANALYSE VON PEPTIDEN	33
2.2.1. <i>Massenspektrometrie</i>	33
2.2.2. <i>NMR</i>	34
2.2.3. <i>Circular Dichroismus (CD)</i>	35
2.3. BINDUNGSSTUDIEN	38
2.3.1. <i>Surface Plasmon Resonance (SPR)</i>	38
2.3.2. <i>SPR-Bindungsstudien mit Zellen</i>	42
2.3.3. <i>Saturation Transfer Difference (STD)-NMR-Spektroskopie</i>	42
3. PROBLEMSTELLUNG	47
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	48
4.1. FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE.....	48
4.2. SYNTHESE DES PEPTIDS A1s	49
4.3. OPTIMIERUNG DER FESTPHASEN-PEPTIDSYNTHESE FÜR DAS PEPTID A1	51

4.4.	SYNTHESE UND BINDUNGSSTUDIEN DER PEPTIDE A1-A16	53
4.4.1.	<i>CD-Messungen</i>	54
4.4.2.	<i>SPR-Bindungsstudien</i>	55
4.4.3.	<i>Löslichkeitsversuche</i>	59
4.5.	SYNTHESE DER PEPTIDE C1-C6	60
4.6.	SYNTHESE DES SULFOTYROSIN-BAUSTEINS S2	62
4.7.	FESTPHASENPEPTIDSYNTHESEN MIT DEM SULFOTYROSIN-BAUSTEIN S2	65
4.8.	SYNTHESE DES PEPTIDS E	67
4.9.	SYNTHESE UND BINDUNGSSTUDIEN DER PEPTIDE D1 UND D2	68
4.9.1.	<i>CD-Messungen</i>	70
4.9.2.	<i>SPR-Bindungsstudien</i>	72
4.9.3.	<i>STD-NMR-Experimente</i>	76
4.10.	SYNTHESE UND BINDUNGSSTUDIEN DER PEPTIDE F1-F5	83
4.10.1.	<i>CD-Messungen</i>	86
4.10.2.	<i>SPR-Bindungsstudien</i>	88
4.10.3.	<i>SPR-Bindungsstudien mit Zellen</i>	93
4.10.4.	<i>STD-NMR-Experimente</i>	94
4.11.	AUSBLICK	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	103
6.	SUMMARY	106
7.	EXPERIMENTELLER TEIL	109
7.1.	VERWENDETE CHEMIKALIEN	109
7.2.	VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	111
7.3.	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	115
7.3.1.	<i>AAV 1: Peptidsynthesen</i>	115
7.3.2.	<i>AAV 2: Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens (Fmoc-Wert) ...</i>	116
7.3.3.	<i>AAV 3: Abspaltung vom Harz und der Schutzgruppen</i>	116
7.3.4.	<i>AAV 4: Etherextraktion</i>	117
7.3.5.	<i>AAV 5: Reinigung per RP-HPLC</i>	118
7.3.6.	<i>NMR-Experimente zur Peptid-Charakterisierung</i>	118
7.4.	DARSTELLUNG DES SULFOTYROSIN-BAUSTEINS S2	120
7.5.	PEPTIDSYNTHESEN	122
7.5.1.	<i>Synthese des Peptids AIs</i>	122

7.5.2.	<i>Optimierung der Synthese des Peptids A1</i>	124
7.5.3.	<i>Synthese der Peptide A1-A16</i>	127
7.5.4.	<i>Synthese der Peptide C1-C6</i>	133
7.5.5.	<i>Synthese des Peptids E</i>	137
7.5.6.	<i>Synthese der Peptide D1 und D2</i>	138
7.5.7.	<i>Synthese der Peptide F1-F5</i>	141
7.6.	STD-NMR-EXPERIMENTE	147
7.7.	SPR-BINDUNGSSTUDIEN	148
7.8.	CD-MESSUNGEN	150
7.9.	ZELLKULTUR UND ZELLPRÄPARATION	150
8.	TOXIKOLOGIE UND HANDHABUNG DER CHEMIKALIEN	152
9.	LITERATURVERZEICHNIS	154

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-, zweidimensional
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Acm	Acetamidomethyl
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin (Zidovudin)
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bp	Basenpaare
CCA	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CD4 / sCD4	<i>cluster of differentiation 4 / soluble cluster of differentiation 4</i>
CD	Circular Dichroismus
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPCDI	Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ds	<i>double stranded</i>
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
EA	Ethanolamin
ECL	<i>extra-cellular-loop</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronen-Stoß-Ionisation (<i>electron impact</i>)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>Electron-Spray-Ionisation</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FKS	Fötale Kälber Serum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GP	Glycoprotein
GPCR	<i>G-protein-coupled receptors</i>
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBS-EP	<i>HEPES buffered saline</i> + EDTA + Polysorbat 20
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorpropan-2-ol
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HOBt	1-Hydroxy-1H-benzotriazol
HOS	<i>human osteo sarcoma</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTLV	<i>human T-lymphotropic virus</i>
IgG	Immunglobulin G
k _{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K _D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i>

LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ ionisation - time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MES	2-(<i>N</i> -Morpholin)-ethansulfonat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MS	Massenspektrometrie
n.b.	Nicht bestimmbar
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
NRTI	nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
NtRTI	nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
OR	Optische Rotation
PAL	<i>peptide amide linker</i>
PAPS	Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>personal computer</i>
PEG	Polyethylenglycol
PND	prinzipiell neutralisierende Domäne
PS	<i>polystyrene support</i>
PyBOP	1-Benzotriazolyloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluoro-phosphat
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
RT-Inhibitor	Reverse Transkriptase-Inhibitor
RU	<i>resonance unit</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ss	<i>single stranded</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
TPST	Tyrosylproteinsulfotransferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
trNOE	<i>transferred</i> NOE
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
unrd.	<i>unordered</i>
UV	<i>ultraviolet</i>
VIS	<i>visible</i>
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>

Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Sulfotyrosin	Tyr(SO ₃ H)	<u>Y</u> (bzw. rot hervorgehoben)
Valin	Val	V

1. Einleitung

1.1. AIDS

Nach dem Auftreten erster Todesfälle 1981 diagnostizierte man eine neue Krankheit, die durch das Humane Immunschwäche Virus (HIV) ausgelöst und als erworbene Immunschwäche (AIDS, *acquired immune deficiency syndrome*) bezeichnet wird. AIDS hat heutzutage das Ausmaß einer Pandemie mit weltweit 40 Millionen infizierten Menschen erreicht. Fünf Millionen Menschen haben sich im Jahre 2004 mit dem HI-Virus neu angesteckt, während drei Millionen Menschen an den Folgen von AIDS starben. Insgesamt hat AIDS bis heute 25 Millionen Opfer gefordert. Wie Abbildung 1 zeigt sind das südliche Afrika und Süd-Ost-Asien am stärksten betroffen. Der Anteil von HIV-Infizierten an der Gesamtbevölkerung liegt in diesen Regionen oftmals im zweistelligen Prozentbereich. Da HIV vorwiegend durch Sexualkontakt übertragen wird, sind bevorzugt relativ junge Menschen betroffen. Dadurch wird deutlich, dass nicht nur die Gesundheit von Millionen Menschen bedroht ist, sondern in manchen Regionen in wenigen Jahren auch die Gefahr besteht, dass soziale und ökonomische Strukturen zusammenbrechen könnten.¹



Abbildung 1: Globale Schätzung der Ausbreitung von HIV Ende 2004.²

HIV wird hauptsächlich durch ungeschützte Sexualkontakte, durch gemeinsam benutzte Injektionsnadeln bei Drogenabhängigen, durch kontaminierte Blutprodukte oder prä-, peri- oder postnatal von der infizierten Mutter auf ihr Kind übertragen. Nach den erfolgreichen "Safer Sex" Kampagnen der 90er Jahre in den Industriestaaten zeigen wachsende Infektionszahlen in jüngster Zeit, dass wieder ein zunehmend risikobereites Sexualverhalten zu beobachten ist.² AIDS stellt aber weiterhin eine tödliche Krankheit dar, gegen die es keinen wirksamen Impfstoff gibt. Die Kombinationstherapie für bereits Infizierte, bekannt unter dem Namen HAART (*highly active antiretroviral therapy*), kann den Verlauf der Krankheit hinauszögern, ist aber für den breiten Einsatz in Entwicklungsländern aus Kostengründen derzeit nicht geeignet. Daher muss die Suche nach neuen Wirkstoffen und Therapieansätzen fortgesetzt werden.¹

1.1.1. Der Erreger: HIV

1983 publizierte die Forschungsgruppe um Luc Montagnier³ die Entdeckung des LAV (*lymphadenopathy associated virus*). Es wurde angenommen, dass LAV der Erreger von AIDS ist. Der Zusammenhang zwischen LAV und AIDS wurde allerdings zu diesem Zeitpunkt noch von anderen Forschungsgruppen bezweifelt. Eine dieser Forschungsgruppen war die um Robert Gallo. Er publizierte 1984 das von ihm gefundene HTLV-III (*Human T-lymphotrophic Virus*)⁴ und wurde als Entdecker des AIDS-Erregers gefeiert. Erst 1986 wurde offiziell bestätigt, dass beide gefundene Viren identisch waren und der Streit wurde beigelegt. Der Erreger bekam die Bezeichnung HIV (*human immunodeficiency virus*). HIV wird den Lentiviren (lateinisch *lentus*: langsam) zugeordnet, d.h. es besitzt eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit von mehreren Jahren.

Man unterscheidet drei verschiedene Virus-Stämme, das HIV-1, HIV-2 und SIV, wobei die beiden ersteren den Menschen und der letztere Affen infizieren. Der überwiegende Teil der humanen HIV-Infektionen ist auf das HIV-1 zurückzuführen, welches sich zu 40 % von dem Genom des HIV-2 unterscheidet. Eine weitere Unterteilung des HIV-1 lässt sich in die so genannten M (*major*)-, O (*outlier*)-, und N (*new*)-Gruppen vornehmen, wovon die O- und N-Gruppe nur in einigen Teilen Afrikas vorkommt, die M-Gruppe allerdings für das Auftreten von AIDS als Pandemie verantwortlich ist.⁵⁻⁸ Die M-Gruppe kann durch Vergleich ihrer Genome in elf weitere Subtypen (A-K) unterteilt werden.⁹ Dabei fällt das regional vermehrte Auftreten einiger Subtypen auf. Während man die Subtypen A, C, D und G vorwiegend in Afrika findet, kommt der Subtyp B im wesentlichen in Amerika und Europa, E

in Asien und F in Brasilien und Rumänien vor.⁷⁻¹⁵ Weiterhin kommen noch so genannte CRFs (*circulating recombinant forms*) vor, die Hybrid-Viren aus den oben genannten Subtypen bezeichnen.¹⁶

Das HI-Virus gehört zu der Familie der Retroviren und besitzt einzelsträngige RNA (ssRNA). Durch die viruseigene Reverse Transkriptase kann das HIV seine ssRNA in dsDNA umschreiben, die dann durch die viruseigene Integrase in das Genom des Wirtes integriert wird. Die virale Erbinformation wird dann zusammen mit jener der Wirtszelle repliziert und exprimiert, welches zur Bildung von neuen Viren führt. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des Viruspartikels (Virions).

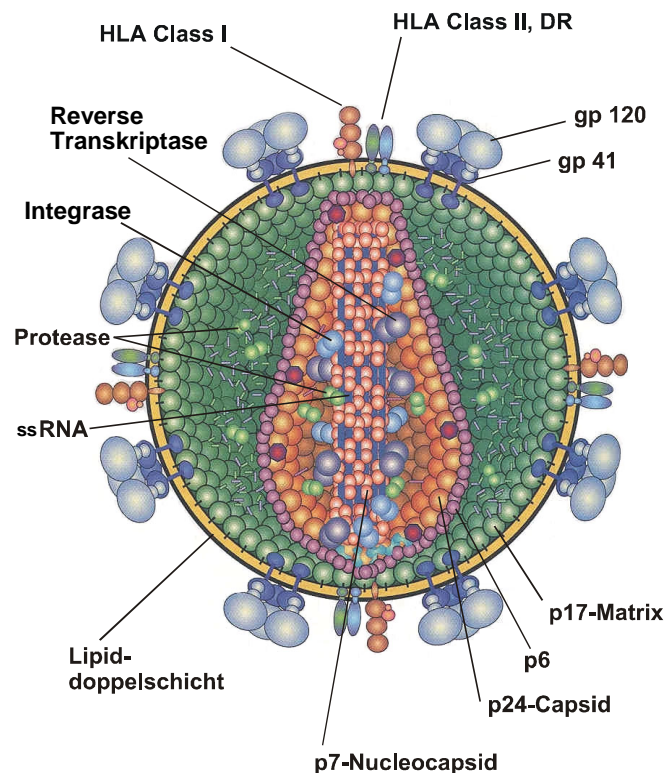


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIV. Durchmesser ~ 100 nm.¹⁷

Die äußere Hülle des Virions besteht aus einer Lipiddoppelschichtmembran, die von der Wirtszelle stammt und daher diverse wirtseigene Strukturen wie MHC-Proteine, Zelladhäsionsproteine und Glycolipide enthält (HLAs). Außerdem enthält sie etwa 72 Trimere des integralen Proteins GP41.¹⁸ An jedes GP41 ist ein peripheres GP120 nicht kovalent gebunden.¹⁹ Das GP120 ist ein Glycoprotein mit einer Molmasse von 120 kDa. Vorläuferprotein für die Glycoproteine GP41 und GP120 ist das GP160, welches bei der Virusreifung durch eine viruseigene Protease gespalten wird.²⁰

Im Inneren des Virions befindet sich eine Proteinhülle aus ca. 2000 Matrixproteinen P17, welche das Capsid, aufgebaut aus ca. 2000 Kopien des P24-Capsid-Proteins, umschließt. Darin enthalten sind zwei Kopien des RNA-Genoms (ssRNA) stabilisiert durch einen Ribonukleoprotein-Komplex aus ca. 2000 Kopien des P7 Nucleocapsid-Proteins und mehrere Moleküle Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.¹⁴

Die Mutationsrate des HIV ist besonders hoch (ca. 65 mal höher als beim Influenza-Virus), was auf die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase des HIV zurückzuführen ist.²¹ Die Hüllproteine GP41 und GP120 verändern sich daher ständig, so dass Antigendiversität vorliegt. Durch die Antigendiversität der HIV-Stämme wird die Entwicklung eines Impfstoffes gegen AIDS erheblich erschwert.¹⁹

1.1.2. HIV-Lebenszyklus

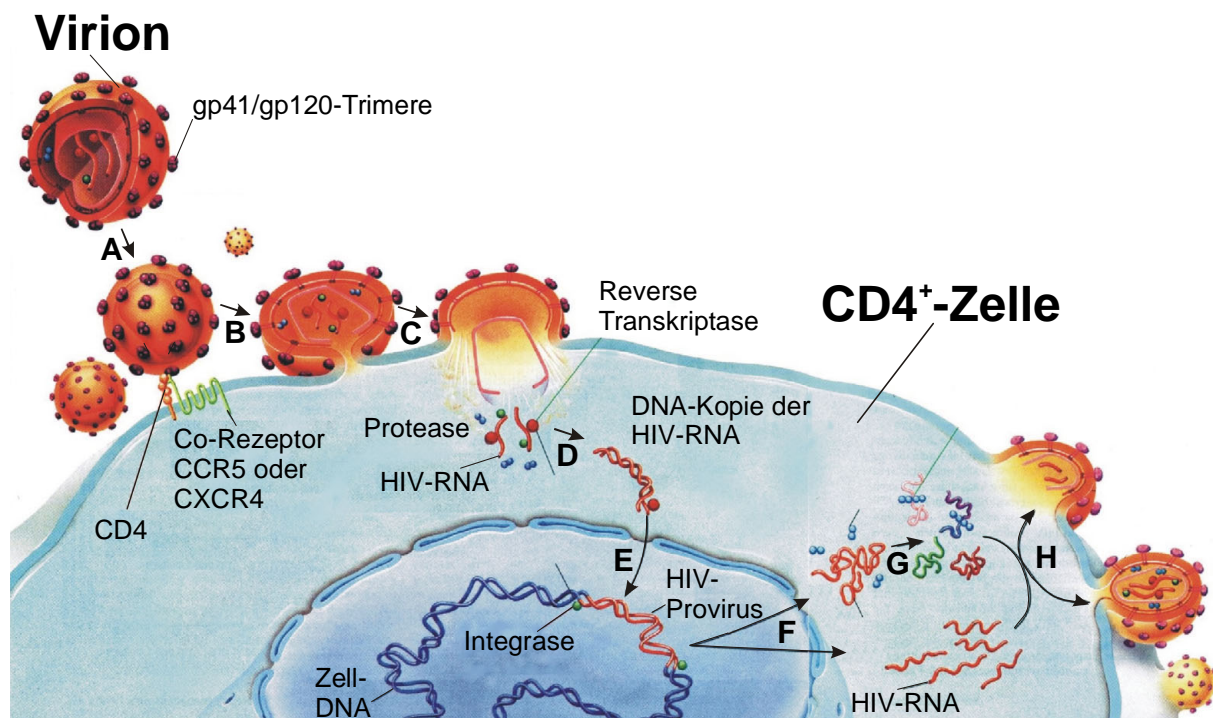


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HIV-Infektionszyklus.²²

Ist das Virus in die Blutbahn gelangt, so findet eine Infektion der Wirtszelle durch Wechselwirkung der viralen Hüllproteine mit den Rezeptoren der Wirtszelle statt, die detailliert in Kapitel 1.2.1 erörtert werden. Das führt zur Fusion der Membranen von Virus und Wirtszelle und damit zur Insertion des Capsids (Abbildung 3 A, B, C). Nun wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase die virale ssRNA zur dsDNA umgeschrieben (D) und durch

die Integrase, die bei der Fusion ebenfalls in das Cytoplasma gelangt ist, in das Wirtsgenom an eine unspezifische Stelle integriert (Provirus, E) und dort schließlich exprimiert (F).¹⁹ Mit Hilfe der wirtszelleigenen Proteinsynthesemaschinerie erfolgt nun Transkription zu mRNA und Translation in neue virale Proteine. Diese Proteine sind Vorläuferproteine, die durch die viruseigene Protease zu funktionellen Proteinen gespalten werden (G). Im Anschluss lagern sich die Virusproteine mit neuer viraler RNA zusammen (*assembly*), und knospen als reife Virionen von ihrer Wirtszelle ab (H). Dabei umhüllen sie sich mit der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle, in die die viralen Hüllproteine schon integriert sind. Sowohl Zellproteine (HLAs), die auf der Virusoberfläche präsentiert werden, als auch die intensive Glycosylierung der GP120 Moleküle durch das zelleigene Glycosylierungssystem erschweren die Erkennung durch das Immunsystem des infizierten Menschen.²²

Das HIV-Genom kann als Alternative zur Produktion neuer Viren auch in eine Ruhephase fallen. Das Virus kann dadurch mehrere Jahre ohne Replikation überdauern und ist in dieser Zeit weder vom Immunsystem noch von Chemotherapeutika zu erreichen.

Die Wirtszelle wird bei der Replikation des HIV auf mehrere Arten geschädigt. Die Membran der Wirtszelle wird durch den Einbau viraler Glycoproteine und durch die Knospung von Viruspartikeln permeabel, welches schließlich zur osmotischen Lyse der Zelle führt. Durch die Präsentation der viralen Glycoproteine können an die Wirtszelle viele weitere CD4-Rezeptor tragende Zellen zu riesigen vielkernigen Zellhaufen gebunden werden. Außerdem kann lösliches GP120 an CD4-Rezeptoren binden und zum Auslösen der Komplementkaskade und damit zu ihrer Zerstörung führen. Weiterhin wird die eigentliche Funktion der T-Helferzellen beeinträchtigt, indem durch GP120 blockierte CD4-Rezeptoren nicht mehr mit Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexen wechselwirken können. Durch all diese Vorgänge wird die Zahl der funktionstüchtigen T-Helferzellen im Organismus stark reduziert und das Immunsystem immens geschwächt.¹⁹ Die Halbwertszeit bis zur Zerstörung von mit HIV infizierten CD4⁺-Zellen liegt bei weniger als zwei Tagen.²³⁻²⁵ Das Immunsystem ist somit besonders empfänglich für Erreger wie Pilze oder Viren. Die an AIDS erkrankten Individuen sterben folglich nicht direkt an der Infektion durch HIV, sondern an den Folgen der Immunschwäche.

1.1.3. Krankheitsverlauf

Während der ersten zwei bis sechs Wochen nach der Infektion steigt der Virustiter stark an (Abbildung 4). Infolgedessen nimmt die Zahl der CD4⁺-Zellen stark ab und es kann zu grippeähnlichen Symptomen kommen. In der anschließenden asymptomatischen Phase der Infektion, die einen Zeitraum von mehreren Jahren andauern kann, sind äußere Anzeichen, die auf eine Infektion durch HIV hindeuten, nicht zu erkennen. Aber auch hier findet eine ständige Interaktion zwischen Infektion, Produktion von Viren und deren Bekämpfung durch das Immunsystem statt, was zu einer allmählichen Verringerung der CD4⁺-Zellen führt. Unterschreitet die Anzahl der CD4⁺-Zellen den Wert von 500/μL, so spricht man von der symptomatischen Phase mit opportunistischen Infektionen. Sinkt die Zahl der CD4⁺-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der Viruslast weiter rapide ab (weniger als 200/μL), so spricht man von AIDS.²⁶ Unbehandelt versterben innerhalb von 15 Jahren etwa zwei Drittel der Patienten an den Folgen der HIV-Infektion.²⁷

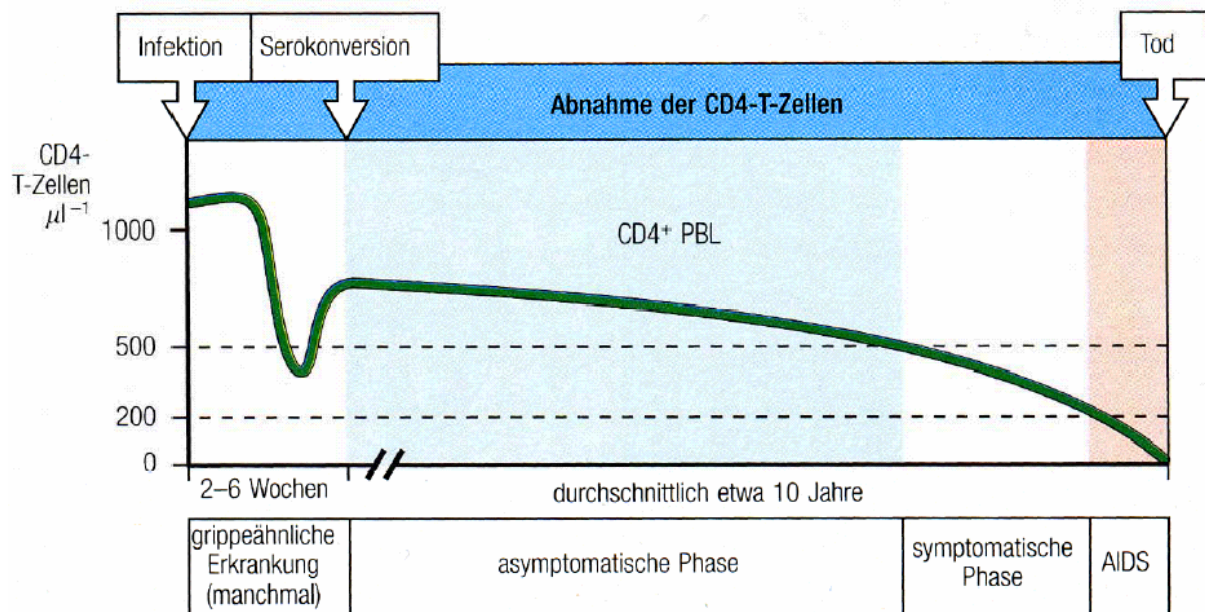


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf einer HIV-Infektion.²⁷

1.1.4. Die Bekämpfung der HIV-Infektion

1986 wurde das erste antiretrovirale Medikament mit Wirksamkeit gegen HIV präsentiert. Es handelte sich dabei um das Nukleosidanalogen Zidovudin (AZT, 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin), welches eine hemmende Wirkung auf die Reverse Transkriptase hat. Behandelt man einen Patienten ausschließlich mit diesem Medikament, so entwickeln sich nach

spätestens zwei Jahren medikamentenresistente HIV-Stämme und es kann keine Verbesserung der Überlebensrate erzielt werden.²⁸ In den folgenden Jahren wurden neue Nukleosidanaloga entwickelt und die Wirkstoffgruppe der Protease-Inhibitoren entdeckt. Außerdem wurde Mitte der 90er Jahre die Monotherapie auf eine Kombinationstherapie umgestellt, was zu einer deutlichen Verbesserung der medikamentösen Behandlung führte.²¹ Diese Kombinationstherapie aus drei oder mehr unterschiedlichen Medikamenten, auch bekannt unter dem Namen *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), verlängert die Lebenszeit der Erkrankten, eine Heilung erfolgt jedoch nicht. Unter HAART normalisiert sich das Erscheinungsbild des Immunsystems. Die Zahl an CD4⁺-Lymphozyten erhöht sich, es kommt zu einer Rückverteilung von Lymphozyten aus den Lymphknoten in den Blutstrom und oftmals werden opportunistische Infektionen bewältigt. Aber auch bei sehr effektiv behandelten Patienten wird eine kontinuierliche Evolution der persistierenden Viruspopulation beobachtet. Dadurch kann es zur Ausbildung von resistenten Virusstämmen kommen.^{29;30} So bringt die Therapie durch HAART eine Erhöhung der Lebenserwartung, allerdings muss man mit starken Nebenwirkungen der Virostatika rechnen. Zu den ca. 20 Medikamenten, die heutzutage für HAART eingesetzt werden, zählen Reverse Transkriptase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren und ein *Entry*-Inhibitor.³¹ Der Bereich der HIV-*Entry*-Inhibitoren wird detailliert in Kapitel 1.2.5 erörtert. Die Reverse Transkriptase-Inhibitoren werden in nukleosidische (NRTI), nicht-nukleosidische (NNRTI) und nukleotidische (NtRTI) eingeteilt. Die nukleosidischen Inhibitoren wirken als Terminatoren der DNA-Polymerisation, da ihnen die 3'-OH Gruppe fehlt und sie die Bildung der kettenverlängernden 3'-5'-Phosphodiesterbindung verhindern. Nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren unterbinden die DNA-Polymerisation allosterisch.^{32;33} Da mit HAART die Lebenserwartung zwar verlängert, die Krankheit aber nicht geheilt werden kann und um Resistenzbildung zu umgehen, ist es sinnvoll, die Kombinationsbehandlung von HIV-Infizierten um weitere Wirkstoffe zu ergänzen. Prinzipiell ist dabei jeder Virusbestandteil, der zur effektiven Replikation beiträgt, ein therapeutischer Angriffspunkt.³⁴

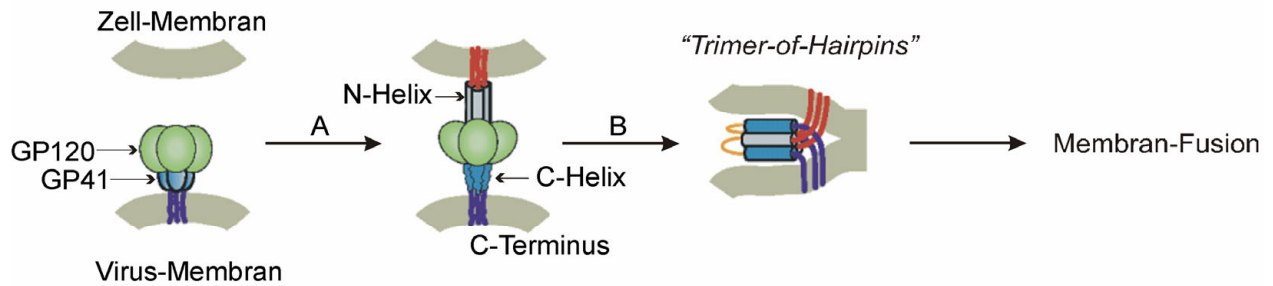
Da Vakzinierung am ehesten flächendeckend anwendbar ist, ist die Entwicklung eines konventionellen, d.h. präventiven Impfstoffs gegen das HIV besonders für Entwicklungsländer reizvoll. Leider zeichnet sich auch nach knapp 20 Jahren Forschung auf diesem Gebiet auf Grund der extremen Variabilität des Erregers noch kein Erfolg ab.^{35;36} Die im Februar 2003 veröffentlichten Ergebnisse einer weltweiten Studie zur Impfung gegen HIV zeigten, dass der verwendete Impfstoff weitgehend unwirksam war.³⁶ Es besteht in dieser Richtung also noch ein enormer Forschungsbedarf.

1.2. *HIV-Entry*

HIV infiziert ausschließlich Zellen, die den CD4-Rezeptor und einen passenden Corezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren an ihrer äußeren Membran präsentieren.³⁷⁻⁴⁰ Zu diesen Zellen zählen hauptsächlich T-Helferzellen, aber auch einige Makrophagen und Monocyten. Die T-Helferzellen sind wesentlich für die zelluläre und indirekt auch für die humorale Immunantwort der Organismen auf Antigene verantwortlich.^{41;42}

1.2.1. Membranfusion

Auf molekularer Ebene findet die Internalisierung des HIV in Immunzellen nach folgendem Mechanismus statt. Das Glycoprotein GP120 des HIV-1 bindet mit einem diskontinuierlichen Epitop mit Aminosäuren aus sechs konstanten und variablen Domänen an den CD4-Rezeptor auf der Wirtszelle.⁴³ Daraus resultiert eine Änderung der Konformation des GP120, so dass es zusätzlich den Corezeptor (z.B. CCR5 oder CXCR4) binden kann. Es wird angenommen, dass diese Wechselwirkung zum größten Teil mit der V3-Region stattfindet.^{37;44-46} Es entsteht ein trimolekularer Komplex.⁴⁷ Aufgrund dieser Bindungen kommt es zu einer Destabilisierung des GP120-CD4-Komplexes mit der Konsequenz einer Konformationsänderung des GP41, so dass ein hydrophobes "Fusionspeptid" präsentiert wird (Abbildung 5). Jedes der drei GP41 besitzt zwei helikale Bereiche (N-Helix und C-Helix). Drei N-Helices bilden eine *Coiled-Coil*-Struktur, um die sich die drei C-Helices antiparallel gruppieren und ein Bündel bilden. Dieser postulierte Übergangszustand „*Trimer-of-Hairpins*“ bringt die Membranen zusammen und führt so zur Membranfusion. Durch die Membranfusion gelangen die Virusproteine und RNA-Kopien in das Zellinnere und das Virus kann sich replizieren.⁴⁸⁻⁵⁰



- A: Bindung an CD4 und Corezeptor mit Konformationsänderung von GP41.
Das hydrophobe Fusionspeptid (rot) wird freigelegt und inseriert in die Zielmembran.
- B: GP120 wird abgegeben und es bildet sich ein "Trimer-of-Hairpins".

Abbildung 5: Postulierter Mechanismus der Membranfusion.

1.2.2. Das Glycoprotein GP120

Das GP120 besitzt eine Masse von 120 kDa, von der etwa 50 % auf den Kohlenhydratanteil entfallen (Abbildung 6). Das bedeutet, dass die Oberfläche vom GP120 zum großen Teil mit Kohlenhydratstrukturen bedeckt ist (24 bis 26 potentielle *N*-Typ Glycosylierungsstellen), die aus der wirtseigenen Glycosylierungsmaschinerie stammen und dadurch für das menschliche Immunsystem schwierig zu erkennen sind.⁵¹ Wie weiterhin aus der Abbildung zu sehen ist, konnten innerhalb der Sequenz durch Sequenzvergleiche fünf relativ konstante Regionen (C1-C5) und fünf hypervariable Bereiche (V1-V5) identifiziert werden. Die ersten vier variablen Bereiche bilden exponierte Loops, wobei die dritte hypervariable Schleife (V3-Loop) maßgeblich an der GP120-Corezeptor-Wechselwirkung beteiligt ist.⁵² In der V3-Loop spielt besonders die kurze hochkonservierte Sequenz GPGRAF (HIV-1, Subtyp B) eine bedeutende Rolle. Dieses Motiv wird als prinzipiell neutralisierende Domäne (PND) bezeichnet, da gegen diesen Sequenzbereich Antikörper gebildet werden, die entsprechende HIV-Stämme zu neutralisieren vermögen.^{53;54} Die Infektion kann dadurch allerdings nicht langfristig inhibiert werden.

1998 konnten Kwong *et al.* eine Röntgenstruktur eines Konstruktes von verkürztem GP120 (GP120-core) mit einem Fragment von CD4 und einem Fragment eines CD4-induzierten Antikörpers kokristallisieren. Die Struktur der V3-Loop konnte dadurch allerdings nicht aufgeklärt werden, da dieser Bereich im verkürzten Konstrukt des GP120 fehlte. Es zeigte sich aber, dass das Bindungsepitop des verkürzten GP120 zum CD4 in sechs Peptidabschnitte

überwiegend in den konstanten Regionen diskontinuierlich über die Sequenz des GP120 verteilt ist (in Abbildung 6 rot gekennzeichnet).⁴³

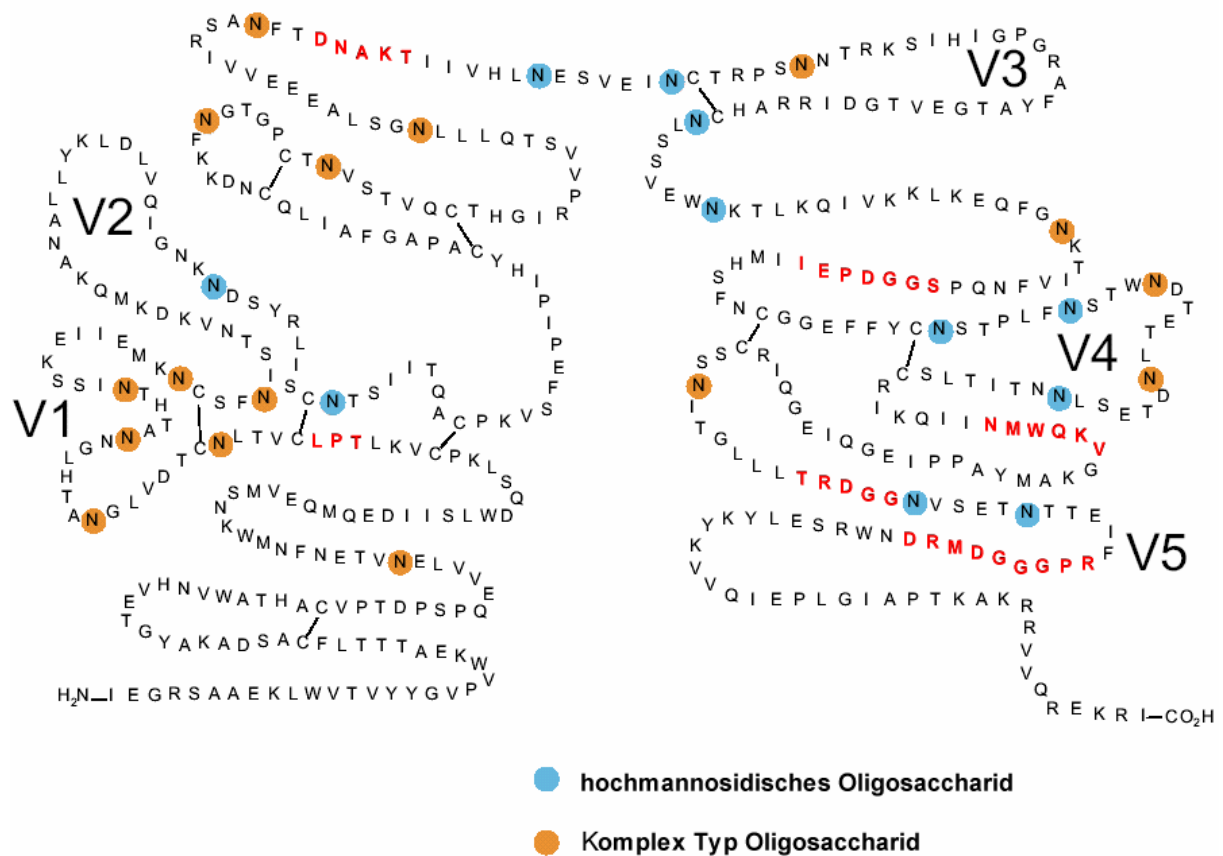


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines HIV-1 GP120 mit potentiellen Glycosylierungsstellen (blau und orange). Die Peptidsequenzen des GP120-core, die in der Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.* direkten Kontakt zu CD4 haben, sind rot dargestellt.^{43;51}

Durch Bindungsstudien von V3-Peptiden an CCR5⁵⁵ bzw. CXCR4⁵⁶ konnte gezeigt werden, dass die V3-Region an der Bindung zum Corezeptor beteiligt ist. In der V3-Loop befindet sich N-terminal eine N-Glycosylierung des komplexen Typs (Aminosäuresequenz NNT), die nahezu den gleichen Raum beansprucht, wie die Loop selber. Untersuchungen zeigten, dass die dortige Glycosylierung die Infektiösität des Virus und den Corezeptortropismus beeinflusst.⁵⁷ Durch SPR-Bindungsstudien mit synthetischen V3-Peptiden und Glycopeptiden konnte festgestellt werden, dass die Glycopeptide gegenüber den Peptiden gleicher Sequenz eine erhöhte CCR5-Affinität aufweisen.⁵⁵

Wird die V3-Loop eines Virus, der CCR5 als Corezeptor nutzt, gegen die eines Virus, der CCR4 als Corezeptor nutzt, ausgetauscht, so nutzt das resultierende Virus anschließend CCR4 als Corezeptor. Die V3-Region bestimmt demnach, welcher Corezeptor genutzt werden kann.⁵⁸⁻⁶⁰

1.2.3. HIV-Corezeptoren

HIV benötigt zur Infektion der Wirtszelle neben CD4 einen Corezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren. Diese Corezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR's).⁶¹ Sie besitzen als strukturelles Merkmal ein Sieben-Helix-Transmembran-Motiv mit drei Loops (ECL 1-3) und einem aminoterminalen Ende auf der extrazellulären Seite.^{37;40} Die natürliche Aufgabe der Chemokinrezeptoren liegt in der Erkennung von Chemokinen. Bei CCR5 sind das die Chemokine CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) und CCL5 (RANTES). Die natürliche Chemokin-Bindung führt über G-Proteine zur Stimulierung des Immunsystems und macht sich durch Antikörperproduktion bemerkbar.⁶²⁻⁶⁵ Weiterhin werden Leukozyten zu Entzündungsorten geführt, indem die Chemokinrezeptoren Chemotaxis in Richtung der am Ort der Entzündung ausgeschütteten Chemokine bewirken (*chemoattractant cytokines*).^{66;67} Die verschiedenen Stämme des HIV können unterschiedliche Corezeptoren nutzen, wobei aus der Vielzahl von Chemokinrezeptoren für die HIV-Infektion *in vivo* vorwiegend die CCR5- und CXCR4-Rezeptoren von Bedeutung sind, um in die jeweilige Zelle einzudringen, während *in vitro* auch andere Vertreter dieser Proteinklasse als Corezeptor dienen können.⁶⁸ In der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion kommen vorwiegend so genannte R5-trope Viren vor, die CCR5 als Corezeptor verwenden und deshalb Makrophagen befallen (M-trop). Mit dem Ausbruch der Krankheit AIDS wechselt der vorherrschende Tropismus nach X4. Dadurch wird CXCR4 als Corezeptor genutzt, so dass vermehrt T-Helferzellen angegriffen werden (T-trop).⁶⁹⁻⁷¹ Außer den R5- und X4-tropen Stämmen kommen während der Infektion auch dual-trope Stämme (R5X4-trop) vor, die sowohl Makrophagen als auch T-Helferzellen infizieren können.^{21;68} Der Tropismus lässt sich auf die unterschiedlich glycosylierten V3-Regionen des GP120 während des Krankheitsverlaufes zurückführen.^{63;72} Bei noch intaktem Immunsystem in der Frühphase der Infektion dominieren die R5-tropen Virenstämme mit stärker glycosylierten V3-Regionen. Die Glycosylierungen haben eine maskierende Funktion (*glycan shield*), und die maskierten Peptidsequenzen können daher vom Immunsystem schlecht erkannt werden. Sie sind jedoch weniger virulent als die X4-tropen Stämme aus dem HIV-Endstadium. Die X4-tropen Stämme sind deutlich weniger glycosyliert und können sich vermutlich erst bei einem stark vorgeschädigten Immunsystem durchsetzen.^{73;74}

1.2.3.1. CCR5

Besonders in der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion kommen im wesentlichen M-trope HIV-Stämme vor, die CCR5 als Corezeptor nutzen. Dass CCR5 eine entscheidende Rolle bei der Infektion spielt, zeigte sich dadurch, dass man Individuen fand, die dem Virus mehrfach ausgesetzt waren und trotzdem nicht infiziert wurden. Untersuchungen der CCR5-Gene dieser Individuen ergaben, dass sie ein defektes CCR5-Allel besaßen. Die häufigste gefundene Veränderung dieses Allels (10 % bei Europäern) bestand aus einer 32 bp Deletion im Bereich der ECL-2, die zu einer Expression eines Rezeptors mit kürzerer AS-Sequenz führte. Dieser veränderte Rezeptor wird nicht auf der Zelloberfläche präsentiert. Die homozygoten Individuen (1 % der Europäer) zeigen eine deutlich höhere Resistenz gegen die Infektion mit HIV, da das Virus keinen geeigneten Corezeptor auf der Wirtszelle findet. Heterozygote Individuen haben eine verminderte Anzahl an CCR5-Rezeptoren auf den Wirtszellen, so dass zwar keine erhöhte Resistenz zu erkennen ist aber das Fortschreiten der Krankheit verlangsamt wird und die Viruskonzentration nachweisbar geringer ist.^{63;75;76}

1.2.3.2. Wechselwirkungen des Corezeptors CCR5 mit dem GP120

Das Schema des humanen CCR5 mit N-Terminus und den drei *extra-cellular-loops* (ECLs) ist in Abbildung 7 gezeigt. Schwarz hinterlegte AS differieren zwischen dem humanen und dem murinen CCR5. Ein Pfeil zeigt an, dass sich diese Aminosäure in Mutations- und Substitutionsstudien als essentiell für die Corezeptor-Virus-Bindung herausgestellt hat.⁴⁷

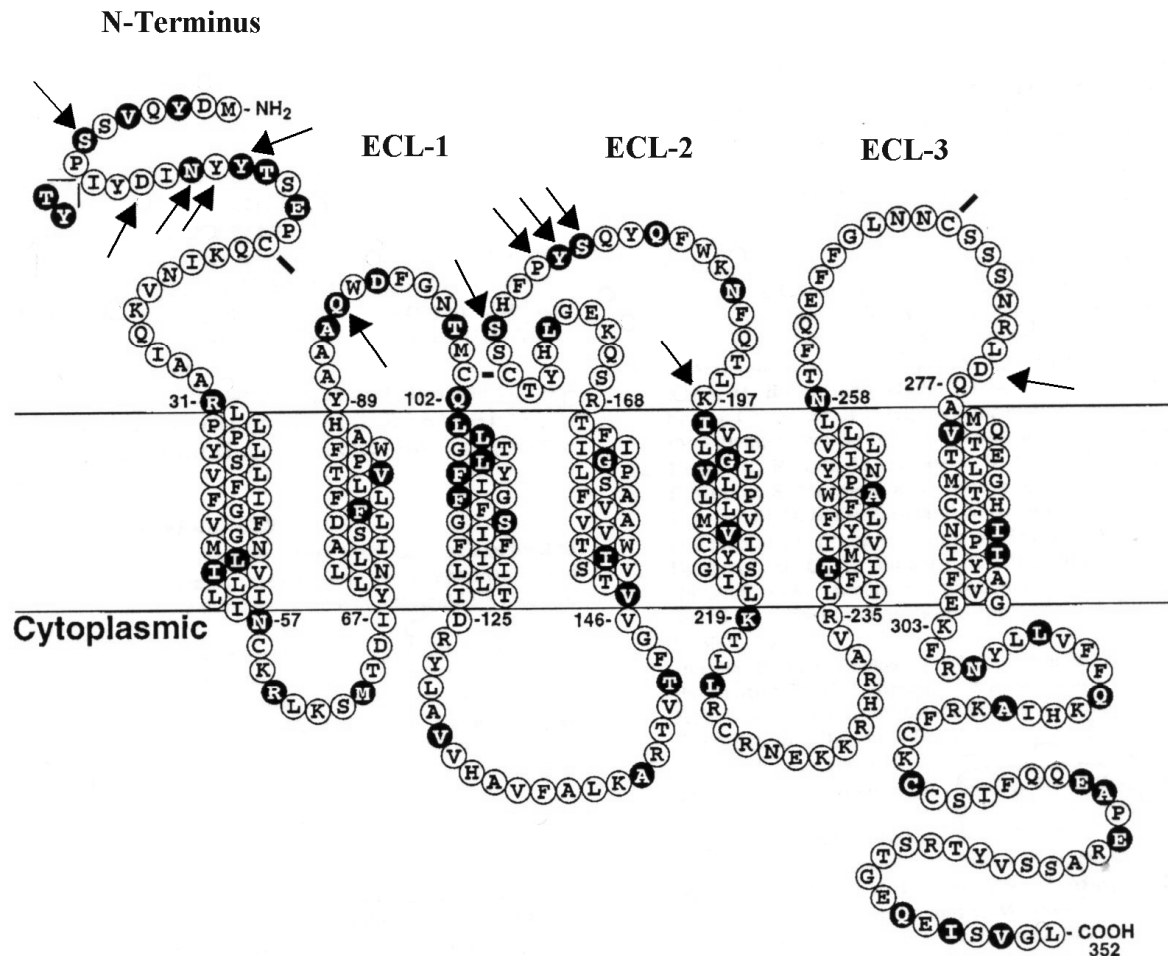


Abbildung 7: Schema des humanen CCR5. Schwarz hinterlegte AS kennzeichnen Unterschiede zum murinen CCR5. Pfeile markieren für die Corezeptor-Virus-Bindung essentielle Aminosäuren. Die TY-Reste zwischen Position 8 und 9 kennzeichnen Aminosäuren, die nur im murinen CCR5 vorhanden sind.⁴⁷

An der Bindung bzw. der Ausbildung des Bindungssepitops des Corezeptors CCR5 zum GP120 sind mehrere Aminosäuren der extrazellulären Domänen beteiligt, wie verschiedene Substitutions- und Mutationsstudien gezeigt haben.⁶³ Substitutionsstudien wurden mit Hilfe von murinem CCR5 durchgeführt. Die Homologie zwischen murinem und humanem CCR5 liegt bei 82 %. Murines CCR5 zeigt allerdings keine Rezeptoraktivität in Bezug auf die unterschiedlichen HIV-Stämme. Durch chimäre Rezeptoren lässt sich daher die Rezeptoraktivität für die verschiedenen HIV-Stämme untersuchen. Die dafür verwendeten chimären Rezeptoren sind so aufgebaut, dass nur eine einzige extrazelluläre Domäne human, der Rest aber murin ist. Sie sind sehr empfindlich gegen Austausch einzelner Aminosäuren in der humanen Domäne gegen die murinen Homologen. Mit dieser Methode konnte man nachweisen, dass bei M-tropen HIV-1 Stämmen eine Substitution von Ser-7, Asn-13, Tyr-15

(N-Terminus) und Ser-180 (ECL-2) sowie die Kombination "Tyr-184 und Ser-185" (ECL-2) einen negativen Effekt auf die Rezeptoraktivität ausübt. Weitere Studien in deren Verlauf nicht nur inaktive Corezeptoren von Mäusen, sondern auch von Affen eingesetzt wurden, zeigten weitere wichtige Aminosäuren, wie Tyr-14 (N-Terminus), Glu-93 (ECL-1) und Pro-183 (ECL-2). Schon die Substitution nur einer dieser Aminosäuren machte einen aktiven Corezeptor für einige M-trope Stämme inaktiv. Substitutionen einzelner Aminosäuren durch Alanin zeigten, dass Asp-11 (N-Terminus), kombiniert mit Lys-197 (ECL-2) und / oder Asp-276 (ECL-3) zu einem teilweisen oder totalen Verlust der Rezeptor-Aktivität bei verschiedenen dual-tropen HIV-Stämmen führten.^{47;62;63}

Diese und weitere Studien zeigten, dass das aminoternale Ende und die ECL-2 besonders wichtige Bereiche des CCR5 für die GP120-Bindung sind, da hier die Rezeptoraktivität durch Mutationen bzw. Substitutionen besonders empfindlich gestört wird.^{47;63} Aber auch die ECL-1 und ECL-3 scheinen noch zu einem geringen Teil an der Bindung beteiligt zu sein.⁷⁷⁻⁷⁹

1.2.4. Bedeutung und Vorkommen von Sulfotyrosinen

1954 konnte anhand von Rinderfibrinopeptid B das erste mal gezeigt werden, dass Tyrosine posttranslational sulfatiert werden können.⁸⁰ Inzwischen weiß man, dass etliche Peptide und Proteine sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich dieser Modifikation unterliegen.⁸¹ Zu den zurzeit etwa 60 bekannten Proteinen mit Sulfotyrosinen gehören vor allem lösliche und Transmembranproteine. Die Sulfotyrosine spielen in vielen biologischen Funktionen eine Rolle, wie z.B. Proteinfaltung, inter- and intrazellulären Transportmechanismen, Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen und Zellkommunikation.⁸²⁻⁸⁴

Verantwortlich für die Modifikation sind zwei Enzyme Tyrosylproteinsulfotransferase-1 und -2 (TPST-1 und TPST-2), die eine hohe Homologie untereinander aufweisen. Diese Enzyme kommen membrangebunden hoch angereichert im Trans-Golgi-Netzwerk vor, wobei die *active site* im Lumen vorliegt. Daher erfolgt diese Modifikation nur an Proteinen, die das Trans-Golgi-Netzwerk durchwandern.^{85;86}

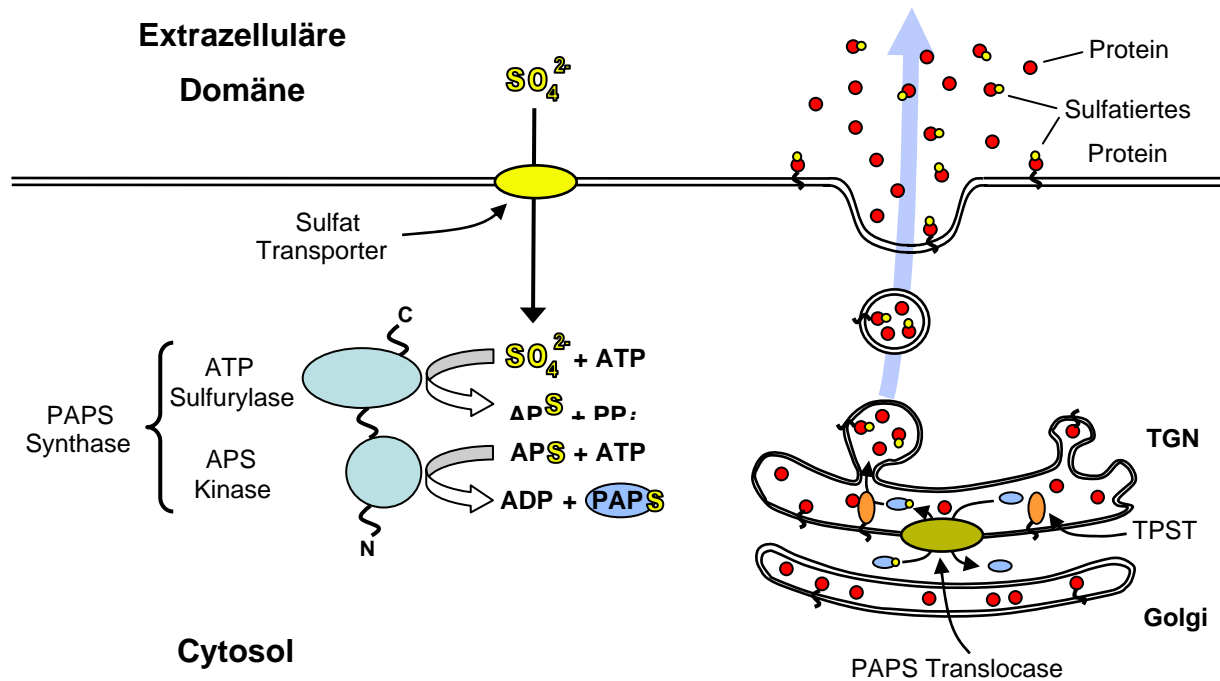


Abbildung 8: Sulfat-Aktivierung und Tyrosin-Sulfatierung im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Sulfationen dringen durch einen Sulfattransporter in die Zelle ein. Dort findet die Umwandlung zu PAPS durch das bifunktionale Enzym PAPS-Synthase statt. PAPS wird anschließend durch die PAPS-Translocase in das Lumen des Golgi transportiert und dient dort als Sulfat-Donor für die TPSTs. Die sulfatierten Produkte werden anschließend aus dem Trans-Golgi-Netzwerk transportiert.⁸⁷

Welche Tyrosine in einem Protein sulfatiert werden, kann noch nicht genau vorausgesagt werden. Es scheint allerdings so, als ob Aminosäuren, die das Tyrosin umgeben, eine wichtige Rolle spielen. Es wurde versucht Consensussequenzen zu finden, die aber nicht bei allen sulfatierten Proteinen erfüllt werden, so dass sie nur einen Anhaltspunkt für mögliche Sulfatierungsstellen liefern können. Drei bis vier saure Aminosäuren in einem Bereich von \pm fünf Aminosäuren um das Tyrosin herum sprechen allerdings stark für eine Sulfatierung.⁸⁸ Die TPST katalysieren den Transfer vom universellen Sulfat-Donor Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat (PAPS) zu einer Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes unter Ausbildung eines Tyrosin *O*-Sulfatesters und 3',5'-ADP (Abbildung 9).⁸⁹

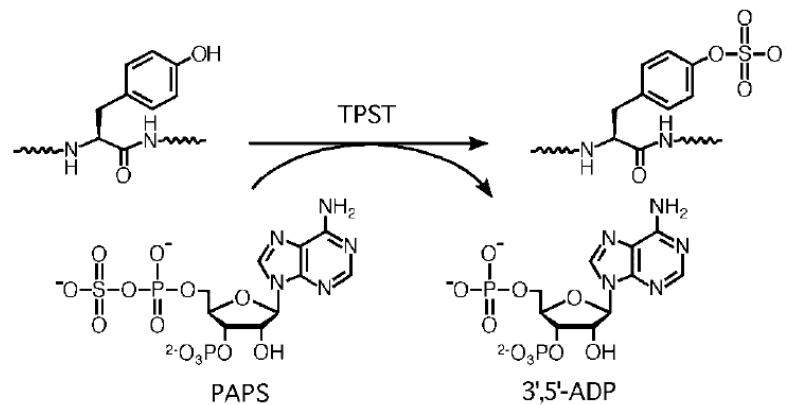


Abbildung 9: Reaktionsschema der Tyrosylproteinsulfotransferase Reaktion.

1.2.4.1. Sulfotyrosine im N-Terminus des CCR5

Chemokinrezeptoren scheinen die Sulfatierung von Tyrosin-Resten für die optimale Bindung ihrer natürlichen Liganden zu benötigen. CCR5 besitzt in seinem N-Terminus vier Tyrosine, die sulfatiert sein könnten. Substitutionsstudien, in denen diese vier Tyrosine durch Phenylalanine ersetzt wurden, zeigten, dass die Bindung zu den Chemokinen CCL3 (MIP-1 α) und CCL5 (RANTES) um den Faktor 100 abnimmt. Aber auch bei der Bindung des HIV an den Corezeptor scheinen die Sulfotyrosine eine wichtige Rolle zu spielen.⁹⁰⁻⁹² Es zeigte sich, dass die Corezeptoren untereinander in ihren drei extrazellulären Domänen wenige Gemeinsamkeiten aufweisen. Eine Ausnahme bilden hierbei jedoch die N-terminalen Regionen, welche durchgehend reich an Tyrosinen und sauren Aminosäuren sind.⁹⁰ Gerade diese Region spielt eine kritische Rolle in der Fähigkeit des CCR5 als HIV-1 Corezeptor für R5-trope Viren zu funktionieren.⁹¹⁻⁹⁴

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Sulfotyrosin enthaltende Peptide aus dem Bereich des N-Terminus, jedoch nicht deren unsulfatierte Analoga, an GP120 binden. Sie fungieren als Inhibitor und verlangsamen den HIV-1-Entry in CCR5-exprimierende Zellen, indem sie die Assoziation zwischen CCR5 und dem GP120-CD4 Komplex behindern.⁹⁵ Diese Peptide konnten außerdem die HIV-1 Corezeptor Aktivität einer CCR5-Variante mit fehlendem N-Terminus regenerieren.⁹⁶

Eine andere Forschergruppe zeigte allerdings das Gegenteil, indem sie ein Peptid (AS 1-26, sulfatiert an den Positionen Tyr-3, 10 und 14) darstellte, welches keine R5-trope HIV-1 vermittelte Infektion inhibieren konnte. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell durch die

unterschiedliche Länge der Peptide und durch die Substitution des Cys-20 durch Cys(Acm) anstatt durch Ser erklären. Auch die unterschiedliche Sulfatierung könnte dafür verantwortlich sein.⁹⁷

Besonders wichtig für die Bindungsaffinität des Corezeptors zum GP120 scheinen die Sulfotyrosine an den Positionen Tyr-10 und Tyr-14 zu sein, da Peptide mit Sulfaten an diesen Positionen die Bindung zu GP120-CD4-Komplexen im Gegensatz zu ihren unsulfatierten Analoga blockieren.⁹⁰⁻⁹²

Weitere Studien zeigten, dass für die Corezeptor-Bindung Sulfate an den Positionen Tyr-3, Tyr-10 und Tyr-14 benötigt werden. Das Tyr-15 ist ebenfalls für die Corezeptorbindung von Bedeutung, allerdings ist hier vor allem der aromatische Rest der Seitenkette wichtig, da dieser bei der Corezeptorbindung zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zum GP120 befähigt ist.^{91;92;96;98}

Um ein mögliches Sulfatierungsmuster vorhersagen zu können, wurden Untersuchungen mit TPST-1 und -2 an Peptiden des N-Terminus gemacht. Diese *in vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass beide Enzyme alle vier Tyrosine sulfatieren. Dabei unterscheiden sie sich nur in der Reihenfolge. Während TPST-1 in der Folge Tyr-14, Tyr-15, Tyr-10, Tyr-3 sulfatiert, beginnt TPST-2 mit Tyr-15 und danach erst Tyr-14.⁹⁹

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *in vivo* mindestens zwei wenn nicht sogar alle vier Tyrosine sulfatiert sind. Am wahrscheinlichsten sind Sulfotyrosine an den Positionen Tyr-3, Tyr-10, und Tyr-14.

1.2.5. HIV-Entry-Inhibitoren

Im ersten Schritt der retroviralen Infektion kommt es vermutlich durch positiv geladene Bereiche der Virusglycoproteine und negativ geladene Heparansulfat-Proteoglycane der Zielzelle zu einer Anheftung des Virions an die Wirtszelloberfläche. Polyanionische Verbindungen könnten demnach prinzipiell die niederaffine Virus-Zell-Assoziation über polyionische Wechselwirkungen blockieren. Synthetische Zugänglichkeit, Bioverfügbarkeit und Toxizität dieser Verbindungen sind allerdings einige der Probleme die vermuten lassen, dass diese Assoziation kein realistisches *target* in der HIV-Bekämpfung sein wird.³⁴

Im nächsten Schritt erfolgt die erste spezifische Wechselwirkung des Virusproteins GP120 mit dem Wirtszellrezeptor CD4. Diese Interaktion bietet ein attraktives Ziel für die Wirkstoffentwicklung, indem zum einen die CD4-Bindungsstelle und zum anderen die GP120-Bindungsstelle blockiert werden können.

Im einfachsten Fall könnte man sich als Inhibitor ein GP120-bindendes Molekül vorstellen, das die Bindungsstelle für die CD4-Interaktion blockiert. Dafür wurde die lösliche Form des CD4-Rezeptors (sCD4) selbst auf inhibierende Eigenschaften hin untersucht und es zeigten sich *in vitro* sehr effizient neutralisierende Eigenschaften gegenüber labor-adaptierten Virusstämmen.^{100;101} In klinischen Studien war sCD4 jedoch wahrscheinlich auf Grund von zu schlechter Bioverfügbarkeit und mangelnder Potenz gegen Primärisolate nicht erfolgreich.^{102;103} Die Firma Progenics konnte mit einem weiterentwickelten CD4-IgG-Fusionsprotein (PRO 542) den Plasmalevel von HIV in Phase I und II Studien bei guter Bioverfügbarkeit reduzieren.^{104;105} Auch das noch in den präklinischen Studien befindliche Cyanovirin-N (CV-N) ist ein guter Inhibitor der GP120-CD4-CCR5 Interaktion *in vitro*. Das *target* des CV-N stellen dabei die hoch mannosidischen Oligosaccharide des GP120 dar.^{106;107} Möchte man Inhibitoren für den humanen CD4-Rezeptor entwickeln, so hat man den Vorteil, dass sich dieses Protein nicht verändert wie das unter hohem Evolutionsdruck stehende Virus. Als Nachteil bei der Blockierung eines humanen Proteins muss aber ganz deutlich das mögliche Nebenwirkungsrisiko bedacht werden, vor allem weil das HIV-GP120 in erstaunlich ähnlicher Weise an den CD4- Rezeptor wie das Klasse II-MHC-Protein bindet, dessen Bindung für die natürliche Funktion des Immunsystems von großer Bedeutung ist.^{43;108} Ein solcher Inhibitor könnte demnach Nebenwirkungen wie Immunsuppression zur Folge haben. Bei einer so schweren Krankheit wie AIDS ist es allerdings zu bedenken, ob nicht die Nebenwirkungen für eine Verbesserung des Krankheitszustandes in Kauf genommen werden sollten. Zur Zeit gibt es eine Hand voll potentieller Inhibitoren der CD4-GP120 Wechselwirkung, die sich teilweise in den präklinischen oder klinischen Phasen befinden.^{32;109}

Die sekundäre Wechselwirkung von GP120 mit Chemokinrezeptoren auf der Wirtszelle ist ein weiterer Ansatzpunkt für die Wirkstoffentwicklung. Erste Versuche die Chemokinrezeptoren mit ihren natürlichen Liganden wie CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (Rantes), CXCL12 (SDF-1 α) etc. zu blockieren zeigten antivirale Aktivität.^{110;111} Sie sind aber therapeutisch nicht einsetzbar, da sie zu Fieber und Schockreaktionen führen. Heutzutage gibt es mehrere Gruppen von Verbindungen, die die Interaktion zwischen GP120 und der Chemokinrezeptoren unterbinden können. Man zählt dazu Antikörper gegen CCR5, nicht-agonistisch wirkende Chemokin-Derivate und typische Wirkstoffmoleküle. Ein Beispiel für einen Antikörper ist das PRO 140 (Progenics), welches den CCR5-Rezeptor blockiert und dadurch die Bindung zum GP120 inhibiert.¹¹² Das TAK-779 (Takeda) hingegen ist ein CCR5-Antagonist und zeigt antivirale Aktivität gegen R5-trope HIV-Stämme.¹¹³ Es bindet in eine

Bindungstasche, die durch die transmembranen Domänen des CCR5 ausgebildet wird, und induziert eine konformationelle Änderung in der Struktur des CCR5, so dass eine Bindung an das GP120 nicht mehr möglich ist. Dabei wird die natürliche Funktion des CCR5 nicht beeinträchtigt.¹¹⁴ Das UK-427, 857 (Pfizer) und das SCH-C (Schering Plough) zählen zu der gleichen Klasse Inhibitoren, wie das TAK-779 und zeigten in klinischen Studien der Phase I neben guten inhibierenden Eigenschaften auch eine gute Verträglichkeit und gute Bioverfügbarkeit.¹¹⁵ Zu erwähnen ist auch noch das AMD3100 (AnorMED), das einen CXCR4 Antagonisten darstellt und zu der Gruppe der Bicyclame gehört. In klinischen Phasen I und II konnte gezeigt werden, dass neben guter Verträglichkeit die Behandlung zu einem kompletten Verlust des X4-tropen HIV-Stämme im Blut führte.^{115;116} Das bedeutet, dass eine selektive Blockade des CXCR4-Rezeptors den *switch* des Virus vom R5-tropen HIV zum aggressiveren X4-tropen HIV verhindert, wodurch der Beginn von AIDS hinausgezögert werden kann.

Auch auf Seiten des GP120 wird versucht, die Corezeptor-Bindungsstelle zu blockieren. Cellulose-Acetat-Phthalat (CAP), das zum Umhüllen von Tabletten verwendet wird, kann die Corezeptor-Bindungsstelle am GP120 blockieren. Es kommt dabei in Anwesenheit von CD4 zur Ausbildung des Übergangszustandes „*Trimer-of-Hairpins*“ (Abbildung 5), ohne dass ein Corezeptor gebunden ist und führt damit zu einer verminderten HIV-Infektiösität.^{117;118} Auch Antikörper, die im Bereich der V3-Region binden, können die Corezeptor-Bindungsstelle am GP120 blockieren. Ein Beispiel dafür ist das 447-52D (Merck Laboratories), welches an die GPxR-Sequenz bindet und sowohl R5- als auch X4-Isolate neutralisieren kann.¹¹⁹

Die Fusion von Virus- und Zellmembran stellt beim *entry* den letzten Schritt dar, der inhibiert werden könnte. Peptide oder Proteinkonstrukte, die an die C- oder die N-Peptid Region des GP41 binden, können deren gegenseitige Assoziation zur *trimer-of-hairpins*-Struktur blockieren.¹²⁰ Mit dem Peptid T20 (Handelsname *Fuzeon*, Trimeris, Inc.) ist im Jahr 2002 der erste und bisher einzige HIV-*Entry*-Inhibitor in der Therapie zugelassen worden, der nach diesem Prinzip wirkt.^{121;122} T20 ist ein 36-Aminosäuren langes Peptid aus dem Bereich der extracellulären C-terminalen Helix des GP41 (C-Peptid). Ein weiteres mögliches Strukturmotiv, welches für die Bindung von typischen Wirkstoffmolekülen geeignet ist, stellt eine hydrophobe Tasche in der extrazellulären Domäne von GP41 dar.^{123;124} Fusionsinhibitoren mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich konnten für dieses Motiv schon entwickelt werden.^{125;126}

2. Methoden

2.1. *Festphasenpeptidsynthese*

Bei der Peptidsynthese gibt es heutzutage drei Methoden, bei denen die Aminosäuren in einer vorgegebenen Reihenfolge über eine Peptidbindung (Amidbindung) miteinander verknüpft werden. Neben der rein chemischen Methode, die im Folgenden noch weiter erläutert wird, gibt es die enzymatischen Methoden unter Verwendung von Peptidasen,¹²⁷ sowie die gentechnologische Synthese in Expressionssystemen, die besonders für höher molekulare Peptide bzw. Proteine angewendet wird.^{128;129}

R. B. Merrifield (Nobelpreis 1984) hat die rein chemische Synthese entscheidend durch die Entwicklung der Festphasensynthese geprägt, die eine Automatisierung der Peptidsynthese ermöglichte.¹³⁰ Dabei erfolgt die Synthese entgegen der biologischen Sytheserichtung an einer festen Phase vom C- zum N-Terminus.

In Abbildung 10 ist das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese mit Fmoc-geschützten Aminosäuren schematisch gezeigt. Die erste Aminosäure (C-terminal) wird mit ihrer aktivierten α -Carboxylfunktion an das Harz über einen Linker gebunden. Diese Fixierung an der festen Phase ermöglicht den Einsatz hoher Überschüsse und die problemlose Entfernung von nicht reagierten Komponenten durch zwischengeschaltete Waschzyklen. Anschließend wird durch Behandlung mit Piperidin die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die Kette kann nun entsprechend der Primärsequenz aufgebaut werden, indem nun die Kupplung und Fmoc-Abspaltung der nächsten Aminosäure erfolgt. Zur Vermeidung von Peptiden mit Deletionsstellen wird jeweils nach der Aminosäure-Kupplung ein Blockierungsschritt durch Acetylierung (*capping*) aller nicht umgesetzten, noch freien Aminofunktionen durchgeführt. Abschließend wird das Zielpeptid vom Harz abgespalten. Dabei werden seine Seitenketten-Schutzgruppen entfernt.

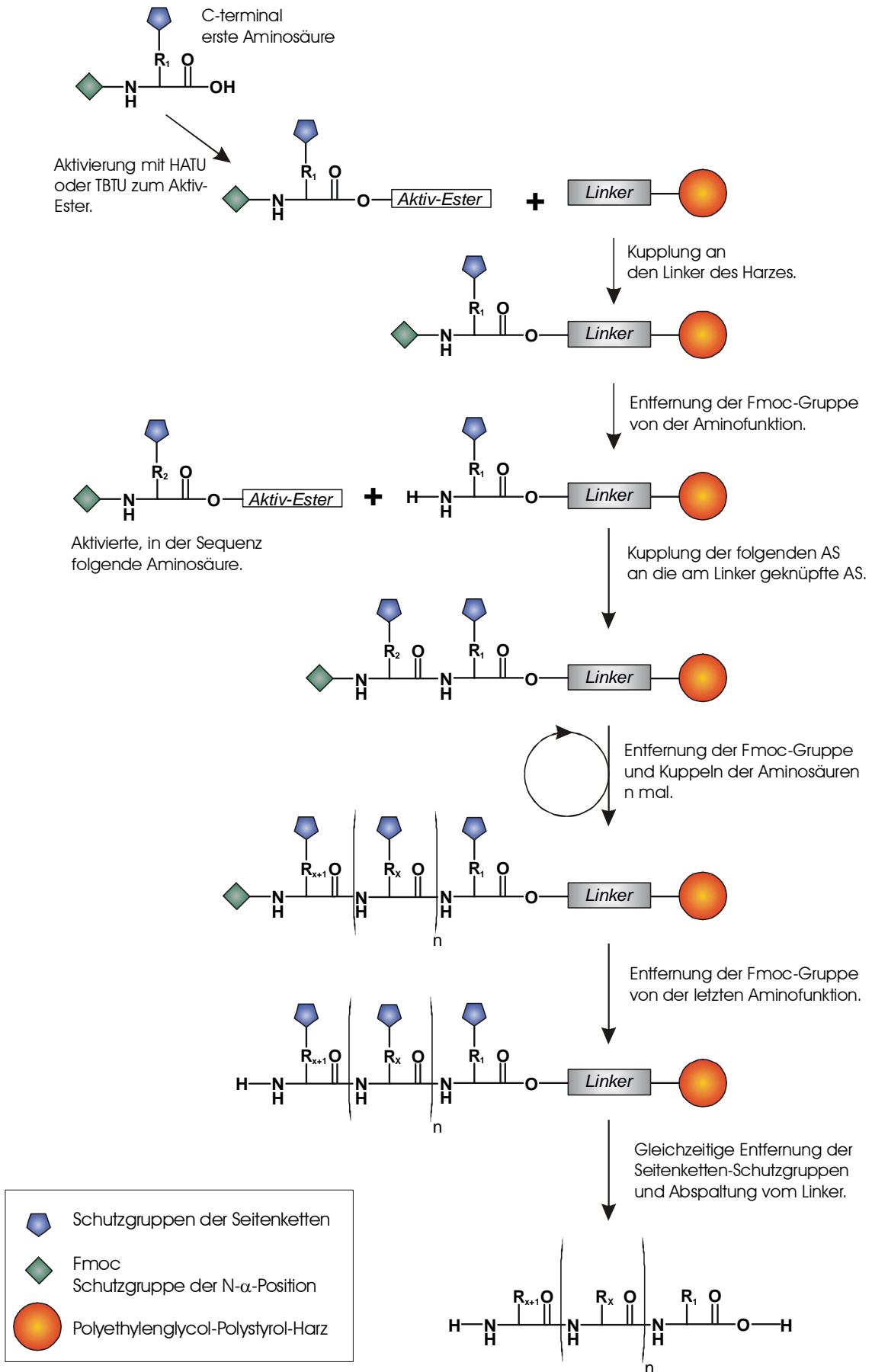


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.

Da Aminosäuren multifunktionelle Verbindungen sind, d.h. dass viele Aminosäuren in den Seitenketten noch weitere reaktionsfähige Funktionalitäten wie z.B. Hydroxy-, Carboxy-, Amino- oder Thiolgruppen aufweisen, muss eine orthogonale Schutzgruppenstrategie angewandt werden. Als Seitenkettenschutz dienen in dieser Arbeit Trt-, Pbf-, *t*Bu- und Boc-Gruppen, die sich problemlos mit wasserhaltiger TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan als *scavenger* entfernen lassen. Das Triisopropylsilan fungiert als Hydridionendonator und sorgt durch Reaktion mit den während der Abspaltung gebildeten Carbokationen dafür, dass diese nicht wieder mit dem Peptid reagieren können.¹³¹

Die Bindung zwischen *Linker* und Peptidkette muss während der Synthese fest, aber nach Beendigung der Synthese leicht zu spalten sein. Als feste Phase verwendet man ein Polystyrolharz, an dem Linkergruppen angebracht sind. Diese tragen an ihren Enden z.B. Fmoc-geschützte Aminofunktionen oder Hydroxybenzylgruppen. Die erste Aminosäure wird folglich als Amid oder als Benzylester an den Linker gebunden. Nach der Abspaltung des Peptids haben diese entweder eine am Carboxylende amidierter oder eine freie Carboxy-Gruppe. Die chemischen Eigenschaften der Linker entscheiden weiterhin, ob Seitenkettenschutzgruppen bei der Abspaltung vom Harz erhalten bleiben oder mit abgespalten werden.

Die α -Aminofunktion der zu kuppelnden Aminosäure muss während der Bindungsbildung geschützt sein, beim nächsten Syntheszyklus jedoch wieder frei vorliegen. Hierfür hat sich die Fmoc-Schutzgruppe etabliert, da sie einerseits unter basischen Bedingungen (z.B. Piperidin/DMF 1:4) leicht abspaltbar ist und andererseits sich die Ausbeute der Kupplungsschritte photometrisch durch Messen des bei der Abspaltung entstehenden Methylenfluorens leicht verfolgen lässt.

Die Carboxylfunktion der zu kuppelnden Aminosäure muss aktiviert werden, um eine Kupplung unter milden Bedingungen zu gewährleisten. Während früher häufig Carbodiimide zur Aktivierung eingesetzt wurden, verwendet man heutzutage meistens Hydroxybenzotriazol-derivate wie HATU oder das kostengünstigere TBTU. Diese bieten eine Reihe wichtiger Vorteile, wie hohe Ausbeuten, kurze Kupplungszeiten, gute Kupplungseffektivität bei sterisch gehinderten Aminosäuren und geringe Racemisierung (Abbildung 11).^{132,133;134}

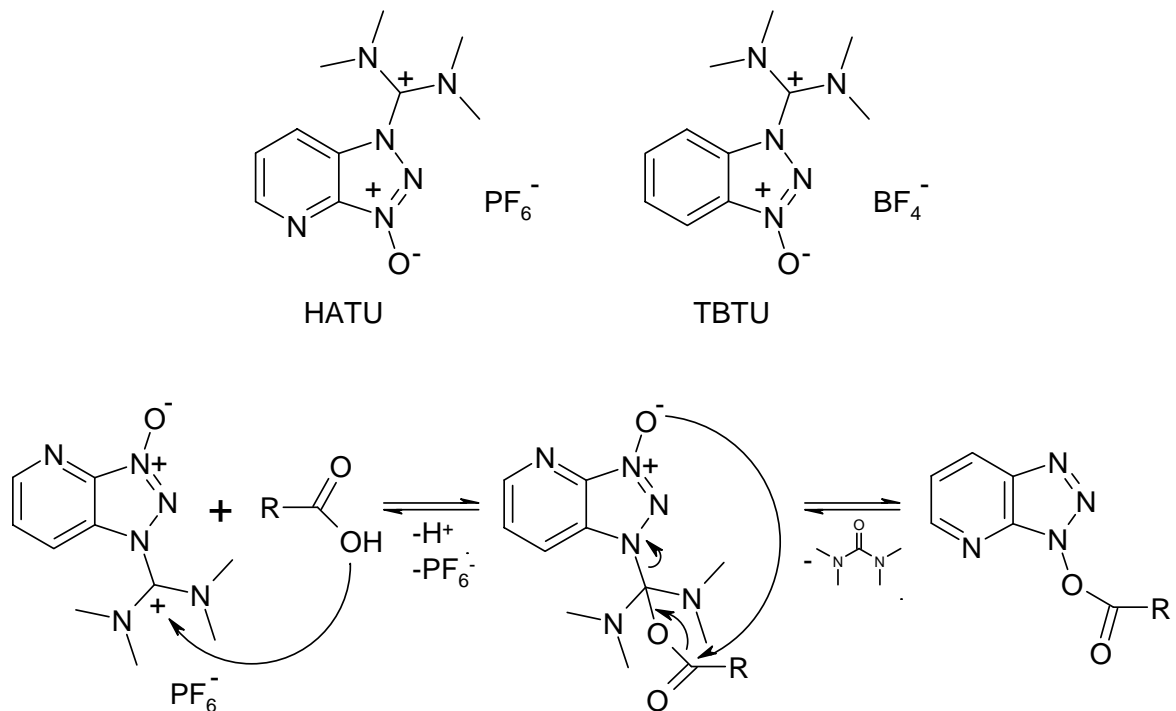


Abbildung 11: Die Aktivatoren HATU und TBTU (oben) und der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU (unten).

Bei den heutzutage handelsüblichen Peptidsynthesizern gibt es zwei unterschiedliche Verfahren, das „*continuous flow*“- und das „*batch*“-Verfahren. Beim ersteren wird die Reaktionsmischung über das in einer Säule befindliche Harz gepumpt. Bei dem „*batch*“-Verfahren erfolgen die Reaktionen in einem Gefäß, und die Mischung der Komponenten wird über einen Vortex-Mechanismus erreicht.

2.2. Charakterisierung und Konformationsanalyse von Peptiden

2.2.1. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie mit klassischen Methoden wie z.B. der Elektronen-Stoß-Ionisation (EI) führt bei Verbindungen mit hoher Molmasse zu Spektren, in denen vorwiegend Bruchstücke der untersuchten Verbindung nachgewiesen werden (Fragmentierung). Abhilfe schaffen hier die *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) und die *electron spray ionization – mass spectrometry* (ESI-MS).¹³⁵ Durch besonders sanfte Ionisierungsmethoden können hier vor allem unfragmentierte Moleküle nachgewiesen werden. Die Schnelligkeit und hohe Empfindlichkeit

bis in den femtomolaren Bereich hinein machen sie zu einer wertvollen Methode zur Analytik von nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehenden Substanzen, wie z.B. Biomolekülen.

Bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einer geeigneten Matrix (z.B. DHB oder CCA) kokristallisiert. Ein Laser lässt durch lokale Erhitzung die Matrixmoleküle schlagartig verdampfen, wobei die Probenmoleküle mitgerissen werden.¹³⁶ Die Ionisation der Probenmoleküle findet durch einen Ladungstransfer von den vorher durch Photoionisation angeregten Matrixmolekülen statt. Die Ionen werden dann in einem elektrischen Feld beschleunigt, und im nachfolgenden TOF-Analysator wird dann anhand der Flugzeit der Ionen das Masse-Ladungsverhältnis bestimmt.

Bei der ESI-Massenspektrometrie handelt es sich um ein homogenes Ionisationsverfahren, bei dem die Probe aus einer Lösung in einem elektrischen Feld versprüht wird.¹³⁷ Hierbei treten neben den einfach geladenen auch mehrfach geladene Molekülionen auf. Die Bestimmung des Masse-Ladungsverhältnisses geschieht hier in der Regel über einen Quadrupol. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber der MALDI-TOF-Massenspektrometrie liegt in der möglichen Kopplung mit einer HPLC, so dass auch Substanzgemische nach vorheriger Trennung direkt vermessen werden können.

2.2.2. NMR

1D-NMR-Spektren reichen nicht mehr aus, wenn größere Moleküle wie z.B. Peptide charakterisiert werden sollen, da es zu Signalüberlagerungen kommt und damit die Spektren nicht mehr eindeutig auswertbar sind. Abhilfe schaffen hierbei zweidimensionale NMR-Spektren.¹³⁸ Mit Hilfe der im Folgenden erläuterten 2D-Experimente lassen sich die einzelnen Spinsysteme identifizieren und skalare sowie dipolare Kopplungen ermitteln.

Das TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)-Experiment ermöglicht die Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäurespinsysteme eines Peptids.¹³⁹ Dabei wird das Spektrum möglichst in Wasser aufgenommen, da die NH-Spuren hierbei am besten dispergiert und von den anderen Signalen separiert sind. Über die NH-Spuren lassen sich die meisten Signale der einzelnen Aminosäuren ihren Protonen eindeutig zuordnen. Idealerweise kann man auf einer Spur das gesamte Spinsystem einer Aminosäure beobachten. Eine totale Korrelation der gekoppelten Spins innerhalb eines Spinsystems wird durch Anlegen eines sog. Spinlockfeldes im TOCSY-Experiment erreicht. Die Spinlockzeit und die Kopplungskonstanten des Spinsystems sind dabei verantwortlich für die Ausdehnung des

Magnetisierungstransfers. Bei $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungen, die kleiner als zwei Hertz sind, wird bei Standardparametern nur noch wenig Transfer beobachtet.

Das NOESY (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*)-Experiment dient zur Sequenzbestimmung eines Peptids, da NOEs von einer Aminosäure zur benachbarten zu sehen sind (Kontakt $\text{NH}_{\text{ASX}}-\text{H}\alpha_{\text{ASX-1}}$). Durch die Analyse der NH-NH-Kontakte kann man weiterhin Aussagen über die Sekundärstruktur machen. Darüber hinaus können durch das Auftreten von weiteren NOE-Kontakten interatomare Abstände zwischen 2 und 5 Å ermittelt werden, die Anhaltspunkte für die dreidimensionale Struktur des Proteins oder Peptids geben.

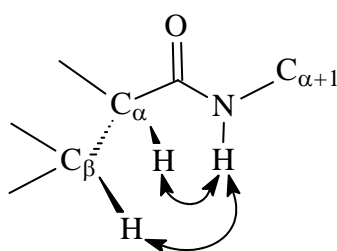


Abbildung 12: Sequentielle NOE-Kontakte zwischen benachbarten Aminosäuren.

Bei der dipolaren Spin-Kopplung, die über den Raum stattfindet, beeinflussen sich die Spins zweier Kerne durch einen Magnetisierungstransfer gegenseitig in ihrem Relaxationsverhalten (Kreuzrelaxation).¹⁴⁰ Die Kreuzrelaxation führt zum Phänomen des *Nuclear-Overhauser-Enhancement* (NOE).¹⁴¹ Der räumliche Abstand der Kopplungspartner zueinander wirkt sich dabei auf die Intensität eines NOESY-Kreuzsignals aus. Da es sich beim NOE um ein reines Relaxationsphänomen handelt, ist es unerheblich, ob die Spins zusätzlich über eine skalare Kopplung miteinander in Verbindung stehen.

2.2.3. Circular Dichroismus (CD)

Um die dreidimensionale Struktur eines Proteins oder Peptids zu bestimmen, nutzt man NMR oder röntgenkristallographische Methoden, die einen gewissen Aufwand bedeuten. Möchte man aber schnell Informationen über die Sekundärstruktur erhalten oder konformationelle Änderungen über einen Zeitraum hinweg beobachten, so kann man auf die Technik der CD-Spektroskopie zurückgreifen.^{137;142;143}

Die CD-Spektroskopie stellt eine spezielle Art der Absorptionsspektroskopie im UV- bzw. im VIS-Bereich des Spektrums dar. Grundlage der Methode ist die Wechselwirkung linear polarisierten Lichts mit optisch aktiven Substanzen. Eine linear polarisierte Welle lässt sich als Überlagerung zweier entgegengesetzt gerichteter circular polarisierter Wellen von gleicher Amplitude und Phase beschreiben. Werden die beiden circular polarisierten Komponenten beim Durchgang durch eine Probe verschieden stark absorbiert, so liegt Circular dichroismus vor.¹⁴⁴

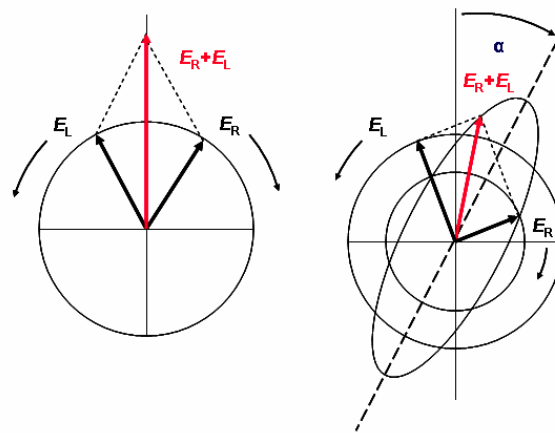


Abbildung 13: Links: Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung zweier entgegengesetzt gerichteter circular polarisierter Wellen gesehen werden. Rechts: Verschiedene Absorptionen der links und rechts polarisierten Komponente führen zu Elliptizität (CD) und optischer Rotation (OR).

Der Unterschied der Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ ist dabei die eigentliche Messgröße. Es wird jedoch unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten eine molare Elliptizität angegeben (Gleichung 1).

$$[\theta]_{\lambda} = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$$

Gleichung 1

Voraussetzung für optische Aktivität ist eine vorhandene Chiralität des Moleküls. Hierbei kann außer eines asymmetrischen C-Atoms auch die Molekülstruktur eine Asymmetrie induzieren. Dies ist für die biochemische Anwendung der CD-Spektroskopie an Proteinen von großer Bedeutung. In diesem Fall ist die Carbonyl-Gruppe der Peptid-Bindung das Chromophor. Die induzierte Asymmetrie tritt dabei aufgrund des benachbarten asymmetrischen C-Atoms auf, wodurch der Chromophor optisch aktiv wird. Aber nicht nur dieser statische Einfluss ist in Proteinen von Bedeutung, sondern es muss weiterhin die Kopplung mit anderen Chromophoren berücksichtigt werden. So erzeugt eine asymmetrische

Sekundärstruktur, wie z.B. eine α -Helix, optisch aktive Chromophore durch Bildung gekoppelter Oszillatoren ohne Symmetriezentrum oder Symmetrieebene. Chiralität eines Stoffes kann also auch aus der Struktur eines Makromoleküls resultieren. Das CD-Spektrum zeigt die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge des Lichtes. Dafür wird meistens der Bereich von 180-250 nm aufgenommen. Man erhält eine Absorptionsbande, wobei ein positiver bzw. negativer Circular dichroismus (Cotton-Effekt) unterschieden wird, je nachdem ob die rechts- oder linkscircular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird. Anhand des Cotton-Effektes ist es nun möglich, durch Vergleich mit Referenzspektren Konformationen von biologischen Makromolekülen zu bestimmen.¹⁴⁵

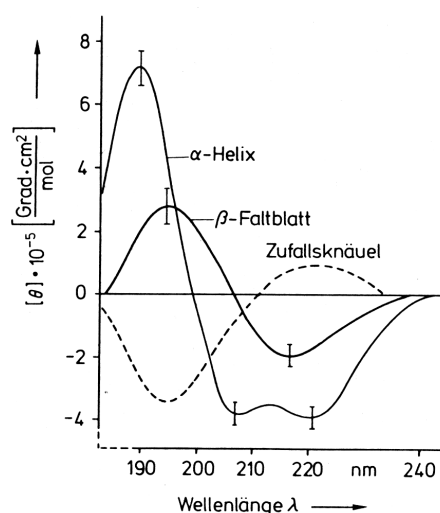


Abbildung 14: Poly-L-Lysin CD-Spektren in wässriger Lösung bei 100 % α -Helix (pH < 10.4, RT), 100 % β -Faltblatt (pH < 10.4, T = 50 °C) und 100 % Zufallsknäuel (pH > 10.4, RT).

In Abbildung 14 sind CD-Spektren des Poly-L-Lysins unter verschiedenen Bedingungen zu sehen. Deutlich erkennt man in den Spektren die Unterschiede in den Banden zwischen α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel. Ein CD-Spektrum eines Proteins kann nun als Summe von Einzelspektren dieser in Abbildung 14 gezeigten Sekundärstruktur-Komponenten betrachtet werden. Um aus dem Proteinspektrum wieder die einzelnen Sekundärstrukturanteile zu erhalten, nutzt man Computerprogramme, welche auf eine Datenbank von Spektren unterschiedlicher Proteine mit bekannter Sekundärstruktur zurückgreifen.¹⁴⁶

2.3. *Bindungsstudien*

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten und Bindungsepitope wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden angewendet, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

2.3.1. *Surface Plasmon Resonance (SPR)*

Bereits 1959 wurden die physikalischen Grundlagen für die heute oft angewandte Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Technik (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) beschrieben, die auf der Interaktion von totalreflektiertem Licht mit Oberflächenplasmonen eines reflektierenden Metallfilms beruhen.¹⁴⁷ Trifft linear polarisiertes Licht unter Totalreflexion auf eine reflektierende Schicht, so erzeugt es eine so genannte evaneszierendes Feld jenseits dieser Schicht. Durch Wechselwirkung mit einem Metallfilm wird dieses Feld verstärkt und kann unter bestimmten Bedingungen mit den Oberflächenplasmonen des Metallfilms in Resonanz treten. Dies geschieht bei einem Reflexionswinkel, der vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängt, und führt zu einer Intensitätsverringerng des reflektierten Lichts.¹⁴⁸

Die SPR-Messungen werden in einer Messzelle vollzogen, bei der die eine Wand aus dem Messchip besteht. An dieser Wand wird die Lösung des Bindungspartners vorbeigeleitet. Eine weitere Zelle dient als Referenzzelle. Kommt es nun in der Messzelle zu einer Komplexbildung mit den immobilisierten Molekülen auf dem Messchip, so findet eine Anreicherung des gelösten Stoffes und damit eine Massenzunahme statt. Dadurch ändert sich der Brechungsindex der Lösung an der Chipoberfläche und die Wechselwirkung mit der evaneszierenden Welle ändert sich. Eine auftretende Resonanz wird als eine Intensitätsabschwächung des Lichtes bei einem bestimmten Winkel als *resonance units* (RU) detektiert (Abbildung 15 oben rechts).

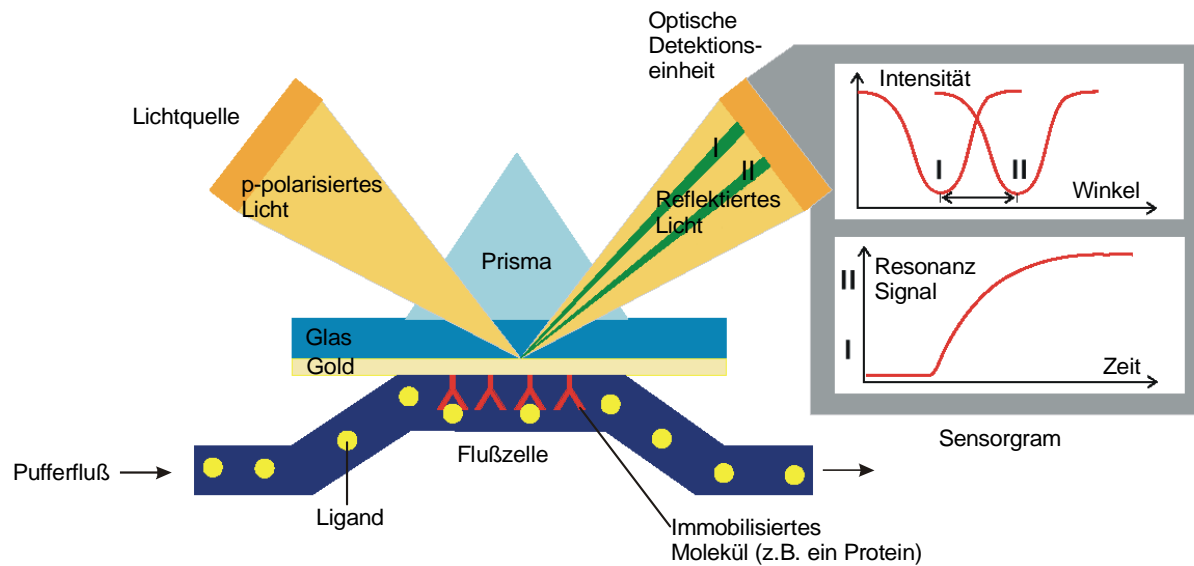


Abbildung 15: Schematische Darstellung des SPR-Experiments.¹⁴⁹

Als optische Methode ist die SPR-Technik sehr empfindlich. Die Oberfläche des Messchips in der Messzelle beträgt in etwa 1 mm^2 . Es ist so möglich, Massenänderungen von wenigen Pikogramm (1 Pikogramm ca. 1 *resonance unit* [RU]) zu detektieren und die Bindung von niedermolekularen Verbindungen mit Molekulargewichten deutlich unter 1000 Da z.B. an immobilisierten Proteinen bis in den Bereich von Dissoziationskonstanten im Millimolbereich zu untersuchen. Aber auch größere Systeme wie Bakterien, Viren und Zellen konnten schon erfolgreich untersucht werden.¹⁵⁰⁻¹⁵²

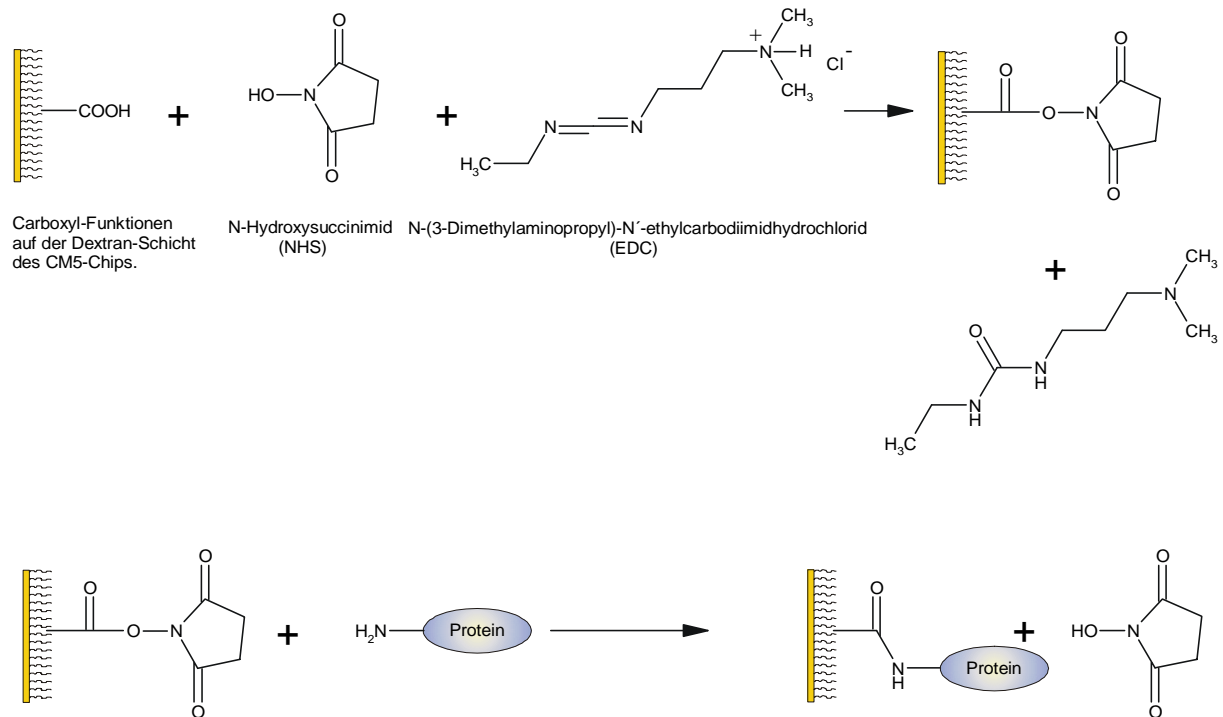


Abbildung 16: Immobilisierung von z.B. Proteinen durch Amin-Kupplung an einen CM5-Chip.

Je nach Anwendung stehen unterschiedliche Messchips und entsprechende Immobilisierungsverfahren zur Verfügung.¹⁴⁸ Der gebräuchlichste CM5-Messchip besteht aus einer Glasschicht mit darauf aufgedampfter Goldschicht, auf der sich wiederum eine über Linker fixierte carboxymethylierte Dextran-Matrix befindet. Die Immobilisierung findet bei einem CM5-Messchip über eine kovalente Amid-Bindungen statt (Abbildung 16). Zunächst werden die Carboxyl-Funktionen der Dextran-Schicht durch Zugabe von NHS und EDC in Aktivester überführt. Anschließend kann der Ligand kovalent über eine vorhandene Aminogruppe gebunden werden. Zum Schluss werden alle nicht belegten, aber aktivierten Carboxylfunktionen mit einem Überschuss an Ethanolamin umgesetzt und so inaktiviert.

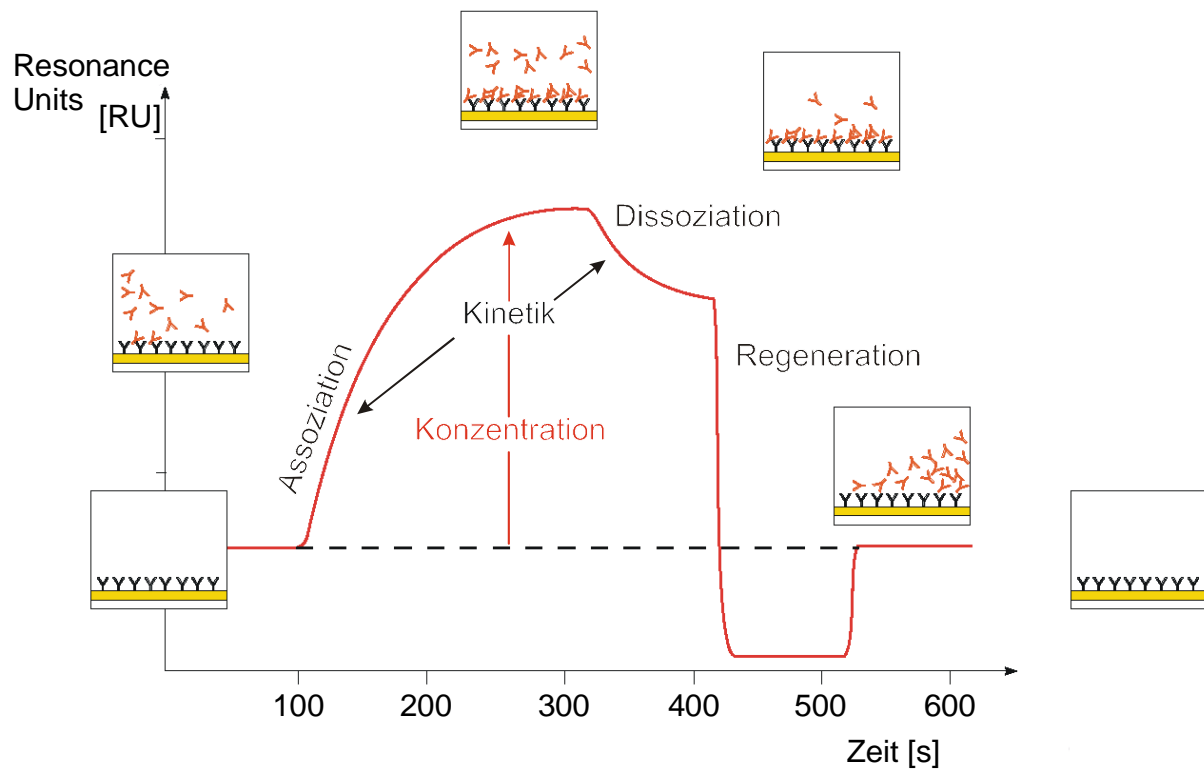


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines SPR-Sensorgramms.¹⁴⁹

In Abbildung 17 ist ein Sensorgramm für ein idealisiertes SPR-Experiment abgebildet. Es sind die drei Stufen Assoziation, Dissoziation und Regeneration zu erkennen. Die Assoziation oder Komplexbildung beginnt mit der Zugabe des Bindungspartners zur Lösung. Es findet eine Komplexbildung mit dem immobilisierten Bindungspartner statt. Dadurch nimmt das SPR-Resonanzsignal (gemessen in RU) zu. Die Steigung des Signals wird nach einiger Zeit geringer, da fast alle Bindungsstellen auf der Chipoberfläche mit löslichem Bindungspartner belegt sind. Schließlich stellt sich ein Gleichgewicht ein und man erhält eine Sättigung (*steady state*). Nach dem Entfernen des Bindungspartners aus der Lösung dissoziiert der Komplex langsam und die RU-Antwort fällt durch den veränderten Brechungsindex ab. Bei nicht vollständiger Dissoziation muß die Chipoberfläche durch eine geeignete Methode wie z.B. Änderung des pH-Werts regeneriert werden.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) können direkt aus dem Signalverlauf ermittelt werden. Daraus ergibt sich die Gleichgewichtskonstante der Dissoziationsreaktion K_D nach Gleichung 2.¹⁵³

$$K_D = k_{off} / k_{on}$$

Gleichung 2

Weiterhin kann der K_D -Wert beispielsweise bei einem angenommenen *one-site binding* Modell durch eine Konzentrationsreihe ermittelt werden. Hierbei verhalten sich die im SPR gemessenen *response units* (RU) im *steady state* proportional zur Konzentration (c_L), wie Gleichung 3 wiedergibt. Nachdem man die Gleichgewichts-RU-Werte gegen die Konzentration aufgetragen hat, kann man eine Regressionsanalyse durchführen. Das Ergebnis ist eine Funktion, deren Wert bei $RU_{\max}/2$ der Dissoziationskonstante K_D entspricht.

$$RU = RU_{\max} * c_L / K_D + c_L \quad \text{Gleichung 3}$$

2.3.2. SPR-Bindungsstudien mit Zellen

Um in SPR-Bindungsstudien die Wechselwirkung von GP120 mit dem CCR5-Corezeptor studieren zu können, kann man so genannte GHOST-HI5-Zellen einsetzen, die diesen Corezeptor überexprimieren. Dabei liegt die Zahl der auf der Zelloberfläche befindlichen CCR5-Corezeptoren bei ca. 10^4 bis 10^6 Kopien pro Zelle. Es handelt sich um eine humane Osteosarkoma-Zelllinie (HOS). Als Negativkontrolle dienen GHOST-Parentalzellen. Sie sind mit den HI5-Zellen identisch, exprimieren allerdings kein CCR5 auf ihrer Zelloberfläche.

Bei der gewöhnlichen SPR-Messung mit Molekülen ist die Anzahl der detektierten RUs ein Maß für die Zahl der entstandenen Komplexe. Bei Zellen hingegen steigt die Massenzunahme nicht linear mit der Zahl der gebildeten Komplexe an, da eine einzelne Zelle über mehrere Rezeptoren an mehrere immobilisierte Liganden bindet. Außerdem bedingt die äußere Gestalt der Zelle, dass viele Rezeptoren nicht die Möglichkeit haben in die Nähe der Bindungspartner zu gelangen, da sie sich auf der von der Chipoberfläche abgewandten Seite der Zelloberfläche befinden. Ein K_D -Wert kann daher bestenfalls abgeschätzt werden.

2.3.3. Saturation Transfer Difference (STD)-NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der STD-NMR-Spektroskopie können Bindungsaktivitäten zwischen niedermolekularen Liganden und makromolekularen Rezeptoren untersucht werden.¹⁵⁴⁻¹⁵⁸ Man kann nach dieser Methode Bindungsepitope von Liganden charakterisieren, Dissoziationskonstanten bestimmen und Substanzbibliotheken nach bindenden Substanzen durchsuchen.^{157;159} Das Prinzip der STD-NMR-Spektroskopie ist in Abbildung 18 gezeigt.

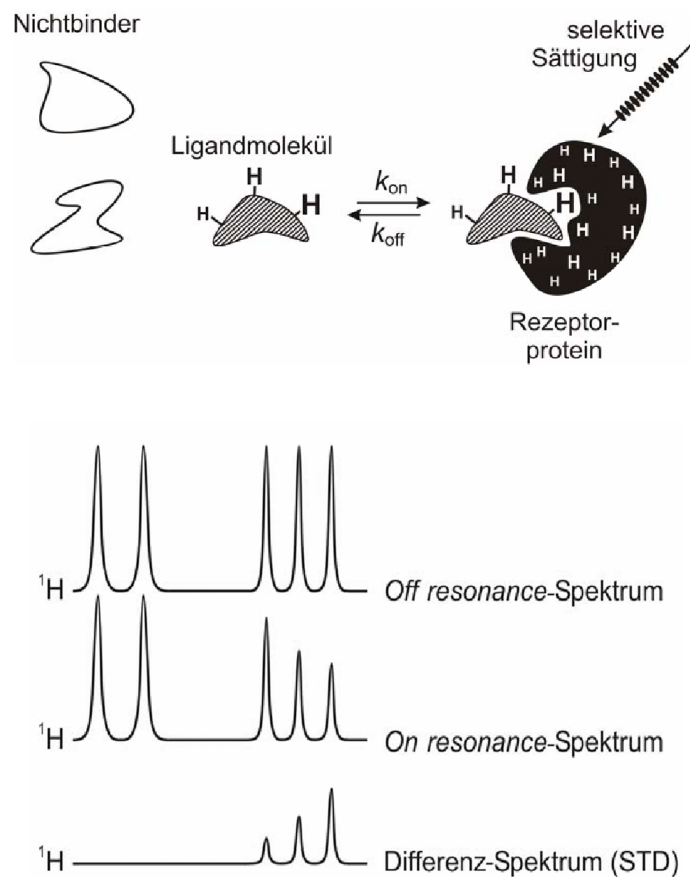


Abbildung 18: Prinzip der *saturation transfer difference* (STD)-NMR-Spektroskopie. Nach der selektiven Sättigung des Rezeptorproteins wird diese auf den Liganden übertragen und in Lösung nach der Dissoziation beibehalten. Je enger der Kontakt zum Rezeptor war, desto mehr Sättigung wurde übertragen und desto intensiver sind die resultierenden Signale im STD-Spektrum. Nichtbinder erhalten keine Sättigung und zeigen im STD-Spektrum keine Signale.

Das STD-NMR-Experiment besteht aus zwei Teilspektren, die *on resonance*-Spektrum und *off resonance*-Spektrum genannt werden. Die Differenz dieser beiden Spektren ergibt das STD-NMR-Spektrum. Signale des Proteins können bei der Messung z.B. durch ein Spinlockfeld herausgefiltert werden.

Im *on resonance*-Spektrum werden Resonanzen des Proteins selektiv durch Einstrahlen einer passenden Frequenz gesättigt. Die selektive Sättigung von Proteinresonanzen wird möglich, da zum einen Anisotropieeffekte in geordneten Bereichen auftreten, die zu extremen chemischen Verschiebungen führen, und zum anderen Linienverbreiterungen bei Proteinen ab einer Größe von etwa 10 kDa stattfinden (Spindiffusionsgrenze). Dadurch gehen Signalausläufer über das normale spektrale Fenster von 0-12 ppm hinaus. Bei einem Einstrahlpunkt von beispielsweise -1 ppm mit selektiven Pulsen (z.B. einer Gauss-Anregung)

können die Resonanzen des Proteins selektiv gesättigt werden, während kleine Moleküle mit scharfen Resonanzen davon nicht beeinflusst werden. Da in Proteinen ab einer Größe von etwa 10 kDa die Spindiffusion sehr effektiv ist (Magnetisierungstransfer über das gesamte Molekül innerhalb weniger 100 ms), können durch selektive Sättigung einzelner Resonanzen sämtliche Signale eines Proteins im NMR-Spektrum ausgelöscht werden.

Im *off resonance*-Spektrum liegt der Einstrahlpunkt beispielsweise bei 40 ppm, so dass keine Proteinsignale getroffen werden. Die Einstrahlung ist aber trotzdem nötig, um bei der Differenzbildung der *on* und *off resonance*-Spektren gleiche Bedingungen zu schaffen und dadurch Subtraktionsartefakte zu umgehen, die sonst durch Temperaturschwankungen wegen der absorbierte Energiemenge in dem einen aber nicht in dem anderen Spektrum entstehen würden.

Nicht bindende Moleküle zeigen im *on* und *off resonance*-Spektrum gleiche Resonanzen und werden im Idealfall bei der Differenzbildung zu Null subtrahiert. Liganden hingegen zeigen im Differenz-Spektrum Signale. Dabei sind deren Intensitäten umso stärker, je mehr Sättigung sie unter *on resonance*-Bedingungen durch intermolekularen Sättigungstransfer erhalten haben. Dieser Sättigungstransfer gehorcht der r^{-6} -Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate und ist damit umso stärker, je enger die zugehörigen Protonen mit dem Protein in Kontakt treten. Die Intensitätsunterschiede der einzelnen Protonen eines Liganden innerhalb eines STD-NMR-Spektrums kann man somit zur Bestimmung des Bindungsepitops nutzen. Die Intensitäten der Signale hängen aber noch von weiteren Parametern ab, wie z.B. den Aufnahmebedingungen und der Probenzusammensetzung. Außerdem bestimmen Kinetik und Thermodynamik der Ligand-Protein-Interaktion und auch die T_1 -Relaxationszeiten der beteiligten Protonen die Intensitäten mit.^{160;161} Ein Proton mit einer langen T_1 -Relaxationszeit kann mehr Sättigung akkumulieren, als eines, das sehr schnell relaxiert. Dieser Effekt nimmt mit steigender Sättigungszeit zu. Unter ungünstigen Umständen kann das beim *epitope mapping* anhand von STD-NMR-Spektren mit langer Sättigungszeit, d.h. sehr unterschiedlichen T_1 -Relaxationszeiten der betrachteten Protonen, die eigentlichen Abstände der Ligandprotonen zur Bindungstasche verfälschen. Hier gilt, je länger die Sättigungszeit, desto mehr machen sich die Unterschiede in den T_1 -Relaxationszeiten bemerkbar. In solchen Fällen kann eine STD-Aufbaurate ermittelt werden, indem mehrere STD-NMR-Spektren mit verschiedenen Sättigungszeiten t_{sat} aufgenommen werden. Die ermittelten STD-Effekte werden dann gegen t_{sat} aufgetragen. Die initiale Steigung dieser Kurven ist frei vom Betrag der Relaxationsrate und spiegelt die extrapolierte Sättigungsrate bei $t_{sat} = 0$ wieder.

Limitierend wirkt sich bei dieser Methode allerdings die Qualität der Spektren bei kurzen Sättigungszeiten aus, da dort naturgemäß nur kleine STD-Effekte erreicht werden.

Der Quotient aus dem Integral eines individuellen Protonensignals im STD-NMR-Spektrum ($I_0 - I_{\text{sat}}$) und dem im *off resonance*-Spektrum (I_0) wird im Allgemeinen durch die absoluten STD% angegeben (Gleichung 4).

$$\text{STD\%} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \quad \text{Gleichung 4}$$

$$\text{STD Amplifikationsfaktor} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} * \text{Ligand Überschuss} \quad \text{Gleichung 5}$$

$$\text{STD Amplifikationsfaktor} = \frac{\text{STD Amplifikationsfaktor}_{\text{max}} * c}{K_D + c} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Dissoziationskonstanten können durch die Aufnahmen mehrerer STD-NMR-Spektren mit verschiedenen Ligandüberschüssen ermittelt werden. Eine Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors (Gleichung 5) gegen die jeweilige Konzentration kann nach dem *one-site binding* Modell (Gleichung 6) gefittet werden. Der Einfluß der Sättigungszeit und der für jedes Proton individuellen Relaxationszeit wird bei dieser Verfahrensweise nicht berücksichtigt.

Beim STD-NMR-Experiment steigt der STD-Amplifikationsfaktor bei Erhöhung der Ligandkonzentration durch den Effekt des *turn over* selbst bei praktisch vollständiger Rezeptorbelegung noch weiter an. Das führt bei der Auftragung im Gegensatz zu Bindungsassays, bei denen direkt die Belegung von Bindungsstellen gemessen wird (SPR, ELISA), zu einem späteren Erreichen des Plateaus und damit folglich zu Dissoziationskonstanten, die gegenüber den eigentlichen Werten zu hoch liegen.

Allerdings kann man durch hohe Ligandüberschüsse die maximale Empfindlichkeit des STD-NMR-Experiments erlangen, indem die Wahrscheinlichkeit gesenkt wird, dass ein Ligandmolekül während einer Sättigungsphase mehrfach in die Bindungstasche gelangt und diese schon gesättigten bzw. partiell gesättigten Moleküle nicht mehr so effizient am Sättigungstransfer teilnehmen können wie ungesättigte Liganden.

Die STD-NMR-Spektroskopie lässt Untersuchungen von Bindungen in einem großen K_D -Wertebereich (pM-mM) zu und lässt sich mit vielen bekannten Pulsprogrammen kombinieren (z.B. STD-HSQC-Spektren für größere spektrale Dispersion). Limitierend wirkt sich allgemein jedoch die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion aus. Eine zu

schnelle Dissoziation führt zu nicht genügend Sättigung, die auf den Liganden übertragen wird, so dass Spektren mit einem sehr schlechten Signal/Rausch-Verhältnis entstehen. Das gleiche Problem entsteht, wenn der Ligand zu lange am Protein gebunden bleibt, so dass zu wenig gesättigte Liganden in Lösung vorliegen, die detektiert werden können. Folglich können nicht alle Protein-Ligand Wechselwirkungen aufgrund ihrer Kinetik untersucht werden. Die STD-NMR-Methode konnte inzwischen erfolgreich auf Festphasensysteme,¹⁵⁶ in Liposomen eingebettete Transmembranproteine¹⁵⁴ und sogar auf ganze Zellen übertragen werden.¹⁶²

3. Problemstellung

Zu Beginn einer HIV-1 Infektion dominieren M-trope Stämme, die bei der Bindung an die Wirtszelle neben der Wechselwirkung mit CD4 den Chemokinrezeptor CCR5 als Corezeptor nutzen.^{62;63} Eine Blockierung der für die Infektion nötigen GP120-CCR5 Wechselwirkung ist das Ziel bei der Entwicklung von so genannten *Entry*-Inhibitoren. Um einer Leitstruktursuche für einen *Entry*-Inhibitor den Weg zu bereiten, ist es von besonderer Bedeutung, die Wechselwirkung zwischen dem GP120 und dem CCR5 auf atomarer Ebene zu charakterisieren. Durch Mutations- bzw. Substitutionsstudien innerhalb des CCR5 konnte bereits gezeigt werden, dass der N-Terminus besonders wichtig für die Bindung zum GP120 ist.^{47;62;64} Dabei scheinen die vier Tyrosine innerhalb des N-Terminus, von denen einige posttranslational sulfatiert werden, eine besonders wichtige Rolle zu spielen.^{90-94;98}

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher Peptide aus dem Bereich des N-Terminus des humanen CCR5-Rezeptors dargestellt werden und mittels SPR und STD-NMR auf ihre Bindungseigenschaften zum GP120 hin untersucht werden. Da sich in vorherigen Arbeiten zeigte, dass Peptide aus dem CCR5 N-Terminus oftmals schwerlöslich in wässrigen Systemen sind,¹⁶³ soll im ersten Teil dieser Arbeit die Löslichkeit der Peptide verbessert werden. Dies soll zum einen durch Substitutionen einzelner, meist hydrophober Aminosäuren in mehreren Peptiden als auch durch Verkürzung der Peptidsequenzen erreicht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen auf Basis der optimierten Peptidsequenzen Peptide mit sulfatierten Tyrosinen dargestellt werden. Um Peptide darstellen zu können, in denen die enthaltenen Tyrosine teilweise sulfatiert vorliegen, muss zunächst eine entsprechende Methode für die Festphasenpeptidsynthese entwickelt werden. Dafür soll ein Fmoc-geschützter Sulfonyltyrosin-Baustein synthetisiert werden.

Die Charakterisierung der Peptide soll durch MALDI-TOF- oder ESI-Massenspektrometrie bzw. durch NMR-Spektroskopie erfolgen. Mit Hilfe von CD-Spektroskopie sollen Sekundärstrukturmerkmale erkannt werden. Die Bindungseigenschaften der Peptide zum GP120 sollen durch SPR-Messungen auch hinsichtlich des Sulfatierungsmusters untersucht werden. Abschließend sollen STD-NMR-Untersuchungen detaillierte Aussagen über die an der Bindung beteiligten Atomgruppen machen und so eine Formulierung des Bindungs epitops des CCR5 N-Terminus erlauben.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Festphasenpeptidsynthese

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden in vier separaten Ansätzen 27 Peptide bestehend aus 15 bis 31 Aminosäuren mit vollautomatischen Festphasen-Peptidsynthesizern dargestellt. Dabei kam für das Peptid **A1s** das *continous flow*-Verfahren an einem Pioneer Peptide Synthesizer der Firma Perseptive zum Einsatz und für alle anderen Peptide das *batch*-Verfahren an einem Parallelsyntheseroboter MOS 496Ω der Firma Advanced ChemTech. Bei dem letzteren Gerät können in einem Teflon-Block bis zu 96 Parallel-Synthesen durchgeführt werden, wobei sehr geringe Volumina genau pipettiert werden können und das Totvolumen klein ist. Dieses System bietet sich also für die Parallelsynthese mehrerer Peptide unter Verwendung teurer Aminosäurebausteine an.

Als Festphase diente ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz (Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz). Dieses Harz trägt einen (5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valeriansäure)-Linker (PAL), der an der Aminofunktion Fmoc-geschützt ist. Bei den eingesetzten Aminosäuren handelte es sich um seitenkettengeschützte Fmoc-Aminosäuren. In Peptid **A1** wurde das im N-Terminus natürlich vorkommende Cys-20 durch Alanin ersetzt, in allen anderen Peptiden wurde Cys-20 durch Serin ersetzt, um bei der Synthese und Aufarbeitung unerwünschte Nebenreaktionen hinsichtlich des Cysteins auszuschließen.

Bei allen Kupplungsschritten wurde eine Dreifachkupplung (30, 60, 90 min) bei einem vierfachen Aminosäureüberschuss in Bezug auf die freien Aminofunktionen durchgeführt, um eine möglichst hohe Kupplungsausbeute zu erhalten. Als Aktivator wurde bei der Synthese TBTU verwendet, welches wie auch die Base DIPEA im fünffachen Überschuss zugesetzt wurde.

Nicht umgesetzte Aminogruppen nach einem Kupplungszyklus wurden mit einer 10 %igen Lösung von Acetanhydrid in DMF acetyliert.

Bei einigen Peptiden wurde die letzte Fmoc-Schutzgruppe nicht automatisch sondern manuell abgespalten. Das bei der Abspaltung entstehende Methylenfluoren wurde photometrisch vermessen, um eine vorläufige Aussage über die Ausbeute zu erhalten. Die freie terminale Aminogruppe wurde anschließend nur bei Peptid **A1** mit Essigsäureanhydrid in DMF acetyliert.

Die Abspaltung der am Harz synthetisierten Peptide erfolgte durch Schütteln des Harzes in einem Gemisch bestehend aus TFA/TIPS/H₂O (90:5:5). Es wurden ausschließlich solche Aminosäurederivate eingesetzt, deren Seitenkettenschutzgruppen eine vollständige Abspaltung auch ohne weitere *scavenger* zulassen.

Vor der Aufreinigung des abgespaltenen Rohproduktgemisches per RP-HPLC fand eine Vorreinigung statt. Dazu wurde das bis zur Trockne eingedampfte Rohproduktgemisch mit eiskaltem Diethylether versetzt, im Ultraschallbad homogenisiert, zentrifugiert und abdekantiert. Der Rückstand wurde in Wasser lyophilisiert und zeigte bei den nachfolgenden Probenvorbereitungen für RP-HPLC verbesserte Löslichkeitseigenschaften im jeweiligen Laufmittelsystem.

4.2. *Synthese des Peptids A1s*

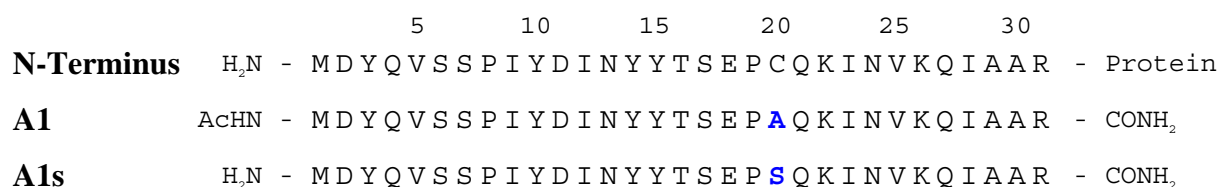


Abbildung 19: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5, des Peptids A1 und des Peptids A1s. In blau hervorgehobene Aminosäuren kennzeichnen Substitutionen in Bezug auf den N-Terminus des CCR5.

In meiner Diplomarbeit wurde das Peptid **A1** mit der Sequenz des 31 Aminosäuren langen N-Terminus synthetisiert, wobei das Cys-20 durch ein Alanin substituiert wurde. Der N-Terminus des Peptids lag acetyliert und der C-Terminus als Amid vor. SPR-Studien zeigten, dass das Peptid **A1** an GP120 bindet. Da dieses Peptid aber schwerlöslich in dem verwendeten Puffersystem war, musste DMSO zugesetzt werden, um eine ausreichende Löslichkeit für die SPR-Messungen zu erreichen.¹⁶³

Um weitergehende Untersuchungen auch ohne Zugabe von DMSO durchführen zu können, sollte die Löslichkeit des Peptids erhöht werden. Daher wurde in einer ersten Synthese das Peptid **A1s** dargestellt, bei dem das Cys-20 nicht durch ein Alanin sondern durch ein hydrophileres Serin substituiert wurde. Um die Löslichkeit des Peptids noch weiter zu steigern, wurde der N-Terminus nicht acetyliert und lag als freies Amin vor.

Durch die Substitutionen des Cys-20 geht man unter Umständen das Risiko ein, das Bindungsepitop zum GP120 zu zerstören, da im CCR5 eine Disulfidbrücke zur ECL-3 besteht. Es könnte sich um ein diskontinuierliches Epitop handeln, welches sowohl Teile des

N-Terminus als auch der ECL-3 beinhaltet. Auf jeden Fall aber wird die strukturinduzierende Funktion der Disulfidbrücke fehlen, die wahrscheinlich zu einer Verringerung der Bindungsaffinität von diesen Peptiden zu GP120 führen wird.

Das 31er Peptid **A1s** wurde komplett in einer vollautomatischen Synthese mit Dreifachkupplungen am Peptidsynthesizer in einem 50 μmol Ansatz hergestellt. Da in vorhergehenden Synthesen bei Peptid **A1** die Analyse des automatischen Fmoc-Monitoring zeigte, dass die Kupplung des Arginins-31 an das Harz nur mit schlechten Ausbeuten durchführbar war, wurde die erste Kupplung mit dreimal 120 min durchgeführt. Dabei war im Vergleich zu der Synthese von Peptid **A1** eine deutlich bessere Ausbeute des Kupplungsschrittes zu erkennen. Nach Aufreinigung mittels HPLC ergab sich eine Ausbeute von 5.5 %. Das entspricht nur einer Durchschnittsausbeute von 91 % pro Aminosäureposition. Es ist daher zu vermuten, dass es noch weitere Synthesepositionen im Peptid mit unbefriedigenden Kupplungsausbeuten gibt. Es ist bekannt, dass sich bei der Festphasen-Peptidsynthese insbesondere bei Sequenzen mit mehr als sechs Aminosäuren Sekundärstrukturen ausbilden können. Diese Sekundärstrukturen können die Kupplung der nächsten Aminosäure sterisch hindern, so dass es an dieser Position zu Ausbeuteverlusten kommt. Darüber hinaus entstehen bei der Aufreinigung durch HPLC zusätzliche Ausbeuteverluste, die ebenfalls für eine geringe Ausbeute verantwortlich sind. Da aber genügend Substanz erhalten wurde, brauchte keine erneute Synthese unter optimierten Bedingungen durchgeführt zu werden. Nach Aufreinigung über RP-HPLC konnte das Produkt (MW = 3619.78 g/mol) im MALDI-TOF-Spektrum durch sein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal bei $m/z = 3622.04$ identifiziert werden.

Das Peptid **A1s** zeigte schon bei der Aufarbeitung per HPLC bessere Löslichkeitseigenschaften in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ (95:5:0.1) als das Peptid **A1**. So war eine Aufreinigung über HPLC problemlos möglich. Anschließend sollte das Peptid **A1s** NMR-spektroskopisch vermessen werden. Bei der Probenpräparation kam es allerdings zu Schwierigkeiten, da das Peptid gelöst in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, pH 4.0) mit einer Konzentration von 4 mM den Spin-X Zentrifugenfilter (0.2 μm , Celluloseacetat) stark zugesetzt hat. Das anschließend aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum zeigte keine Signale. Die gesamte Substanz ist demnach beim Filtrieren an der Filter-Membran haften geblieben, oder es haben sich Aggregate gebildet, die nicht durch den Filter gepasst haben. Ein anschließend aufgenommenes ^1H -NMR-Spektrum, bei dem die Probe nicht filtriert wurde, zeigte, dass es sich um Aggregate handeln muss, da eine starke Linienverbreiterung zu erkennen war. Auch eine Zugabe von 20 % deuteriertem TFE brachte keine Verbesserung.

Die Löslichkeit des Peptids **A1** ist also durch die Substitution und den freien N-Terminus im Peptid **A1s** verbessert worden, allerdings lag eine Aggregatbildung vor. Es mussten demnach noch weitere Peptide in einer Parallelsynthese dargestellt und auf ihre Löslichkeit hin untersucht werden (Kapitel 4.4).

4.3. Optimierung der Festphasen-Peptidsynthese für das Peptid **A1**

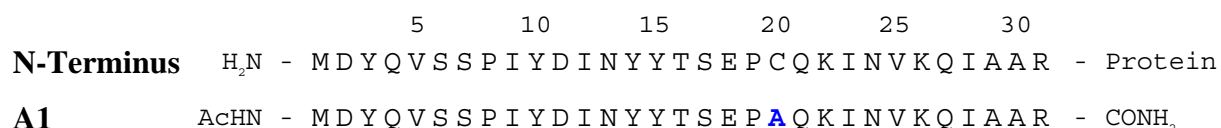


Abbildung 20: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5 und des Peptids A1. In blau hervorgehobene Aminosäuren kennzeichnen Substitutionen in Bezug auf den N-Terminus des CCR5.

Für die Optimierung der Festphasenpeptidsynthese wurde das Peptid **A1** synthetisiert, welches im Vergleich zu dem CCR5 N-Terminus eine Substitution von Cys-20 durch Alanin und einen acetylierten N-Terminus sowie eine Amidgruppe am C-Terminus besitzt.

Die Optimierung sollte Aufschluss darüber geben, mit welcher Belegung des Harzes, mit welchen Lösungsmittelmengen und mit welcher Abspaltmethode (automatisiert bzw. manuell) eine höhere Ausbeute erlangt werden kann. Wichtig waren diese Ergebnisse für die nachfolgende Parallelsynthese von 16 Peptiden mit jeweils einer Länge von 31 Aminosäuren (Kapitel 4.4), bei denen eine große Menge an Reagenzien eingesetzt werden musste. Eine Verbesserung der Ausbeute bedeutet bei solch großen Synthesen eine erhebliche Einsparung von Reagenzien und damit auch von Kosten.

Es wurden zwei unterschiedliche Harze mit einer Belegung von jeweils 0.19 und 0.7 mmol/g für eine Ansatzgröße von 20 µmol für einen Parallelsyntheseansatz verwendet. Ob es bei höher belegten Harzen und größeren Peptiden aber zu einer Behinderung beim Kettenwachstum während der Synthese kommen kann, sollte durch die nachfolgende Synthese geklärt werden. Außerdem wurden mit jeder Harzbelegung jeweils zwei Ansätze gefahren, um festzustellen, ob das Abspalten des Peptids vom Harz besser manuell oder automatisch geschehen sollte. Es ergaben sich daraus die in Tabelle 1 aufgeführten vier Methoden a-d. Es wurde ermittelt, welche Mengen an Reaktionslösung nötig sind, um eine ausreichende Bedeckung des Harzes und damit eine gute Durchmischung bei der Synthese zu gewährleisten. Es zeigte sich, dass für das höher belegte Harz nur 510 µL und für das niedriger belegte Harz 710 µL benötigt wurden. Der Unterschied von 40 %, der aufgrund des

kleineren Volumens des höher belegten Harzes zwischen diesen beiden Volumina liegt, macht deutlich, welchen Einfluss die Wahl der Belegung des Harzes auf die benötigten Reaktionslösungen haben kann.

Tabelle 1: Synthesebedingungen und Ausbeuten bei der Optimierung.

	Methode a	Methode b	Methode c	Methode d
Belegung des Harzes [mmol/g]	0.19	0.19	0.7	0.7
Volumen beim Kupplungsschritt [µL]	710	710	510	510
Bestimmung des Fmoc-Wertes	nein	ja	nein	ja
Acetylierung und Abspaltung vom Harz	automatisch	manuell	automatisch	manuell
Ausbeute nach Fmoc-Wert	-	8.9 µmol, 44.7 %	-	12.0 µmol, 59.8 %
Ausbeute nach HPLC	2.3 mg, 3.2 %	2.2 mg, 3.0 %	2.6 mg, 3.5 %	2.7 mg, 3.7 %

Als Kupplungsbedingungen für alle Synthesen wurden Dreifachkupplungen gewählt, wobei die erste Kupplung des Arginins mit dreimal 120 min durchgeführt wurde. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC ergaben sich Ausbeuten von 3.0 bis 3.7 %. Das Produkt (MW = 3645.82 g/mol) konnte im MALDI-TOF-Spektrum durch ein $[M+H]^+$ -Signal bei $m/z = 3648.92$ identifiziert werden. Allgemein kann man erkennen, dass die vorläufigen Ausbeuten nach Fmoc-Wert bei dem höher belegten Harz um ca. 15 % besser waren. Dies scheint sich auch bei den Ausbeuten nach der RP-HPLC widerzuspiegeln. Die geringere Ausbeute beim niedriger belegten Harz ist auf die weniger konzentrierten Reaktionslösungen bei der Kupplung zurückzuführen, da diese für eine optimale Bedeckung des Harzes zusätzlich mit 200 µL DMF versetzt werden mussten. Da eine hohe Belegung kein störender Faktor beim Kettenwachstum war, sollte die Synthese der 16 31er Peptide folglich mit dem höher belegten Harz durchgeführt werden. Es können so bei geringerem DMF-Verbrauch höhere Ausbeuten erwartet werden.

Ob die Acetylierung und Abspaltung vom Harz automatisch oder manuell erfolgt, scheint keinen Einfluss auf die Ausbeute zu haben. Allerdings kann bei manueller Abspaltung noch ein Fmoc-Wert bestimmt werden, der eine vorläufige Ausbeutebestimmung zulässt. Dies ist

bei einer Parallelsynthese von vielen Peptiden allerdings unhandlich, so dass in der folgenden Synthese die Abspaltung automatisiert durchgeführt werden sollte.

4.4. *Synthese und Bindungsstudien der Peptide A1-A16*

		5	10	15	20	25	30	
N-Terminus	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	YYTSEP	PCQKIN	VKQIAAR		- Protein
A1	AcHN -	MDYQVSSPI	YDIN	YYTSEP	A QKIN	VKQIAAR		- CONH ₂
A2	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	YYTSEP	S QK S N S KQ S AAR			- CONH ₂
A3	H ₂ N -	MDYQVSSPI	F DIN F F	TSEP	S QK S N S KQ S AAR			- CONH ₂
A4	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	YYTSEP	S QK D N D KQ D AAR			- CONH ₂
A5	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	YYTSEP	S QK F N F KQ F AAR			- CONH ₂
A6	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	F YTSEP	S QKIN	VKQIAAR		- CONH ₂
A7	H ₂ N -	MDYQVSSPI	F DIN	YYTSEP	S QKIN	VKQIAAR		- CONH ₂
A8	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	F TSEP	S QKIN	VKQIAAR		- CONH ₂
A9	H ₂ N -	MDYQVSSPI	YDIN	YYTSEP	S E KIN	VK E IAAR		- CONH ₂
A10	H ₂ N -	MDYQ S SSPI	YDIN	YYTSEP	S QKIN	S KQ S AAR		- CONH ₂
A11	H ₂ N -	MDYQ D SSPI	YDIN	YYTSEP	S QK S N S KQ S AAR			- CONH ₂
A12	H ₂ N -	MD F Q S SSPI	YDIN	YYTSEP	S QKIN	VKQIAAR		- CONH ₂
A13	H ₂ N -	MD F Q S SSPI	YDIN	YYTSEP	S E K S N S K E S AAR			- CONH ₂
A14	H ₂ N -	MD F Q S SSPI	F DIN	YYTSEP	S QK S N S KQ S AAR			- CONH ₂
A15	H ₂ N -	MD F Q S SSPI	F DIN	F F	TSEP	S QKIN	VKQIAAR	- CONH ₂
A16	H ₂ N -	MD F Q S SSPI	YDIN	YYTSEP	S QKIN	S KQ S AAR		- CONH ₂

Abbildung 21: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5 und der Peptide A1-A16. In blau hervorgehobene Aminosäuren kennzeichnen Substitutionen in Bezug auf den N-Terminus des CCR5.

Es wurden 16 Peptide ausgehend von der Sequenz des N-Terminus dargestellt, die an unterschiedlichen Positionen substituiert wurden (Abbildung 21). Ziel war es, die Löslichkeit zu erhöhen und so zu ermitteln, welche Aminosäuren oder Bereiche im Peptid **A1** für die schlechte Löslichkeit verantwortlich sind. Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, welche Tyrosine für die Bindung an das GP120 wichtig sind. Substitutionen wurden vorgenommen an Tyr-3, Val-5, Tyr-10, Tyr-14, Tyr-15, Cys-20, Gln-21, Ile-23, Val-25, Gln-27, und Ile-28. Diese überwiegend unpolaren Aminosäuren wurden durch Ser, Asp, Glu oder Phe substituiert. Tyrosine wurden ausschließlich durch Phe ersetzt, um herauszufinden, inwieweit die OH-Gruppe auch an der Bindung beteiligt ist, da in diesem Bereich das Bindungsepitop vermutet wurde. Durch diese Substitution lässt sich eventuell mit Hilfe von SPR-Experimenten erkennen, ob und welche Tyrosine vorhanden sein müssen, d.h. welche Hydroxylgruppe von welchem Tyrosin zur Bindungsaffinität beiträgt.

Alle 16 Peptide wurden parallel in einer vollautomatischen Synthese mit Dreifachkupplungen an einem Peptidsynthesizer in 20 µmol Ansätzen hergestellt. Dabei wurde unter optimierten

Bedingungen mit der Methode c aus dem vorherigen Kapitel gearbeitet. Die erste Kupplung des Arginins-31 an das Harz wurde wieder aufgrund der schlechten Kupplungsausbeuten in vorherigen Experimenten mit dreimal 120 min durchgeführt. Das Peptid **A1** wurde als einziges am N-Terminus acetyliert. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC ergab sich eine Ausbeute von 2.9 bis 8.0 %. Auch hier ist daher zu vermuten, dass es noch weitere Synthesepositionen in den Peptiden mit unbefriedigenden Kupplungsausbeuten gibt. Die Peptide konnten alle in MALDI-TOF-Spektren durch ihre spezifischen $[M+H]^+$ -Signale identifiziert werden.

4.4.1. CD-Messungen

Die CD-Messung wurde mit einer Peptidkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ M in Wasser mit drei Scans über einen Wellenlängenbereich von 180 nm bis 260 nm durchgeführt. In Abbildung 22 ist das CD-Spektrum des Peptids **A1** und die Auswertung durch das Programm CDPro abgebildet.

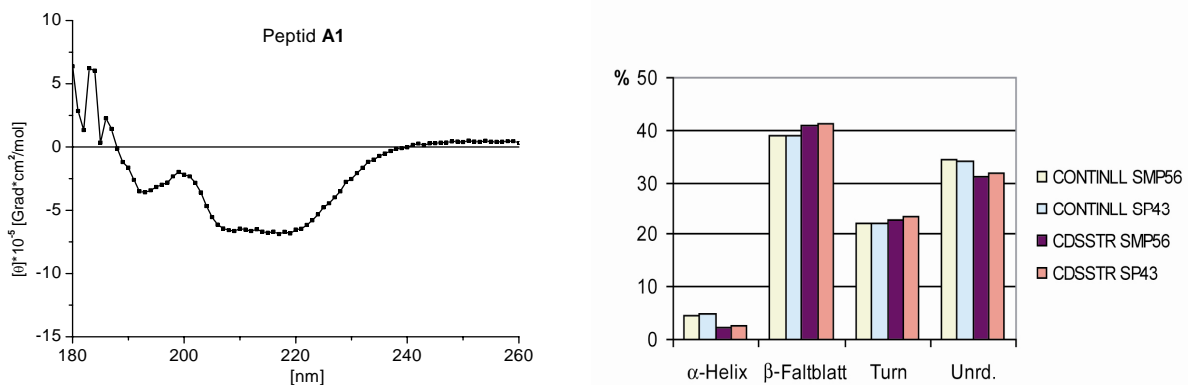


Abbildung 22: CD-Spektrum und Bestimmung der Sekundärstrukturanteile des Peptids A1 durch verschiedene Auswertungsmodule des Programms CDPro.

Die unterschiedlichen Programme mit den verwendeten Datensätzen SP43 und SMP56 zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile zeigen alle vergleichbare Resultate. Mit dem Programm SELCON3 konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Die Auswertung des CD-Spektrums zeigt, dass das Peptid **A1** zu ca. 40 % aus β -Faltblatt und zu ca. 30 % aus Zufallsknäuel besteht. Einen großen Anteil macht auch noch der β -turn aus, wohingegen auf die α -Helix kaum prozentuale Anteile entfallen. Das Peptid **A1** scheint demnach einen hohen

Anteil an geordneter Struktur aufzuweisen. Die Unregelmäßigkeiten in den Messkurven im Bereich zwischen 180 nm und 190 nm sind auf die geringere Lampenleistung bei kleineren Wellenlängen und die Absorption durch Sauerstoff zurückzuführen.

4.4.2. SPR-Bindungsstudien

Grundsätzlich müssen Bindungsstudien von Peptiden an GP120 vor dem Hintergrund gesehen werden, dass beim HIV-Entry vermutlich ein trimolekularer Komplex aus CD4, GP120 und dem Chemokinrezeptor vorliegt. Dabei wird diskutiert, dass die Bindung des CD4 die Bindungsstelle am GP120 für den Chemokinrezeptor erst freilegt.^{37;44-46} Da bei diesen SPR-Bindungsstudien kein CD4 verwendet wurde, war die Bildung des trimolekularen Komplexes nicht möglich. Wie sich aber aus vorherigen Untersuchungen am Peptid **A1** zeigte, kann eine Bindung an das monomere GP120 aber auch ohne vorherige Aktivierung durch CD4 stattfinden. Es ist dabei aber zu vermuten, dass die Bindung bedeutend schwächer sein wird.¹⁶³

Die Peptide **A2** bis **A16** wurden mittels SPR an einem Biacore J in einem HBS-EP-Puffer auf ihre Bindung zum auf dem Sensorchip immobilisierten GP120 hin untersucht. Das Peptid **A1** wurde schon in vorherigen Untersuchungen vermessen.¹⁶³ Hierbei hatten sich Löslichkeitsprobleme ergeben, so dass nur durch Zusatz von DMSO SPR-Messungen durchgeführt werden konnten. Um im Rahmen dieser SPR-Messungen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde auf die Zugabe von DMSO und somit auf die Messung des Peptids **A1** verzichtet. Es wurde ein CM5-Sensorchip verwendet, der mit 2989 RU (24.9 fmol) GP120 (Bal) belegt wurde. Zur Kontrolle der Aktivität des GP120 wurde ein lösliches, in CHO-Zellen exprimiertes CD4-Konstrukt verwendet. Dieses wurde in einer Konzentration von 1 μ M über den Chip geleitet (*low flow*, Kontaktzeit 240 s) und die Kurve extrapoliert. Daraus ergab sich eine Aktivität von 27 % des immobilisierten GP120 (6.7 fmol aktives GP120). Diese Aktivität ist nur ein Anhaltspunkt, da die Bindung des CD4 nicht in der gleichen Region wie die vom CCR5 stattfindet. Aufgrund der ermittelten Aktivität des GP120 ließ sich für die vermessenen Peptide eine maximale RU-Antwort von ca. 24 RU erwarten. Da die höchsten gemessenen RU-Antworten für die Peptide bei etwa 45 RU lagen, ist davon auszugehen, dass die CD4-Bindungsregion der Chipoberfläche zugewandt vorlag und die Aktivitätsbestimmung mit dem CD4 daher eine zu geringe Aktivität hervorgebracht hat.

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der Peptide vermessen (500, 250, 125, 62.5 μM). Die Assoziationszeit betrug 180 s. Die Dissoziationsphase wird in den folgenden Kurven nicht abgebildet, da diese unter den gerätebedingten *Spikes* beim Umschalten von Probenlösung auf Laufpuffer nicht zu erkennen ist. Sofern es nötig war, wurde die Regeneration des Sensorchips mit einer 0.025 %igen SDS-Puffer-Lösung durchgeführt.

Nachdem von allen Peptiden eine Konzentration von 500 μM vermessen wurde, musste der Puffer erneuert werden. Hierbei scheint es Unterschiede in der Pufferqualität gegeben zu haben, da die nachfolgenden Messungen nicht mehr mit den vorherigen korreliert werden konnten. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde daher die Messwerte für die Konzentration von 500 μM vernachlässigt. Einige Kurven konnten weiterhin nicht zur Auswertung herangezogen werden, da bei diesen Injektionen Luft in das Flusssystem gekommen war. Eine zweite Messung unter gleichen Bedingungen war aufgrund der teilweise geringen vorhandenen Peptidmengen nicht immer möglich.

Alle vermessenen Peptide zeigten Bindung an das GP120. Dabei war der Verlauf der Bindungskurven aller Peptide vergleichbar. Daher sind in Abbildung 23 exemplarisch die SPR-Bindungskurven der Verdünnungsreihe des Peptids **A15** abgebildet. Der leicht sigmoidale Kurvenverlauf zu Beginn einer jeden Messung ist auf die Subtraktion der reinen Pufferkurve von der Peptidkurve zurückzuführen. Diese Subtraktion wurde durchgeführt, um den Fehler in der RU-Antwort zu minimieren, da eine reine Pufferinjektion bereits ein Signal von bis zu fünf RU ergab. Bei der Bindungskurve für die Konzentration von 250 μM erkennt man nach 20 s einen *spike*, der auf Luft bei der Injektion zurückzuführen ist aber für die Auswertung nicht weiter berücksichtigt werden muss.

Das Peptid **A15** erzielte beim *fit* in einem *one-site binding* Modell (Abbildung 24) von allen vermessenen Peptiden mit vier auswertbaren Datenpunkten den niedrigsten K_D -Wert von 116 μM und zeigt damit die größte Bindungsaffinität zum GP120. Das ist in sofern erstaunlich, da dieses das einzige Peptid war, in dem alle vier Tyrosine durch Phenylalanine ersetzt wurden. Da angenommen wird, dass ein großer Beitrag zur Bindungsaffinität durch Sulfatgruppen an diesen Tyrosinen (wahrscheinlich Tyr-3, Tyr-10 und Tyr-14) geleistet wird,⁹⁸ kann nur spekuliert werden, ob das Peptid **A15** durch die zusätzlichen Substitutionen von Val-5 durch Ser und Cys-20 durch Ser einen anderen Bindungsmodus aufweist, oder ob die Aromaten eine zusätzliche allgemeine hydrophobe Wechselwirkung eingehen.

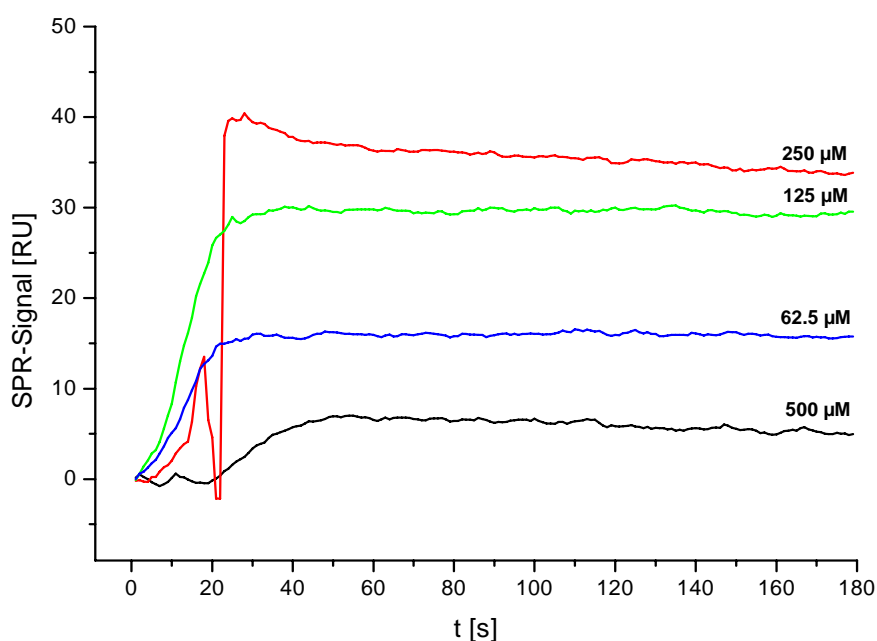


Abbildung 23: SPR-Verdünnungsreihen des Peptids A15. Das zu geringe RU-Signal für die Konzentration von 500 µM wurden mit einer anderen Puffercharge erhalten und daher vernachlässigt.

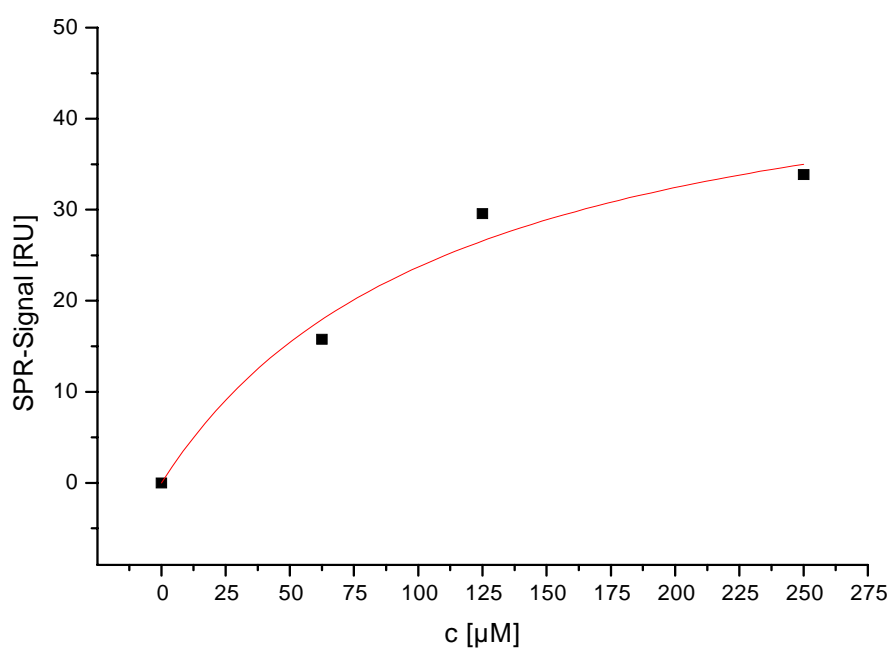


Abbildung 24: Ermittlung des K_D -Wertes von Peptid A15 über das *one-site binding* Modell. Aufgetragen ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Peptid-Konzentration.

In Tabelle 2 sind alle Peptide mit zugehörigen K_D -Werten, die aus diesen SPR-Messungen hervorgingen, aufgeführt. Die K_D -Werte bewegen sich dabei im Bereich zwischen 3 und

2500 μM . Der niedrigste K_D -Wert wurde dabei von Peptid **A4** ermittelt. Hier ist allerdings zu beachten, dass nur drei Datenpunkte in die Berechnung mit einbezogen wurden, wovon der erste der theoretisch begründete Nullpunkt ist. Der K_D -Wert von Peptid **A13** liegt bei 2500 μM und ist auf unspezifische Bindung zurückzuführen, da die SPR-Bindungskurven einen linearen Anstieg zeigten und nach der Injektion keine Dissoziation zu beobachten war. Die Fehler, mit denen diese Messergebnisse belastet sind, wurden anhand der Chi^2 -Werte abgeschätzt. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, liegen die meisten Chi^2 -Werte unter zehn, so dass die Fehler als klein angenommen werden können.¹⁶⁴

Tabelle 2: Ergebnisse der SPR-Studien an den Peptiden A2 bis A16.

	K_D [μM]	Chi^2	Datenpunkte
A2	280	11.5	4
A3	Keine Auswertung möglich		
A4	3	0.0	3
A5	119	5.9	4
A6	145	0.0	3
A7	288	5.7	4
A8	314	2.7	4
A9	423	3.4	4
A10	550	0.0	3
A11	292	14.1	4
A12	729	1.0	4
A13	2500	18.1	4
A14	Keine Auswertung möglich		
A15	116	7.5	4
A16	296	0.0	3

Bei Peptid **A3** konnten keine typischen Bindungskurven gemessen werden. Aufgrund von sehr starker unspezifischer Bindung, die wahrscheinlich auf Aggregate zurückzuführen ist, war hier keine Auswertung möglich. Bei Peptid **A14** konnte auch kein K_D -Wert ermittelt werden, da nur zwei Datenpunkte aufgrund von Luft im System bei einigen Injektionen zur Auswertung vorlagen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Peptide **A4**, **A5**, **A6** und **A15** die besten Bindungseigenschaften zeigten. Allerdings ist zu beachten, dass bei Peptid **A4** und **A6** nur drei Datenpunkte in die Auswertung mit eingegangen sind. Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften können einerseits aufgrund von einzelnen Substitutionen von direkt an der Bindung beteiligten Aminosäuren hervorgerufen worden sein. Andererseits kann eine

Substitution auch eine Änderung der dreidimensionalen Struktur bewirken und damit das Bindungsepitop verändern, obwohl die Aminosäure selbst nicht direkt an der Bindung beteiligt ist.

Welche Hydroxylgruppen der Tyrosine für die Bindung wichtig sind, konnte nicht ermittelt werden. Der Vergleich der Dissoziationskonstanten von **A7** (Y10F) und **A8** (Y15F) zeigt, dass kein Unterschied zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu zeigt **A6** (Y14F) eine um Faktor zwei kleinere Dissoziationskonstante, es konnten hier allerdings nur drei Datenpunkte in die Berechnung der Dissoziationskonstante einfließen, was einen Vergleich schwierig macht. Die Tyrosine an Position 3, 10 und 14 liegen wahrscheinlich sulfatiert vor. Findet die Bindung zum GP120 über die Sulfatgruppen statt, sind daher durch die gemachten Substitutionen des Tyrosins durch Phenylalanin nicht unbedingt Änderungen der Dissoziationskonstanten zu erwarten.

4.4.3. Löslichkeitsversuche

Beim Ansetzen der Stammlösungen für die SPR-Messungen konnten die Löslichkeitseigenschaften der Peptide im Puffersystem relativ zueinander abgeschätzt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die Peptide **A2**, **A3**, **A4**, **A11**, **A13** und **A14** eine deutlich höhere Löslichkeit zeigten, als die anderen Peptide. Betrachtet man die Substitutionen, die an diesen Peptiden gemacht wurden, so erkennt man, dass die unpolaren Aminosäuren Ile-23, Val-25 und Ile-28 durch die polaren Aminosäuren Ser oder Asp substituiert wurden. Besonders das Ile-23 scheint ausschlaggebend für eine schlechte Löslichkeit zu sein, da alle Peptide, bei denen diese Aminosäure durch Ser oder Asp substituiert wurde, gut löslich sind. Substitutionen in diesem Bereich durch Phe wie in **A5** brachten dagegen eine Verschlechterung der Löslichkeit. Es ist daher davon auszugehen, dass für die schlechte Löslichkeit aller Peptide, die dem N-Terminus des CCR5 nachempfunden sind, der Bereich ab Ile-23 mitverantwortlich ist.

Um zu überprüfen, ob die Löslichkeit für eine NMR-Auswertung ausreichen würde, wurden die Löslichkeiten der Peptide, die die besten SPR-Ergebnisse zeigten (**A1**, **A4**, **A5**, **A6**, **A15**), in H₂O/D₂O (9:1, pH = 4) anhand von NMR-Experimenten mit internem Standard bestimmt. Als Standard diente DSS in einer Konzentration von 610 µM. Durch Vergleich der Integrale eindeutiger Protonensignale eines Peptids mit den Signalen des DSS konnten folgende maximale Löslichkeiten ermittelt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Maximale Löslichkeiten der Peptide A1, A4, A5, A6 und A15 in H₂O/D₂O (9:1, pH = 4).

	A1	A4	A5	A6	A15
c [mM]	0.98	12.20	0.45	1.14	1.33

Erstaunlich ist die hohe Löslichkeit des Peptids **A1**, welche in vorherigen Untersuchungen auf 10 μ M bestimmt wurde.¹⁶³ Dieses kann auf den pH-Wert zurückgeführt werden, da das Peptid durch Protonierung in eine leichter lösliche Form überführt werden könnte.

Das Peptid **A4** zeigte sogar eine um Faktor 10 höhere Löslichkeit als die anderen Peptide. Peptid **A5** zeigte dagegen eine um Faktor 2 geringere Löslichkeit, was sich in den Probenpräparationen für die SPR-Messungen auch schon angedeutet hatte. Die für die Peptide bestimmten Konzentrationen wären ausreichend, um damit NMR-Studien durchführen zu können.

Vor der Durchführung von NMR-Studien sollten aber noch weitere Modifikationen an den Peptiden vorgenommen werden, wie die Verkürzungen der Peptidsequenz (Peptide **C1-C6**) und der Einbau von Sulfotyrosinen (Peptide **E**, **D1**, **D2**, **F1-F5**). Da diese beiden Modifikationen zusammen schon eine ausreichende Löslichkeit dieser Peptide brachten (Kapitel 4.9), wurde das Konzept der Substitution einzelner hydrophober Aminosäuren der Peptide **A1-A16** nicht weiter verfolgt.

4.5. *Synthese der Peptide C1-C6*

N-Terminus	H ₂ N -	5	10	15	20	25	30	- Protein
C1	H ₂ N -		S S P I Y D I N Y Y T S E P	S				- CONH ₂
C2	H ₂ N -	M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E						- CONH ₂
C3	H ₂ N -	D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P	S					- CONH ₂
C4	H ₂ N -	M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P	S					- CONH ₂
C5	H ₂ N -	M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P	S Q K					- CONH ₂
C6	H ₂ N -	M D Y Q V S S P I Y D I N Y Y T S E P	S Q K I N V K					- CONH ₂

Abbildung 25: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5 und der Peptide C1-C6. In blau hervorgehobene Aminosäuren kennzeichnen Substitutionen in Bezug auf den N-Terminus des CCR5.

Es wurden 6 Peptide ausgehend von der Sequenz des N-Terminus dargestellt, wobei nach Möglichkeit alle vier Tyrosine in der Sequenz erhalten blieben. Verkürzungen wurden sowohl N-terminal als auch C-terminal vorgenommen, um den Effekt auf die Löslichkeit des jeweiligen Peptids bestimmen zu können. C-terminal wurde ausgehend von den Ergebnissen

aus Kapitel 4.4.3 auf einen Großteil der Sequenz verzichtet, da hier wahrscheinlich der Grund für die Unlöslichkeit der bisher untersuchten Peptide lag und das Bindungsepitop in diesem Bereich nicht vermutet wird (Kapitel 1.2.3.2). Das Cys-20 wurde wie zuvor durch Ser-20 substituiert, um Nebenreaktionen bei der Aufreinigung zu vermeiden. Es ist zu vermuten, dass man durch die Verkürzungen der Sequenz besser lösliche Peptide mit ähnlichen Bindungseigenschaften an das GP120 erhält. Diese ermöglichen weitergehende Untersuchungen hinsichtlich Sulfatierungen an den Tyrosinen.

Alle sechs Peptide wurde parallel in einer vollautomatischen Synthese mit Dreifachkupplungen am Peptidsynthesizer in einem 20 μmol Ansatz hergestellt. Dabei wurde unter optimierten Bedingungen mit der Methode c aus dem Kapitel 4.3 gearbeitet. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC ergaben sich Ausbeuten von 2.9 bis 9.9 %, die wieder auf Kupplungsschritte mit schlechten Ausbeuten schließen lassen. Das Peptid **C2** war schon in den HPLC-Laufmitteln so schlecht löslich, dass auf eine Aufreinigung verzichtet wurde. Die Peptide konnten mittels MALDI-TOF-MS durch ihre spezifischen $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signale identifiziert werden.

Die Peptide **C3**, **C4** und **C6** zeigten im ^1H -NMR-Spektrum in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, $\text{pH} = 4$) nur eine geringe Löslichkeit, so dass auf eine NMR-Charakterisierung verzichtet werden musste. Das Peptid **C5** zeigte eine gute Löslichkeit, es traten allerdings Linienverbreiterungen im ^1H -NMR-Spektrum auf, die durch Aggregatbildung hervorgerufen sein könnten. Eine Zugabe von 30 % TFE als Lösungsvermittler konnte die Aggregation vermindern, so dass im Spektrum dispergierte Signale erschienen, die aber für eine Auswertung eine zu geringe Intensität hatten. Auf eine NMR-Charakterisierung wurde daher auch hier verzichtet. Das Peptid **C1** zeigte die beste Löslichkeit. Zur genauen Charakterisierung wurden 2D-NMR-Experimente aufgenommen. Im TOCSY-Spektrum des Peptids **C1** konnten die Spinsysteme aller Aminosäuren identifiziert werden. Durch Auswertung der NH-Region konnten 13 NH-Spuren, im Bereich von 7.846 bis 8.653 ppm, den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Die zwei Prolinspuren konnten anhand ihrer $\text{CH}_{\beta,\beta'}$ -Spuren zugeordnet werden. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der Nachbarschafts-NOE's in einem NOESY-Spektrum. Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 18 angegeben. Vergleicht man die Peptide und deren Löslichkeiten untereinander, so lässt sich feststellen, dass Peptid **C1** besser löslich ist als Peptid **C4**, also eine Verkürzung auf der N-terminalen Seite zur Steigerung der Löslichkeit beiträgt. Auf der C-terminalen Seite zeigt der Vergleich von Peptid **C2** mit Peptid **C4**, dass Pro-19 und Ser-20 stark zur Löslichkeit beitragen. Eine Verlängerung der Sequenz um weitere zwei Aminosäuren wie bei Peptid **C5** führt zwar zu

einer weiteren Löslichkeitssteigerung allerdings unter Bildung von Aggregaten. Die Verlängerung der Sequenz an dieser Stelle um noch weitere vier Aminosäuren führt dann schließlich zu einer Verschlechterung der Löslichkeit. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass der Sequenzabschnitt mit der besten Löslichkeit, der zudem noch alle vier Tyrosine beinhaltet, von Tyr-3 bis Ser-20 gehen müsste. Diese Sequenz wurde daher in späteren Synthesen für die Peptide **F1-F5** gewählt.

Weitergehende SPR-Bindungsstudien wurden mit diesen Peptiden nicht durchgeführt, da lediglich der Einfluss der Verkürzungen der Peptidsequenz auf die Löslichkeit untersucht werden sollte.

4.6. *Synthese des Sulfotyrosin-Bausteins S2*

Um Peptide darzustellen, die Sulfotyrosine in ihrer Sequenz enthalten, gibt es folgende Möglichkeiten: Zum einen können Enzyme verwendet werden, die nach der Peptidsynthese Tyrosine sulfatieren können. Zu diesen Enzymen gehören TPST-1 und -2. Das Sulfatierungsmuster ist vorher nicht abzusehen, so dass diese Methode für eine zielorientierte Synthese mit sulfatierten und nicht sulfatierten Tyrosinen an bestimmten Positionen im Peptid nicht angewendet werden kann.⁹⁹ Den hohen Kosten für die Enzyme stehen geringe Ausbeuten gegenüber. Bei den chemischen Methoden wird grundsätzlich zwischen Synthese mit orthogonaler Schutzgruppenstrategie und Bausteinsynthese unterschieden. Bei ersterer können die zu sulfatierenden Tyrosine mit orthogonaler Schutzgruppenstrategie in der Peptidsynthese eingesetzt werden, indem nach abgeschlossener Synthese und Abspaltung des Peptids vom Harz die Sulfatierung an den entschützten Tyrosinen durch Behandlung mit einem DMF•SO₃ oder Pyridin•SO₃ Addukt erfolgt.¹⁶⁵ Hier kann es allerdings aufgrund von sterischer Hinderung innerhalb des Peptids zu unvollständiger Sulfatierung kommen, die eine Aufreinigung erheblich erschwert. Bei der Bausteinsynthese wird das Natriumsalz des Sulfotyrosins als Baustein eingesetzt und während der Synthese direkt an spezifischen Positionen eingebaut.¹⁶⁶ Da es mit dieser Methode möglich ist, bestimmte Sulfatierungsmuster im Peptid in annehmbaren Ausbeuten zu verwirklichen, wurde in den folgenden Peptidsynthesen nach letzterer Methode vorgegangen. Für längere Peptide bietet sich auch die konvergente Bausteinsynthese an, die den Vorteil der leichteren Aufreinigung per HPLC mit sich bringt. Für die in dieser Arbeit dargestellten Peptide war diese Vorgehensweise allerdings nicht nötig.

Für die Synthese der Peptide **E**, **D1**, **D2** und **F1-F5** wurde als Baustein Tyrosin, dessen Phenylring an der OH-Gruppe sulfatiert wurde, benötigt. Daher musste vor Beginn der Synthese dieser Baustein synthetisiert werden. Aufgrund der Fmoc-Strategie in der Festphasenpeptidsynthese war es außerdem notwendig, die Aminofunktion mit der Fmoc-Schutzgruppe zu schützen. Der Syntheseweg ist in Abbildung 26 skizziert.

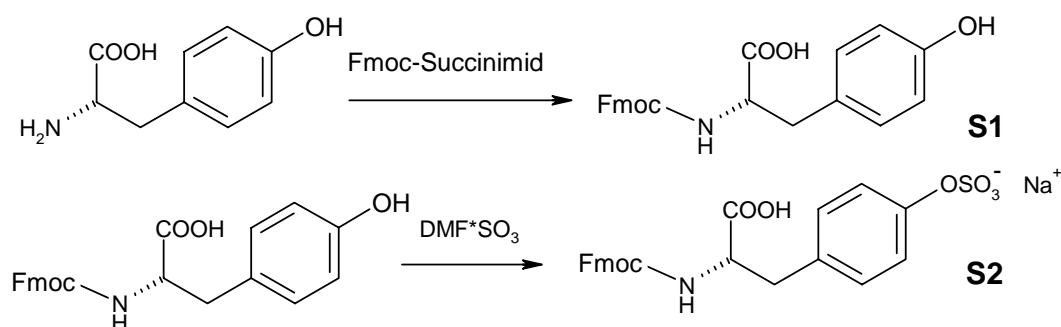


Abbildung 26: Syntheschema für die Synthese des Fmoc-geschützten Sulfotyrosin-Bausteins **S2**.

Die Synthese des Fmoc-geschützten Tyrosins **S1** erfolgte ausgehend vom Tyrosin mit Fmoc-Succinimid und ergab eine Ausbeute von 2.15 g, was einer Ausbeute von 38 % bezogen auf das eingesetzte Tyrosin entspricht. Die anschließende Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie zeigte, dass es sich bei der erhaltenen Substanz um das gewünschte Produkt handelte.

Im nächsten Schritt der Synthese sollte das Fmoc-geschützte Tyrosin **S1** an der phenolischen Hydroxylgruppe sulfatiert werden. Als Sulfatierungsmittel wurde ein $\text{SO}_3\cdot\text{DMF}$ -Addukt gewählt.¹⁶⁷ Zunächst wurde die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt und über DC verfolgt (Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ 3:2). Hierbei ergab sich eine Reaktionsdauer von 24 h bis das Edukt vollständig umgesetzt war. Um diese zu verkürzen, wurde die Reaktionstemperatur auf 40 °C erhöht. Die Reaktionszeit konnte so auf 5 h gesenkt werden. Die anschließende Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgte zunächst säulenchromatographisch. Das erhaltene Produkt konnte jedoch nicht zur Kristallisation gebracht werden. Daher wurde das Produkt zunächst wieder in Methanol aufgenommen und Fällungsversuche mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität durchgeführt. Eine quantitative Fällung konnte mit 1-Butanol erreicht werden. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 21 % erhalten. Bei der anschließenden NMR-spektroskopischen Charakterisierung konnte die eingeführte Sulfatgruppe indirekt über die Veränderungen der chemischen Verschiebung der ^1H als auch der ^{13}C -Signale nachgewiesen werden.

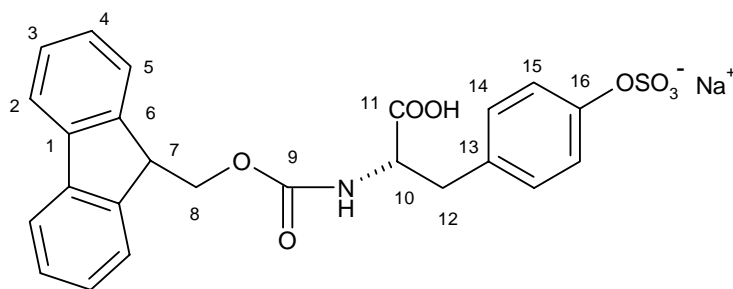


Abbildung 27: Strukturformel des Fmoc-geschützten Sulfotyrosin-Bausteins S2 mit Nummerierung der Atome.

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigt sich dies durch eine Verschiebung des Signals H-15 von 6.66 ppm beim Fmoc-geschützten Tyrosin nach 7.03 ppm beim Fmoc-geschützten Sulfotyrosin (Abbildung 28). Alle weiteren Protonen zeigten keine deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung ihrer Protonensignale. Im ^{13}C -Spektrum ist die Veränderung der chemischen Verschiebung noch deutlicher zu erkennen. Das Signal für Kohlenstoffatom C-16, welches die Hydroxylgruppe im Fmoc-geschützten Tyrosin trägt, ist durch die Bindung der Sulfatgruppe um 24 ppm tieffeldverschoben. Die beiden zur Sulfatgruppe *ortho*-ständigen Kohlenstoffatome (C-15) zeigen ebenfalls eine Veränderung. Die chemische Verschiebung ändert sich in diesem Fall um 5 ppm zu tieferem Feld. Bei den beiden zur Sulfatgruppe *meta*-ständigen Kohlenstoffatomen (C-14) ist schließlich kein deutlicher Effekt mehr zu erkennen.

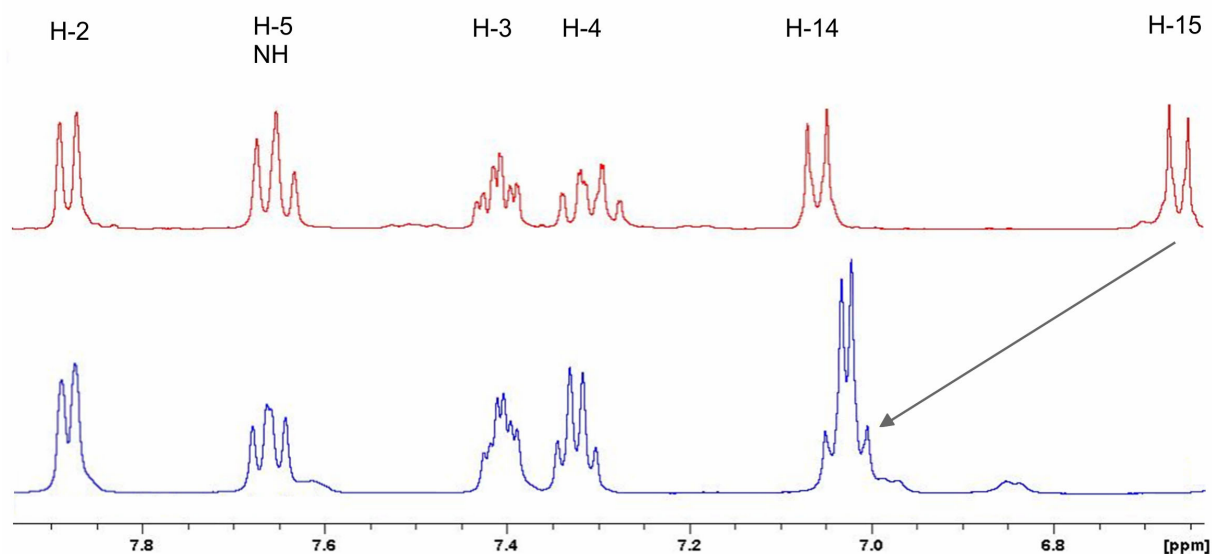


Abbildung 28: Ausschnitt aus den beiden NMR-Spektren des Fmoc-geschützten Tyrosins S1 (rot) und des Fmoc-geschützten Sulfotyrosin-Bausteins S2 (blau).

4.7. Festphasenpeptidsynthesen mit dem Sulfotyrosin-Baustein S2

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, durch das Peptide dargestellt werden können, die an Tyrosinen in ihrer Sequenz ein bestimmtes Sulfatierungsmuster aufweisen. Im Gegensatz zu dem Standardverfahren der Festphasenpeptidsynthese (Kapitel 4.1) ist diese Synthese unter Verwendung eines Fmoc-geschützten Sulfotyrosin-Bausteins bedeutend aufwendiger. Der Grund dafür liegt in der säurelabilen Sulfatgruppe.

In Abbildung 29 ist der Fmoc-geschützte Sulfotyrosin-Baustein **S2** zu sehen, der bei der Peptidsynthese eingesetzt wird. Die Sulfatgruppe am Phenylring stellt einen Schwefelsäureester dar, der im sauren Milieu leicht gespalten wird. Der Mechanismus der Desulfatierung ist in Abbildung 30 dargestellt.¹⁶⁸

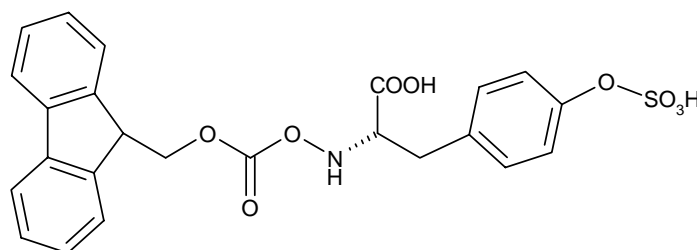


Abbildung 29: Strukturformel des Fmoc-geschützten Sulfotyrosin-Bausteins S2.

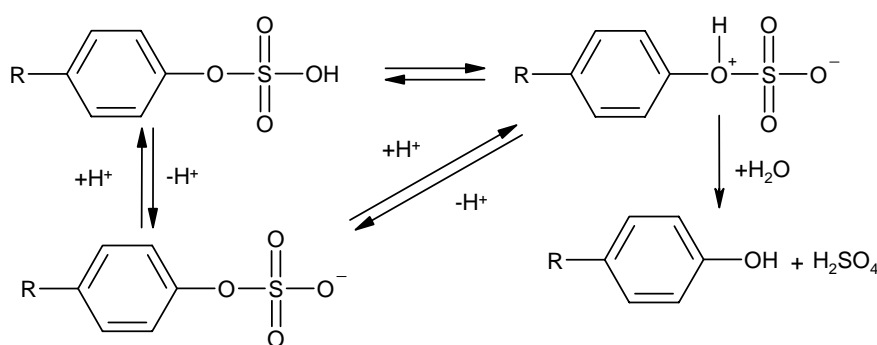


Abbildung 30: Mechanismus der Desulfatierung von Arylmonosulfaten im sauren Milieu.

Bei der Aufarbeitung der Peptide stellt die Empfindlichkeit der Sulfatgruppe ein erhebliches Problem dar, da die Schutzgruppen der Seitenketten im sauren Milieu abgespalten werden müssen. Dies geschieht im Allgemeinen mit TFA bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. einer Stunde. Diese Bedingungen würden allerdings zu einem fast vollständigen Verlust der Sulfatgruppen führen. Kitagawa *et al.* zeigte sich jedoch, dass die Desulfatierung

in 90 %iger TFA stark temperaturabhängig ist.^{168;169} Die Halbwertszeit steigt von ca. 20 min bei 30 °C über 2 h bei 18° C auf über 30 h bei 0° C. Die Abspaltzeiten der einzelnen Schutzgruppen der Seitenketten verlängern sich ebenfalls, aber nicht im gleichen Umfang wie die der Desulfatierung, so dass eine Abspaltung der Schutzgruppen bei gleichzeitigem Erhalt der Sulfatgruppen bei tiefen Temperaturen möglich ist.^{168;170}

Die Peptide **D1**, **D2** und **F1-F5** wurden an vollautomatischen Festphasenpeptidsynthesizern hergestellt. Das Peptid **E** wurde von Hand synthetisiert. Bei einem PAL-PEG-PS-Harz würde die Abspaltung vom Harz bei Raumtemperatur in 90 % TFA durchgeführt werden, was eine unerwünschte Desulfatierung der Tyrosine bewirken würde. Das konnte in ersten Vorversuchen solcher Peptidsynthesen gezeigt werden, in denen die Tyrosine der synthetisierten Peptide nach der Abspaltung vom Harz keine Sulfatgruppen mehr trugen. Deswegen wurde als feste Phase ein 2-Chlortrityl-Polystyrolharz eingesetzt, an das die erste Aminosäure bereits gekuppelt war und dessen Aminogruppe Fmoc-geschützt vorlag. Eine Abspaltung der Peptide vom Harz ist hierbei unter milden Bedingungen mit HFIP/DCM (30 min bei 25 °C) möglich, wobei nicht das Amid sondern die freie Säure am C-Terminus entsteht.

Die für die Synthese eingesetzten Aminosäuren trugen an den Seitenketten säurelabile Schutzgruppen und waren an der Aminofunktion Fmoc-geschützt. Die Aminosäuren wurden durch Dreifachkupplungen (30, 60, 90 min) an die bestehende Peptidkette gekuppelt. Als Kupplungsreagenzien für die natürlichen Aminosäuren wurden PyBob und NMM verwendet, für die Kupplung der Sulfotyrosine wurde stattdessen HOBt und DIPCDI verwendet, da diese Kupplungsreagenzien, im Vergleich zu den oben genannten, in Vorversuchen zu besseren Ergebnissen geführt hatten. Dabei wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Äquivalente eingesetzt. Erste Versuche, Peptide über die Standardmethode mit TBTU und DIPEA darzustellen, hatten zu keinem nachweisbaren Produkt geführt. Hier kommt es vermutlich zu Nebenreaktionen, die eine Synthese des Produktes unmöglich machen.

Tabelle 4: Äquivalente der Reagenzien bei der Aminosäurekupplung.

Sulfotyrosin-Baustein S2	3 eq. AS	3 eq. DIPCDI	3 eq. HOBt
andere Aminosäuren	3 eq. AS	3 eq. PyBOP	9 eq. NMM

Im Anschluss an den letzten Kupplungsschritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe der terminalen Aminosäure manuell abgespalten, und die Abspatlösung, die das Methylenfluoren-Piperidin-

Addukt enthielt, wurde photometrisch vermessen. Es konnte so die Rohausbeute der Synthese ermittelt werden.

Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde unter Eiskühlung bei 0 °C in 90 % aq. TFA für 5 - 7 h durchgeführt. Die TFA wurde im Vakuum entfernt, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches ohne Unterbrechung bei 0 °C gehalten werden musste. Anschließend wurde kaltes H₂O hinzugegeben und lyophilisiert.

Die Aufreinigung der Peptide wurde mit RP-HPLC durchgeführt. Dabei konnten aufgrund der säurelabilen Sulfatgruppen nicht die TFA-haltigen Laufmittel für die vorherigen Synthesen verwendet werden. Anstelle dessen wurden Laufmittelgemische mit NH₄OAc-Lösung gewählt.

4.8. *Synthese des Peptids E*



Abbildung 31: Aminosäuresequenz des Peptids E. Das Sulfotyrosin ist rot hervorgehoben.

Auch das Tripeptid **E** wurde mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Da es sich hierbei lediglich um ein Tripeptid handelte, wurde dieses Peptid manuell in einem 20 µmol Ansatz mit Dreifachkupplung synthetisiert. Es wurde nur ein Teil der Rohsubstanz mittels RP-HPLC aufgereinigt, da das Peptid nur Charakterisierungszwecken diente.

Dieses Peptid wurde als einfaches Testsystem hergestellt, um die Charakterisierung von Peptiden, die Sulfotyrosin enthalten, durch massenspektrometrische Methoden zu optimieren, da bei den bis dahin synthetisierten Peptiden mit Sulfotyrosinen keine ausreichenden Charakterisierungsmöglichkeiten durch MALDI-TOF-MS bzw. ESI-MS gefunden wurden. Durch die Ionisationsmethode der Probe im UV-MALDI-TOF-MS kann es u.a. zu Photoreaktionen kommen, die zu einem vollständigen Verlust der Sulfatgruppen führen. Es konnte daher auf diesem Wege weder im *positive-* noch im *negative ion mode* eine Charakterisierung der sulfatierten Peptide erfolgen, obwohl die durch Photoreaktionen desulfatierten Peptide nachgewiesen werden konnten. Auch die Verwendung einer Vielzahl an Matrices kombiniert mit unterschiedlichen Präparationsmethoden erbrachte keine Ergebnisse.

Die Charakterisierung des Peptids **E** über MALDI-TOF-MS war nur schwer durch das [M+H]⁺-Signal bei m/z = 503.2 möglich, so dass diese Nachweismethode bei größeren Peptiden mit mehreren Sulfotyrosinen nicht mehr anwendbar ist.

Das Peptid **E** konnte allerdings gut durch ESI-MS im *negative ion mode* unter Erhalt seiner Sulfatgruppe an seinem [M]⁻-Signal bei 501.2 g/mol charakterisiert werden. Die Probe wurde dafür mit 1 % Triethylamin versetzt und über Direkteinspritzung injiziert. Die Charakterisierung aller Peptide mit Sulfotyrosinen erfolgte daher stets nach dieser Methode.

4.9. *Synthese und Bindungsstudien der Peptide D1 und D2*

		5	10	15	20	25	30																											
N-Terminus	H ₂ N -	M	D	Y	Q	V	S	S	P	I	Y	D	I	N	Y	Y	T	S	E	P	C	Q	K	I	N	V	K	Q	I	A	A	R	- Protein	
D1	H ₂ N -													N	Y	T	S	E	P	S	Q	K												- COOH
D2	H ₂ N -													N	Y	T	S	E	P	S	Q	K												- COOH

Abbildung 32: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5 und der Peptide D1 und D2. In blau hervorgehobene Aminosäuren kennzeichnen Substitutionen in Bezug auf den N-Terminus des CCR5. Sulfotyrosine sind rot hervorgehoben.

Die Peptide **D1** und **D2** sollten ausgehend von der Sequenz des N-Terminus des CCR5 dargestellt werden und dienten unter anderem dazu, die Synthesebedingungen für Peptide mit Sulfotyrosinen zu optimieren. Dafür wurde eine Sequenz von zehn Aminosäuren gewählt, die an zwei Positionen Tyrosine beinhaltet. Nach der Synthese sollten SPR- und STD-Experimente an GP120 durchgeführt werden. Das verwendete 2-Chlortrityl-Polystyrolharz bewirkt nach der Abspaltung der Peptide am C-Terminus eine freie Säurefunktion.

Die Peptide wurden parallel in einer vollautomatischen Synthese mit Dreifachkupplungen am Peptidsynthesizer in einem 20 µmol Ansatz hergestellt. Dabei wurde das Peptid **D1** parallel in drei Ansätzen mit drei unterschiedlichen Methoden bezüglich des *capping*-Schrittes synthetisiert. Der *capping*-Schritt stellt bei der Synthese von Peptiden, die Sulfotyrosine enthalten, eine besondere Herausforderung dar. Bei der standardmäßigen Peptidsynthese werden nach jedem Kupplungsschritt freie Aminofunktionen mit Ac₂O/DMF (1:10) acetyliert (*capping*).¹²⁹ Dieser Schritt ist notwendig, um Aminosäuren, die am Harz bzw. am Peptid gebunden sind aber nicht im vorangegangenen Kupplungsschritt reagiert haben, durch die Acetylierung für weitere Reaktionen zu blockieren. Es sollte hier nun untersucht werden, welchen Einfluss das Essigsäureanhydrid und vor allem die bei der Reaktion entstehende Essigsäure auf die Sulfatgruppen hat. Aus den Ergebnissen sollten sich optimierte *capping*-Bedingungen für die Synthese der nachfolgenden Peptide **F1-F5** ergeben. Im Folgenden sind die Methoden a bis c des *capping*-Schrittes für die Synthese des Peptids **D1** aufgeführt.

Methode a

Bei dieser Methode wurde mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}$ (1:10) nur bis zur Syntheseposition 8 *gecappt*. An dieser Position der Synthese erfolgt die Kupplung eines Sulfotyrosins. Nach der Kupplung wurde auf das *cappen* komplett verzichtet, um später im Vergleich mit den anderen Methoden die Auswirkungen auf das Sulfotyrosin zu untersuchen.

Methode b

Im Unterschied zur Methode a wurde der *capping*-Schritt bis zur letzten Syntheseposition durchgeführt.

Methode c

Es wurde mit einem Gemisch von $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}/\text{DMF}$ (1:1:38) bis zur letzten Syntheseposition *gecappt*.

Bei dem Peptid **D2** handelt es sich um ein Kontrollpeptid, das kein Sulfotyrosin in seiner Sequenz enthält. In dieser Synthese wurde mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}$ (1:10) bis zur letzten Syntheseposition *gecappt*.

Die Aufreinigung aller Peptide erfolgte über RP-HPLC. Die Peptide zeigten eine sehr gute Löslichkeit. Das Peptid **D1** [$M = 1295.60$ g/mol] konnte durch ESI-MS (*negative ion mode*) durch das $[\text{M}]^{2-}$ -Signal bei $m/z = 646.9$ identifiziert werden. Das Peptid **D2** konnte im MALDI-TOF-MS durch das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal bei $m/z = 1216.5$ identifiziert werden.

Während die Ausbeuten nach HPLC bei Peptid **D1** abhängig von der *capping*-Methode zwischen 2.3 und 9.3 % lagen, konnte das Peptid **D2** in einer Ausbeute von 26 % erhalten werden. Dies verdeutlicht die schlechten Kupplungsausbeuten bei der Kupplung eines Sulfotyrosin-Bausteins. Die Ausbeute von nur 2.3 % bei der *capping*-Methode b zeigt die Empfindlichkeit des Bausteins gegenüber dem standard *capping*-Protokoll.

Die Synthese nach der Methode c stellte die schonendste Variante mit guter Ausbeute dar. Es wurde die beim *cappen* freigesetzte Essigsäure durch das zugegebene Pyridin neutralisiert, so dass es zu keiner sichtbaren säureinduzierten Desulfatierung am Tyrosin kam. Zusätzlich wurde auch die Abspaltung des Peptids vom Harz verhindert, da die 2-Chlortrityllinkergruppe ebenfalls sehr säurelabil ist. In den folgenden Synthesen wurde daher dieses schonende Verfahren zum *cappen* verwendet.

In $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, $\text{pH} = 4$) zeigte sich, dass die Peptide gut löslich waren. Zur genauen Charakterisierung wurden 2D-NMR-Experimente aufgenommen. Im

TOCSY-Spektrum der Peptide konnten die Spinsysteme aller Aminosäuren identifiziert werden. Durch Auswertung der NH-Region konnten neun NH-Spuren, für **D1** im Bereich von 6.592 bis 8.453 ppm, für **D2** im Bereich von 6.594 bis 8.483 ppm, den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Die Prolinspur konnten anhand ihrer $\text{CH}_{\beta,\beta}$ -Spuren zugeordnet werden. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der Nachbarschafts-NOE's in einem NOESY-Spektrum. Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 angegeben.

4.9.1. CD-Messungen

Die CD-Messungen wurden entsprechend der Messungen in Kapitel 4.4.1 durchgeführt. In Abbildung 33 sind die CD-Spektren der Peptide **D1** und **D2** und die Auswertung durch das Programm CDPro abgebildet.

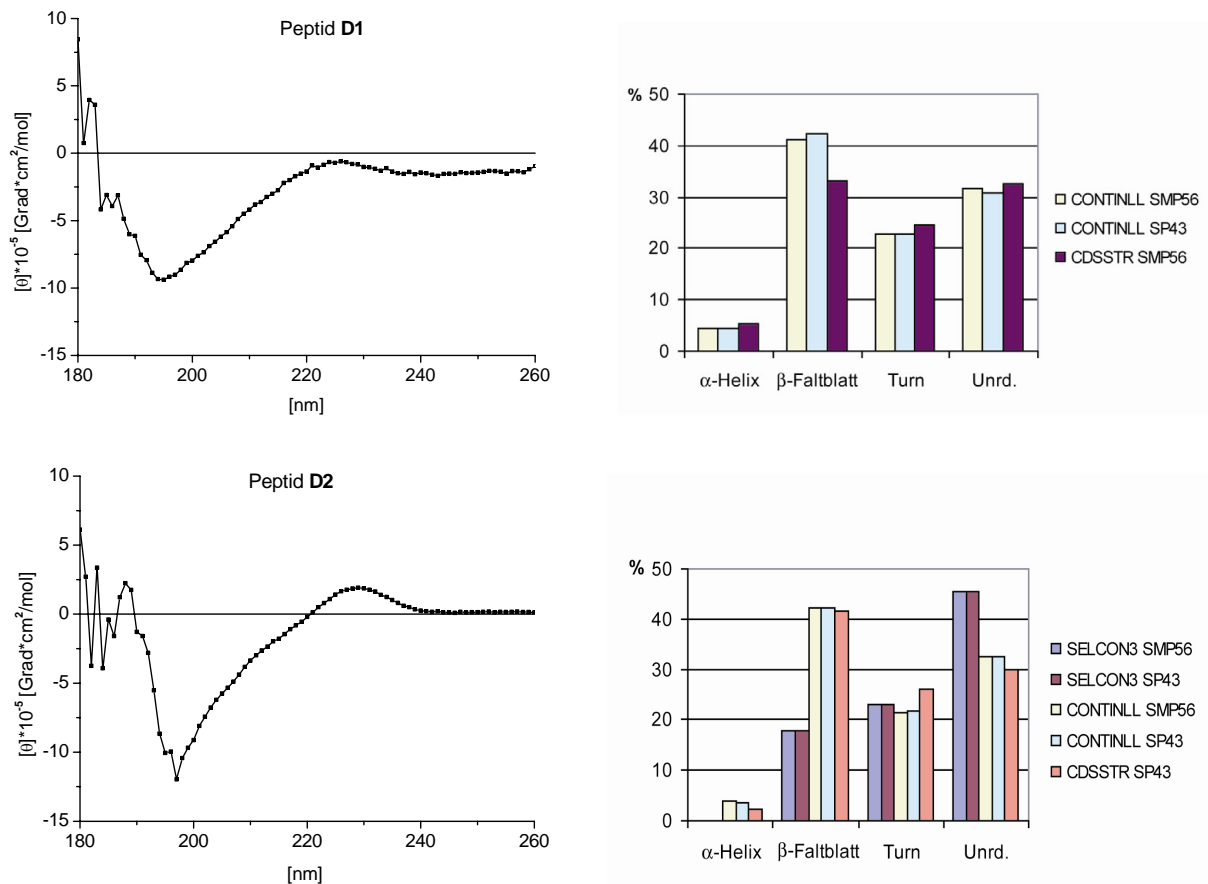


Abbildung 33: CD-Spektren und Bestimmung der Sekundärstrukturanteile der Peptide D1 und D2 durch verschiedene Auswertungsmodulare des Programms CDPro.

Die etwas unterschiedlichen Kurvenverläufe der beiden Spektren können entweder auf leichte Unterschiede in der Sekundärstruktur oder auf die Anwesenheit der Sulfatgruppe bei Peptid **D1**, die als starkes Chromophor dient, zurückgeführt werden. Die verschiedenen Programme mit den verwendeten Datensätzen SP43 und SMP56 zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile zeigen leichte Abweichungen voneinander. Während die Ergebnisse der Programme CONTINLL und CDSSTR wieder gut übereinstimmen, zeigt das Programm SELCON3 etwas andere Ergebnisse. Mit dem Programm CDSSTR und dem Datensatz SP43 konnten keine Ergebnisse erzielt werden.

Die Auswertung der CD-Spektren zeigt, dass die Peptide **D1** und **D2** eine ähnliche Sekundärstruktur aufweisen. Sie bestehen zu ca. 30 % aus Zufallsknäuel und zu ca. 40 % aus β-Faltblatt. Rund 20 % macht der β-turn aus, wohingegen auf die α-Helix kaum prozentuale Anteile entfallen. Das Programm SELCON3 zeigt hingegen bei Peptid **D2** nur 20 % β-Faltblatt, dafür aber fast 50 % Zufallsknäuel.

Verglichen mit den Ergebnissen der CD-Messung von Peptid **A1** (Kapitel 4.4.1), welches die gesamte Sequenz des N-Terminus beinhaltet, zeigen die Peptide **D1** und **D2** vergleichbare Ergebnisse. Trotz der relativ kleinen Sequenz von zehn Aminosäuren Länge scheinen die Peptide einen hohen Grad an geordneter Struktur aufzuweisen.

4.9.2. SPR-Bindungsstudien

Zu Beginn der SPR-Experimente wurde das Peptid **D2**, welches keine Sulfotyrosine enthält, an einem Biacore 3000 in einem HBS-EP-Puffer auf seine Bindung zum GP120 hin untersucht. Für die Messungen wurde ein CM5-Goldchip verwendet, der mit 9322 RU (77.7 fmol) GP120 (Bal) belegt wurde. Die Aktivität des GP120 wurde durch ein lösliches, in CHO-Zellen exprimiertes CD4-Konstrukt bestimmt. Aus der Extrapolation der Bindungskurve ergab sich eine Aktivität von 36 % des immobilisierten GP120 (28.1 fmol aktives GP120).

Für die Injektion wurde das Injektionsprogramm KINJECT bei einer Flußrate von 10 µl/min verwendet. Das effektiv vermessene Volumen lag bei 100 µl der Substanz. Als Dissoziationszeit wurden jeweils 300 s gewählt. Zur Regeneration wurde nach jeder Messung 10 µL einer 0.0025 %igen Natriumdodecylsulfat-Lösung mit einer Flussrate von 20 µL/min über die Zelle geleitet. Anschließend erfolgte eine Injektion von 100 µL des Laufpuffers.

Das HBS-EP-Puffersystem wurde als Laufpuffer verwendet, in dem auch die Proben gelöst wurden. Es wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen (150, 100, 60, 30, 10, 5, 2 µM) vermessen. In Abbildung 34 sind die Bindungskurven der Verdünnungsreihe des Peptids **D2** abgebildet.

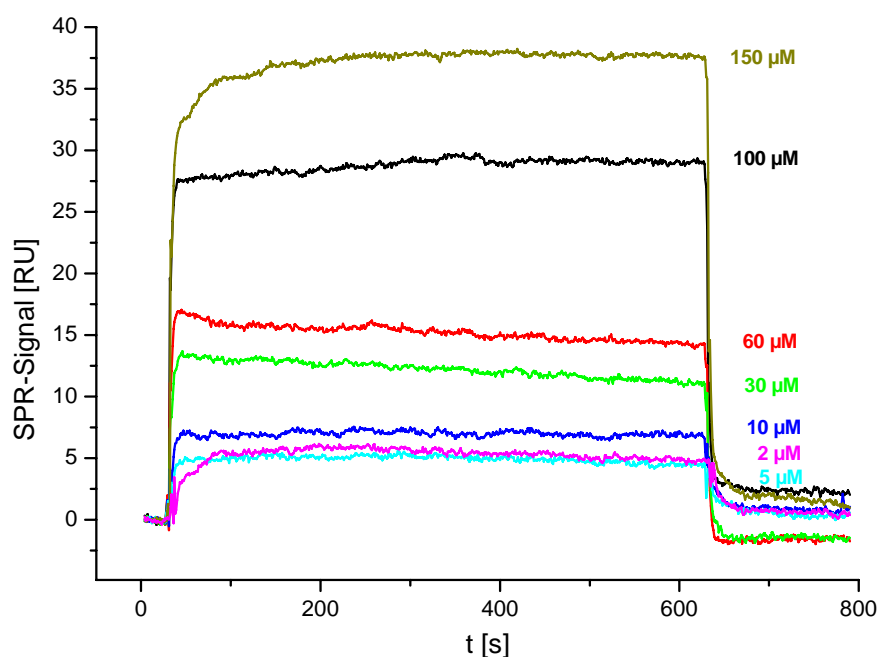


Abbildung 34: SPR-Bindungskurven der Verdünnungsreihe des Peptids D2 .

Ein *fit* der Assoziations- und Dissoziationskurven für die Konzentration $c = 100 \mu\text{M}$ an ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung ergibt eine *off rate* von 0.12 s^{-1} und einen K_D -Wert von $15 \mu\text{M}$. Da bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ allerdings schon unspezifische Bindung auftritt, wie in Abbildung 35 zu sehen ist, ist die hier ermittelte *off rate* wahrscheinlich kleiner. Dementgegen wirkt der sogenannte *rebinding*-Effekt auf der hochbelegten Chipoberfläche, durch den die wahre Dissoziationsrate höher liegen kann. Für die Konzentrationen kleiner $100 \mu\text{M}$ konnte kein *fit* erhalten werden.

Das Peptid **D2** erzielte beim *fit* in einem *one-site binding* Modell (Abbildung 35) einen K_D -Wert von $475 \mu\text{M}$. Wie aber deutlich zu erkennen ist, scheint es ab einer Konzentration größer $60 \mu\text{M}$ verstärkt zu unspezifischer Bindung zu kommen. Daher wurde noch eine weitere Auswertung vorgenommen, in der nur die Konzentrationen bis $60 \mu\text{M}$ berücksichtigt wurden. Die Änderung des Chi^2 -Wertes von 7.34 nach 1.53 zeigte eine deutliche Verbesserung des *fits*. Der K_D -Wert lag so bei $14 \mu\text{M}$, was erstaunlich gut mit dem aus den kinetischen Daten ermittelten K_D -Wert von $15 \mu\text{M}$ übereinstimmt. Dieser Vergleich ist allerdings kritisch zu betrachten, da die verwendete Konzentration von $100 \mu\text{M}$ zwar für die kinetische Auswertung jedoch nicht für die Auswertung des *one-site binding* Modells verwendet wurde.

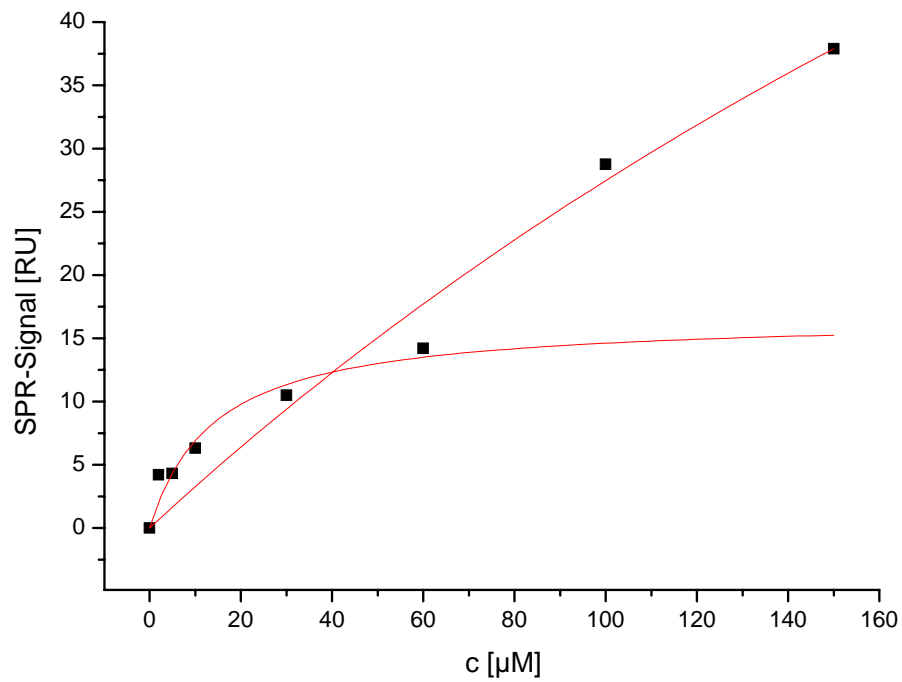


Abbildung 35: Ermittlung des K_D -Wertes von Peptid **D2** über das *one-site binding* Modell. Aufgetragen ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Peptid-Konzentration.

Das Peptid **D1** wurde unter gleichen Bedingungen wie Peptid **D2** allerdings bis zu einer Konzentration von 100 μM vermessen. Wie am Kurvenverlauf zu erkennen ist (Abbildung 36), verhalten sich die Bindungskurven dieses Peptids anders als die des Peptids **D2**. Die Bindungskurven gaben hier negative RU-Antworten.

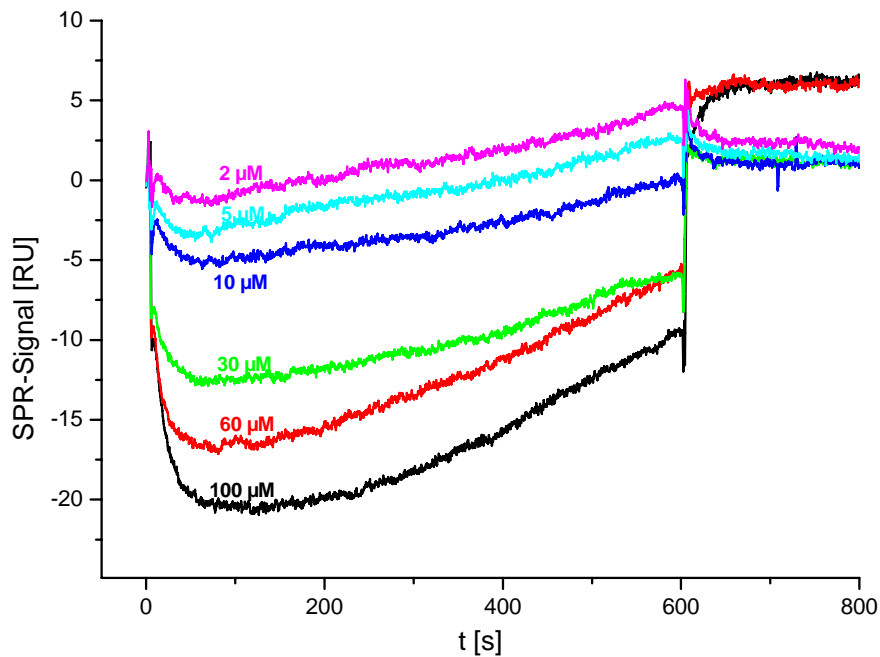


Abbildung 36: SPR-Bindungskurven der Verdünnungsreihe des Peptids D1

Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Peptiden in der Sulfatgruppe am Tyr-14 liegt, muss davon ausgegangen werden, dass dies die Ursache für die unterschiedlichen Kurvenverläufe ist. Dieser Effekt lässt sich über den veränderten Brechungsindex der Probenlösung erklären, da die zusätzliche Sulfatgruppe bei Peptid **D1** eine Solvathülle mit positivem Gegenion erzeugt. Dadurch kann die RU-Antwort durchaus negative Wertebereiche annehmen. Der Bindungskurvenverlauf kann weiterhin über ionische Wechselwirkungen zwischen Sulfatgruppe bzw. dessen Solvathülle und GP120 erklärt werden. Versuche mit anderen Puffersystemen, in denen vor allem die Ionenstärke der Lösung verändert wurde, brachten keine Veränderung der Bindungskurven. Daher wurde für die Auswertung über das *one-site binding* Modell nicht RU_{\max} sondern der Betrag von RU_{\min} bestimmt (Abbildung 37). Da für die Bestimmung des K_D -Wertes nur die Konzentrationsabhängigkeit wichtig ist, ist diese Vorgehensweise zulässig.

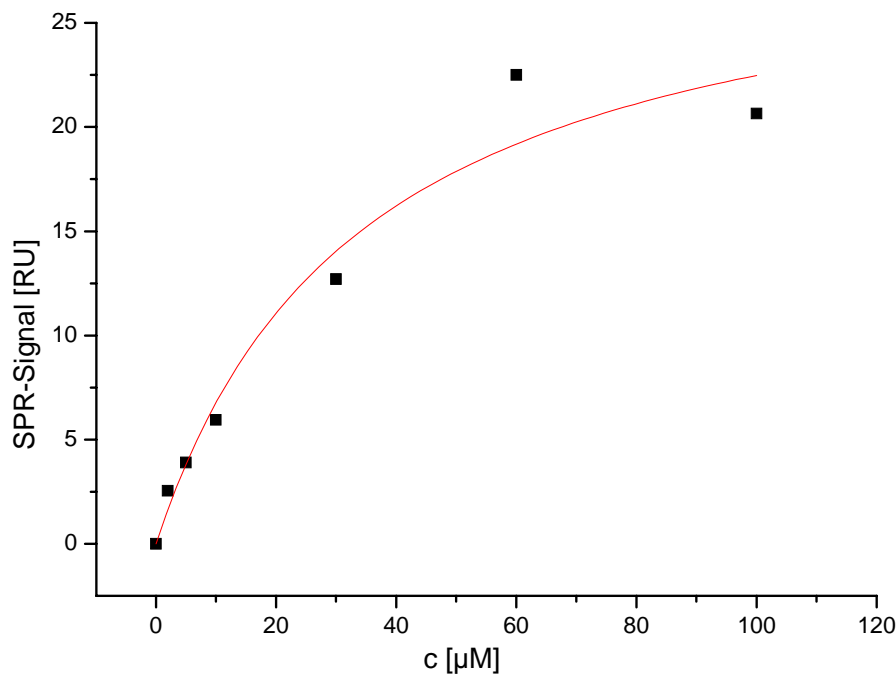


Abbildung 37: Ermittlung des K_D -Wertes von Peptid **D1** über das *one-site binding* Modell. Aufgetragen ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Peptid-Konzentration.

Für das Peptid **D1** konnte mit dem *fit* in einem *one-site binding* Modell ein K_D -Wert von $35 \mu\text{M}$ ($\text{Chi}^2 = 3.5$) bestimmt werden. Hierbei wurde der gesamte Messbereich bis $100 \mu\text{M}$ ausgewertet.

Der K_D -Wert des Peptids **D1** liegt im Vergleich zu dem des Peptids **D2** ca. um Faktor zwei höher. Da die Sulfatgruppe an der Bindung zum GP120 beteiligt sein soll, wurde zuvor eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante vermutet. Ausserdem zeigt Peptid **D2** ab einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ eine unspezifische Bindung während Peptid **D1** diesen Effekt nicht zeigt. Die Auswertung der unterschiedlichen Bindungskurven (positiv und negativ) der beiden Peptide könnte eine Erklärung für diese Effekte sein.

4.9.3. STD-NMR-Experimente

Die STD-NMR-Experimente wurden bei 285 K an einem 700 MHz -Spektrometer aufgenommen. Die Peptide **D1** und **D2** wurden in Tris- D_2O -Puffer als Liganden gegen GP120 (Bal) in einem Shigemi-Röhrchen vermessen. Für jedes Peptid wurde sowohl ein

epitope mapping als auch Titrationsexperimente zur Bestimmung von Affinitätskonstanten durchgeführt.

Epitope mapping Peptid **D2**

Für das Peptid **D2** wurde ein 1D- ^1H -STD-Spektrum für das *epitope mapping* mit einer Konzentration von 500 μM (100facher Überschuss bezogen auf die Protein-Konzentration) aufgenommen. Trotz der relativ langsamen Dissoziationsrate von $k_{\text{off}} = 0.12 \text{ s}^{-1}$, die aus den SPR-Kurven abgeschätzt werden konnte (Kapitel 4.9.2), zeigte das Peptid **D2** starke STD-Effekte. Es ist daher anzunehmen, dass in den SPR-Bindungsstudien *rebinding*-Effekte auf der hochbelegten Chipoberfläche auftraten und die wirkliche Dissoziationsrate daher höher liegt. Es konnten im gesamten Peptid STD-aktive Gruppen identifiziert werden (Abbildung 38).

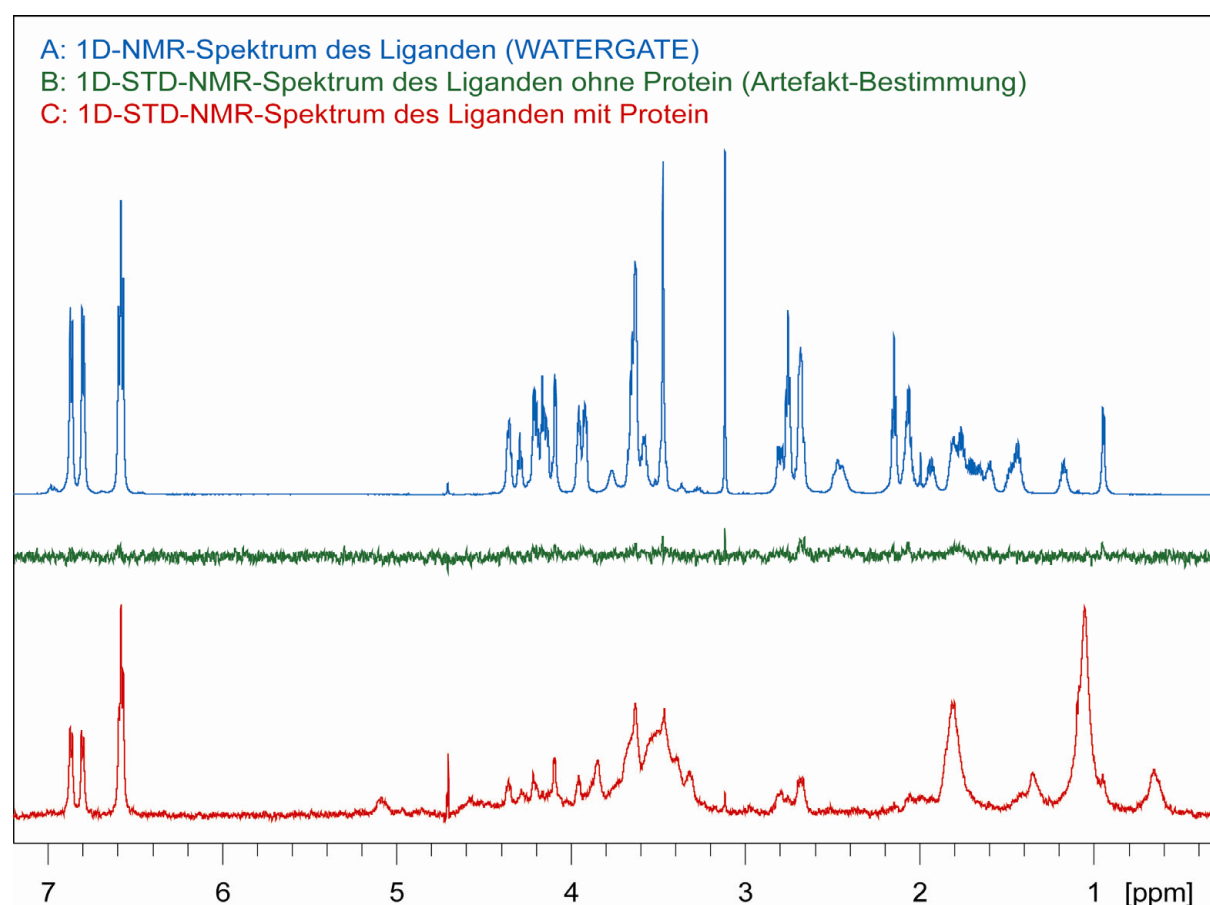


Abbildung 38: Vergleich des NMR-Spektrums des Peptids **D2** mit WATERGATE-Wasserunterdrückung (oben) und des STD-NMR-Spektrums ohne Protein (mitte) mit dem STD-NMR-Spektrum mit Protein (unten).

Besonders wichtig scheinen die Aromaten von Tyr-14 und Tyr-15 und die H α -Protonen von Tyr-15 und Thr-16 zu sein, da diese den größten STD-Effekt zeigten (Abbildung 39). Daher wird hier ein wesentlicher Teil des Bindungs epitops vermutet.

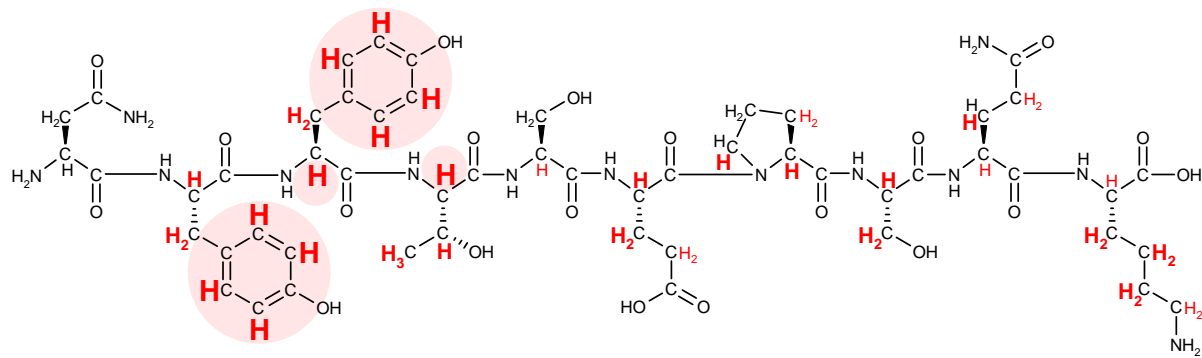


Abbildung 39: *Epitope mapping* des Peptids D2 gegen GP120 (Bal) per STD-NMR. Protonen, die einen STD-Effekt zeigen, sind rot markiert und der Größe nach in drei Kategorien (schwach, mittel, stark) eingeteilt. Der rötliche Hintergrund deutet den wesentlichen Teil des Bindungs epitops an.

Titration Peptid D2

Um die Dissoziationskonstanten der Protonen im Peptid zu bestimmen, wurden mehrere 1D- ^1H -STD-NMR-Spektren mit unterschiedlichen Ligandkonzentrationen (5-100facher Überschuss bezogen auf die Protein-Konzentration von 5 μM) aufgenommen. Die Ligandkonzentration wurde von Messung zu Messung erhöht. Es wurden für jede Messung nur die STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen bestimmt, die im *epitope mapping* den stärksten STD-Effekt zeigten. Die ermittelten Datenpunkte können nach einem *one-site binding* Modell gefittet werden. Da einige Parameter nicht bekannt waren (die Kinetik der Austauschreaktion, die Zeitkonstanten für die Sättigung und die T_1 -Relaxationszeiten für die betrachteten Protonen), um den exakten Kurvenverlauf beschreiben zu können, mussten diese Effekte vernachlässigt werden (Abbildung 40).

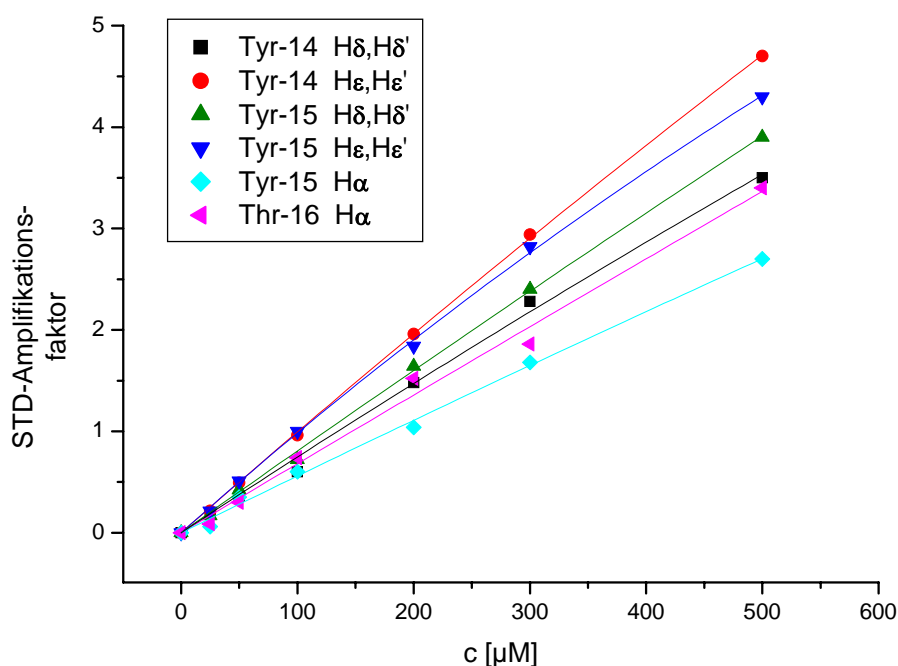


Abbildung 40: STD-Titration von Peptid D2. Für die Bestimmung der K_D -Werte individueller Protonen wurden die Datenpunkte über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Die ermittelten K_D -Werte reichen von 3 mM (Tyr-15 H ϵ ,H ϵ' -Protonen) bis 36 mM (Thr-16 H α -Proton). Betrachtet man den *fit* in Abbildung 40, so scheint dieser fast linear und es kann nicht eindeutig von einer spezifischen Bindung ausgegangen werden. Die K_D -Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: K_D -Werte individueller Protonen von Peptid D2. Die Datenpunkte wurden über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Proton	K_D -Werte [mM]
Tyr-14 H δ ,H δ'	7
Tyr-14 H ϵ ,H ϵ'	7
Tyr-15 H δ ,H δ'	13
Tyr-15 H ϵ ,H ϵ'	3
Tyr-15 H α	12
Thr-16 H α	36

Die bei den STD-NMR-Titrations ermittelten K_D -Werte der einzelnen Protonen zeigen teilweise Abweichungen untereinander, die wie folgt erklärt werden können: Zum einen

zeigen Protonen, die nahe am Protein stehen, einen stärkeren STD-Effekt als Protonen, die vom Protein abgewandt sind. Diese Eigenschaft wird für das *epitope mapping* verwendet und führt bei der Berechnung der K_D -Werte zu Unterschieden zwischen einzelnen Protonen. Zum anderen kann es in den 1D- ^1H -NMR-Spektren auf Grund von sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen mehrerer Protonen zu Signalüberlagerungen kommen. Zeigen diese Protonen unterschiedliche STD-Effekte, so kann bei der Auswertung nur der stärkste bestimmt und jedem Proton zugeordnet werden. Eine anschließende K_D -Wert Berechnung führt somit zu Ungenauigkeiten.

Verglichen mit den SPR-Ergebnissen von Peptid **D2**, wo ein K_D -Wert von 475 μM über den Konzentrationsbereich bis 150 μM bestimmt wurde, ist der kleinste K_D -Wert der STD-NMR-Ergebnisse um den Faktor 6 größer. Wie bei den SPR-Ergebnissen aber schon erkannt wurde, kommt es bei Konzentrationen größer 60 μM zu unspezifischen Bindungen, die z.B. auf Aggregatbildung zurückzuführen sind. Da die STD-NMR-Messungen verglichen mit den SPR-Messungen in einem höheren Konzentrationsbereich von 25-500 μM durchgeführt wurden, könnte der gleiche Effekt auch hier aufgetreten sein. Da bei STD-NMR das Protein in Lösung und nicht an eine Oberfläche gebunden vorliegt und die unterschiedlichen Puffersysteme und könnten zudem noch eine Veränderung des K_D -wertes bewirken.

Epitope mapping Peptid **D1**

Auch für das Peptid **D1** wurde ein 1D- ^1H -STD-NMR-Spektrum für das *epitope mapping* mit einer Konzentration von 500 μM (100facher Überschuss bezogen auf die Proteinkonzentration) aufgenommen. Im gesamten Peptid konnten STD-aktive Gruppen identifiziert werden, wobei eine hohe Übereinstimmung im Vergleich zu Peptid **D2** gefunden wurde. Besonders wichtig scheinen auch hier die Aromaten von Tyr-14 und Tyr-15 zu sein während die $\text{H}\alpha$ -Protonen von Tyr-15 und Thr-16 etwas geringere STD-Effekte zeigen als bei Peptid **D2** (Abbildung 41). Der Bindungsmodus des Peptids **D1** scheint dem des Peptids **D2** sehr ähnlich zu sein.

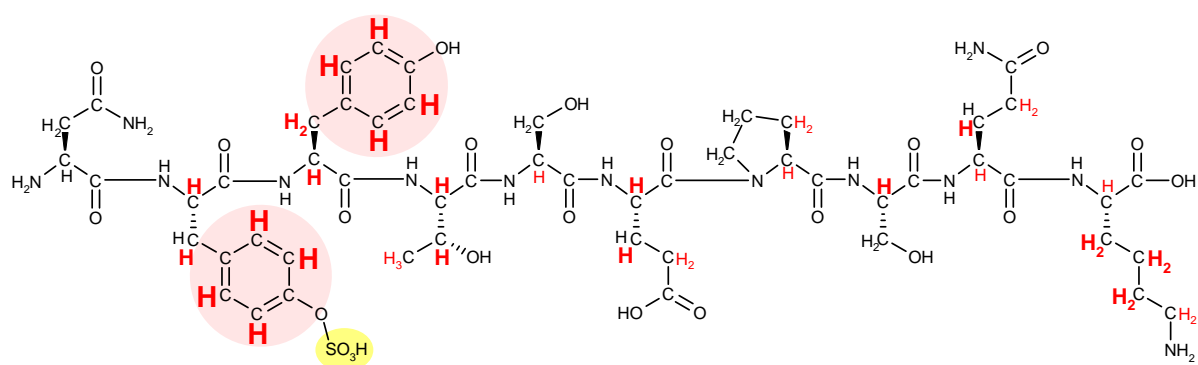


Abbildung 41: *Epitope mapping* des Peptids D1 gegen GP120 (Bal) per STD-NMR. Protonen, die einen STD-Effekt zeigen, sind rot markiert und der Größe nach in drei Kategorien (schwach, mittel, stark) eingeteilt. Der rötliche Hintergrund deutet den wesentlichen Teil des Bindungsepitops an. Die Sulfatgruppe an Tyr-14 ist gelb hervorgehoben.

Titration Peptid D1

Es wurden mehrere 1D- ^1H -STD-NMR-Spektren mit unterschiedlichen Ligandkonzentrationen (5-100facher Überschuss bezogen auf die Protein-Konzentration von 5 μM) aufgenommen, um die Dissoziationskonstanten der Protonen im Peptid zu bestimmen, wobei die Ligandkonzentration von Messung zu Messung erhöht wurde. Es wurden für jede Messung nur die STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen bestimmt, die im *epitope mapping* den stärksten STD-Effekt zeigten. Die ermittelten Datenpunkte wurden wieder nach einem *one-site binding* Modell gefittet (Abbildung 42).

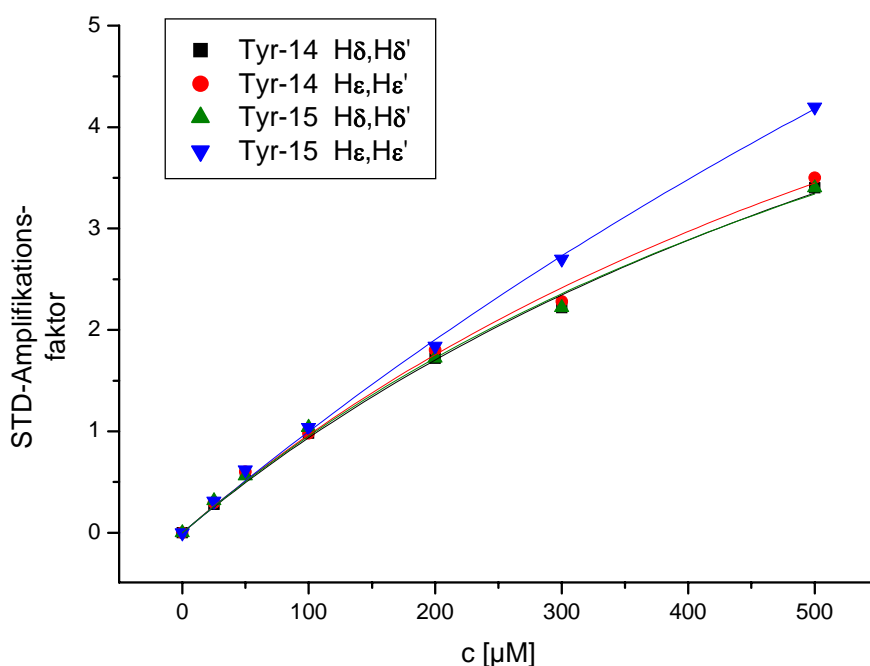


Abbildung 42: STD-Titration von Peptid D1. Für die Bestimmung der K_D -Werte individueller Protonen wurden die Datenpunkte über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Die ermittelten K_D -Werte reichen von 902 μM (Tyr-14 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$ -Protonen) bis 1962 μM (Tyr15 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$ -Proton). Die K_D -Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: K_D -Werte individueller Protonen von Peptid D1. Die Datenpunkte wurden über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-14 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	906
Tyr-14 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	902
Tyr-15 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	837
Tyr-15 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	1962

Verglichen mit den SPR-Ergebnissen von Peptid **D1**, wo ein K_D -Wert von 35 μM über den Konzentrationsbereich bis 100 μM bestimmt wurde, ist der kleinste K_D -Wert der STD-NMR-Ergebnisse um den Faktor 24 größer. Diese Tendenz deckt sich mit der von Peptid **D2**, wo der Unterschied bei Faktor 6 lag. Da die SPR-Ergebnisse von Peptid **D1** aus den negativen RU_{min}

Werten ermittelt wurden und die Bindungskurven während der Messung in eine fast lineare Steigung übergangen, ist die durch SPR-Experimente ermittelte Dissoziationskonstante eher ungenau. STD-NMR scheint für das System mit Sulfotyrosinen eine bessere Untersuchungsmethode darzustellen.

Vergleicht man die durch STD-NMR ermittelten Dissoziationskonstanten von Peptid **D1** und **D2** untereinander, so scheint die Sulfatgruppe in Peptid **D1** eine Erniedrigung der Dissoziationskonstanten um den Faktor drei zu bewirken. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die Sulfatgruppe direkt an der Bindung zum GP120 beteiligt und dadurch eine höhere Affinität zum GP120 vorhanden ist.

4.10. *Synthese und Bindungsstudien der Peptide F1-F5*

		5	10	15	20	25	30																										
N-Terminus	H ₂ N -	M	D	Y	Q	V	S	S	P	I	Y	D	I	N	Y	T	S	E	P	C	Q	K	I	N	V	K	Q	I	A	A	R	- Protein	
F1	H ₂ N -																																- COOH
F2	H ₂ N -																																- COOH
F3	H ₂ N -																																- COOH
F4	H ₂ N -																																- COOH
F5	H ₂ N -																																- COOH

Abbildung 43: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5 und der Peptide F1–F5. In blau hervorgehobene Aminosäuren kennzeichnen Substitutionen in Bezug auf den N-Terminus des CCR5. Sulfotyrosine sind rot hervorgehoben.

Die optimierten Synthesebedingungen mit Hilfe der Ergebnisse der Synthese des Peptids **D1** und die Möglichkeit zum Nachweis von Peptiden mit Sulfotyrosinen durch Peptid **E** bildeten die Voraussetzungen für eine neue Festphasenpeptidsynthese von fünf weiteren Peptiden (Abbildung 43). Wie sich bei den Peptiden **C1-C6** gezeigt hatte, verspricht ein Peptid mit der Sequenz von Tyr-3 bis Ser-20 gut löslich zu sein. Zudem beinhaltet diese Sequenz alle vier Tyrosine des N-Terminus vom CCR5 und alle für die Bindung an das GP120 relevanten Aminosäuren, die sich aus Mutations- und Substitutionsstudien ergeben haben (Ser-7, Asp-11, Asn-13, Tyr-14, Tyr-15, vgl. Abbildung 7). Es ist daher anzunehmen, dass die gewählte Peptidsequenz einen Großteil des Bindungs epitops zum GP120 beinhaltet. Daher sollten alle fünf Peptide dieser Sequenz entsprechen und ein unterschiedliches Sulfatierungsmuster an den vier Tyrosinen aufweisen, um den Einfluss der Sulfatgruppen auf die Bindung zum GP120 mit SPR- und STD-NMR-Experimenten untersuchen zu können. Dabei diene das Peptid **F1** ohne Sulfotyrosine als Referenzpeptid. Da angenommen wird, dass mindestens

zwei Tyrosine im nativen N-Terminus des CCR5 sulfatiert sind^{90-92;96}, sollten im Rahmen dieser Synthese zwei-, drei- und vierfach sulfatierte Peptide erhalten werden. Durch die Sulfatgruppen wurde eine zusätzliche Löslichkeitsverbesserung der Peptide vermutet. Das Cys-20 wurde wie bisher durch Serin substituiert, um Nebenreaktionen bei der Aufreinigung zu vermeiden.

Alle fünf Peptide wurden parallel in einer vollautomatischen Festphasenpeptidynthese mit Dreifachkupplungen an einem Peptidsynthesizer in einem 40 μmol Ansatz dargestellt. Das *capping* der Peptide wurde nach Methode c (Kapitel 4.9) mit einem Gemisch aus Ac_2O /Pyridin/DMF (1:1:38) durchgeführt. Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC ergab sich eine Ausbeute von 2.7 bis 3.1 %. Die geringe Ausbeute bei Peptid **F1** ist auf die unerwartet schlechte Löslichkeit zurückzuführen, während die geringen Ausbeuten bei den anderen Peptiden auf die schlechten Kupplungsausbeuten bei der Kupplung der Sulfotyrosin-Bausteine hindeuten. Dieses konnte anhand von Abbruchpeptiden im HPLC-Lauf erkannt werden.

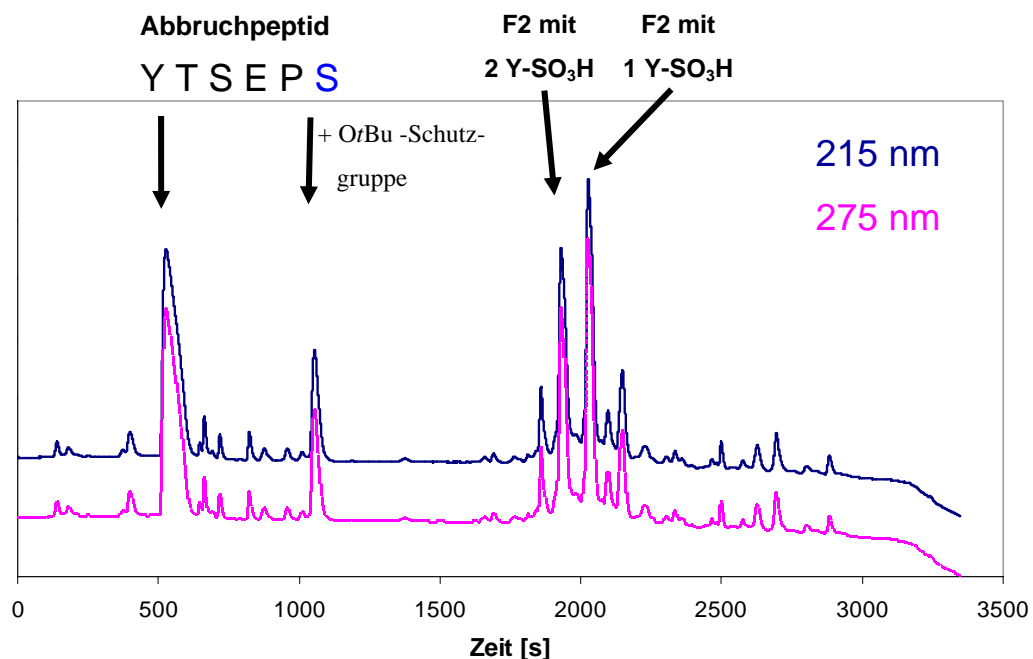


Abbildung 44: HPLC-Diagramm der Aufreinigung des Peptids **F2** aufgenommen bei Wellenlängen von 215 und 275 nm. Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen gelang mit MALDI-TOF- und ESI-MS.

In Abbildung 44 ist ein HPLC-Diagramm der Aufreinigung des Peptids **F2** abgebildet, welches bei einer Wellenlänge von 215 und 275 nm (Amid- und Aromatenbande)

aufgenommen wurde. Bei $t = 550$ s ist deutlich ein Peak des Abbruchpeptids YTSEPS vor der ersten Kupplung des Sulfotyrosin-Bausteins zu erkennen. Die Kupplung dieses Bausteins ist demnach nur mit geringer Ausbeute gelungen. Daher führen mehrere solcher Bausteine in einem Peptid zu drastischen Ausbeuteverlusten. Bei $t = 1100$ s erkennt man das gleiche Abbruchpeptid allerdings mit noch vorhandener *Or*Bu-Schutzgruppe. Die Entschützung der Seitenkettenschutzgruppen mit 90 % aq. TFA bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist demnach nicht quantitativ verlaufen. Eine Verlängerung der Reaktionszeit oder Erhöhung der Reaktionstemperatur bei der Entschützung kann aber auch nicht vorgenommen werden, da unter den durchgeführten Bedingungen schon etwa 50 % Desulfatierungen beobachtet werden können, wie man im Vergleich von Peptid **F2** mit nur einem Sulfotyrosin (Peak bei $t = 2050$ s) mit Peptid **F2** mit zwei Sulfotyrosinen (Peak bei $t = 1950$ s) erkennen kann. Das Verhältnis zwischen Abspaltung der Schutzgruppen und der Desulfatierungsrate ist abhängig von der Reaktionszeit. Dieses Problem wird umso komplizierter, je mehr Sulfotyrosine im Peptid vorliegen. Eine Ausbeuteerhöhung ließe sich demnach nur durch Optimierung der Einzelkupplung wie z.B. längere Reaktionszeiten bei der Bausteinkupplung erzielen, um weniger Abbruchpeptide zu erhalten.

Das Peptid **F1** konnte im MALDI-TOF-MS-Spektrum durch sein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal bei $m/z = 2127.9$ nachgewiesen werden. Die Peptide **F2-F4** konnten alle im ESI-MS-Spektrum (*negative ion mode*) durch ihre spezifischen $[\text{M}]^{2-}$ - bzw. $[\text{M}]^{3-}$ -Signale identifiziert werden. Bei Peptid **F5** gelang keine Identifizierung. Es war hier mit einem $[\text{M}]^{4-}$ -Signal zu rechnen, welches im Spektrum nicht beobachtet werden konnte. Unklar bleibt, ob die Synthese des Peptids **F5** vielleicht aufgrund der benachbarten Sulfotyrosine an den Positionen Tyr-14 und Tyr-15 nicht erfolgreich war, oder ob der Nachweis des Peptids durch ESI-MS zu unempfindlich war.

Das Peptid **F1** zeigte bei der NMR-Probenvorbereitung in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, $\text{pH} = 4$) entgegen den vorherigen Vermutungen nur eine geringe Löslichkeit. Auch sukzessive Zugabe von DMSO bzw. TFE bis zu einer Konzentration von 50 % konnten die Löslichkeit nicht soweit steigern, dass NMR-Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Das Peptid **F1** konnte schließlich nur in reinem DMSO durch 2D-NMR-Experimente charakterisiert werden. Die Peptide **F2-F4** zeigten eine ausgezeichnete Löslichkeit in wässrigen Systemen und wurden daher in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, $\text{pH} = 4$) durch 2D-NMR-Experimente charakterisiert. Im TOCSY-Spektrum der Peptide konnten die Spinsysteme aller Aminosäuren identifiziert werden. Durch Auswertung der NH-Region konnten 16 NH-Spuren den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Die jeweils zwei Prolinspuren konnten anhand ihrer

CH_α-Spuren zugeordnet werden. Die Sequenzierung der Peptide gelang durch Analyse der Nachbarschafts-NOE's in den zugehörigen NOESY-Spektren. Die ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 24 bis Tabelle 27 angegeben. In Abbildung 45 ist stellvertretend der NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des Peptids **F4** abgebildet.

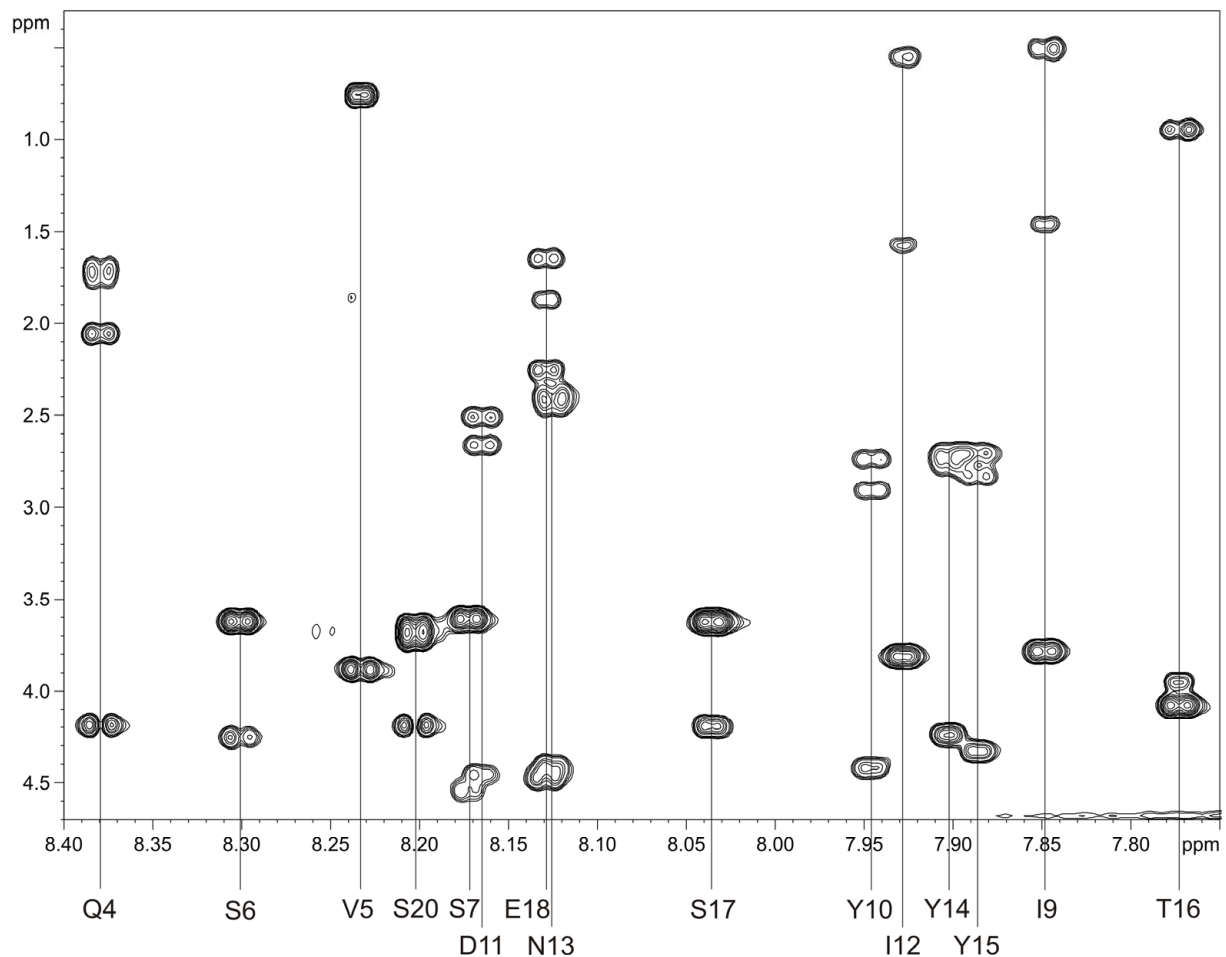


Abbildung 45: Ausschnitt des NH-Bereichs des TOCSY-Spektrums von Peptid **F4**, gemessen bei 285 K in H₂O/D₂O (9:1, pH = 4.0).

4.10.1. CD-Messungen

Die CD-Messungen wurden entsprechend der Messungen in Kapitel 4.4.1 durchgeführt. In Abbildung 46 sind die CD-Spektren der Peptide **F1-F4** und die Auswertung durch das Programm CDPro abgebildet, wobei die unterschiedlichen Programme und verwendeten Datensätze zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile alle vergleichbare Resultate zeigen.

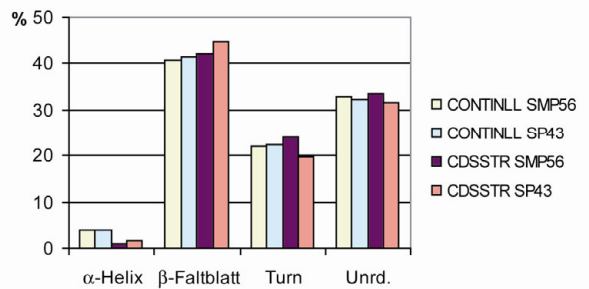
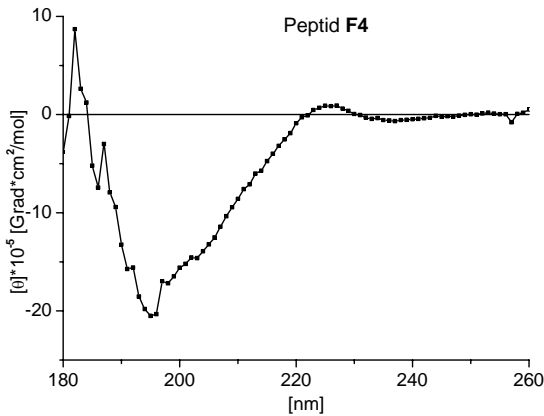
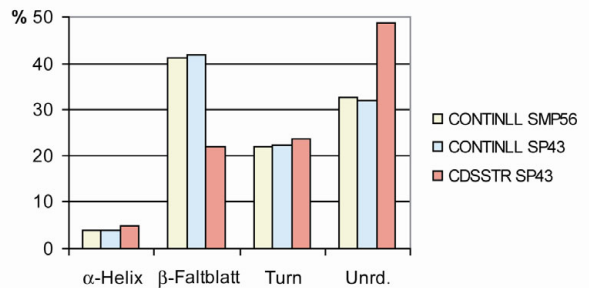
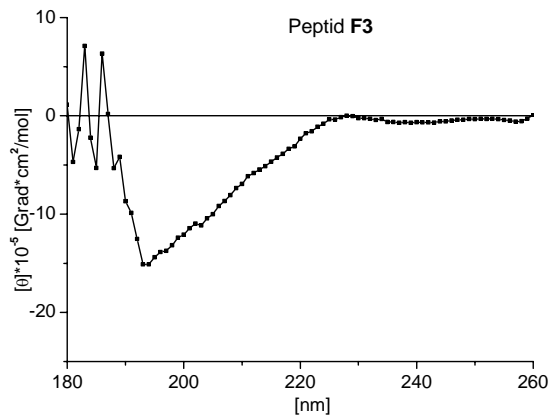
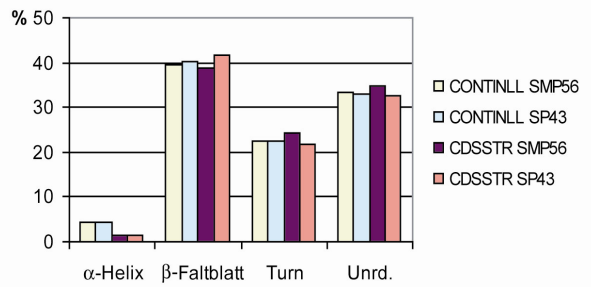
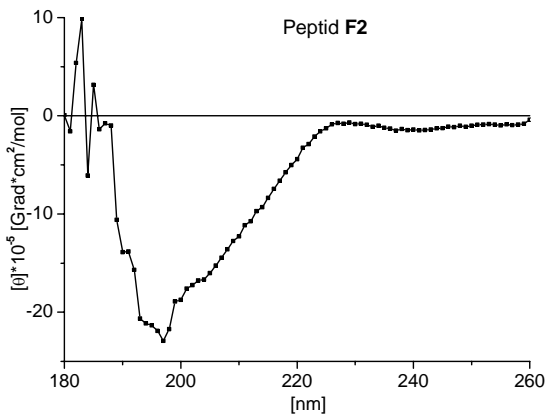
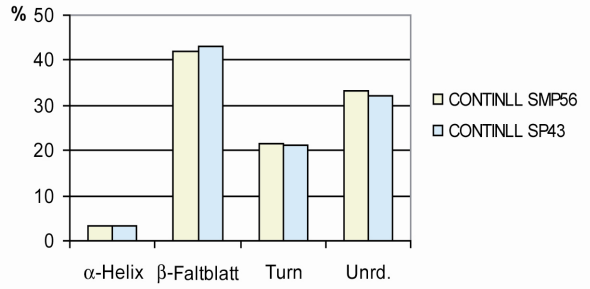
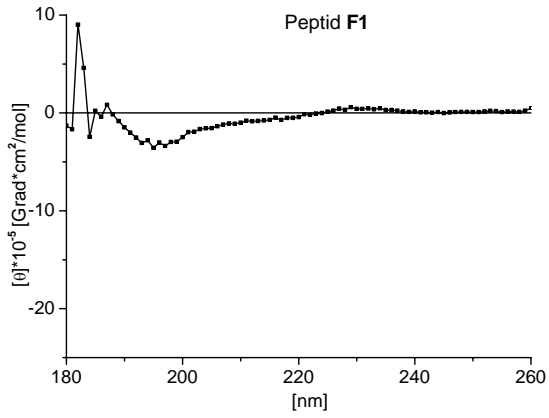


Abbildung 46: CD-Spektren und Bestimmung der Sekundärstrukturanteile der Peptide F1-F4 durch verschiedene Auswertungsmodulare des Programms CDPro.

Es zeigte sich, dass die Peptide **F1-F4** alle eine ähnliche Sekundärstruktur aufweisen. Zu ca. 30 % bestehen sie aus Zufallsknäuel und zu ca. 40 % aus β -Faltblatt. Weitere 20 % macht noch der β -turn aus, wohingegen auf die α -Helix kaum prozentuale Anteile entfallen. Bei Peptid **F3** zeigte das Programm CDSSTR mit dem Datensatz SP43 etwas abweichende Ergebnisse, da hier die β -Faltblatt Anteile nur ca. 20 % betragen, während die Zufallsknäuel Anteile auf fast 50 % steigen.

Trotz der der relativ kurzen Sequenz von 18 Aminosäuren scheinen die Peptide einen hohen Grad an geordneter Struktur aufzuweisen, der verglichen mit den Ergebnissen der CD-Messung von Peptid **A1** (Kapitel 4.4.1), welches die gesamte Sequenz des N-Terminus beinhaltet, sehr ähnlich ist. Es ist demnach davon auszugehen, dass trotz der Verkürzung der Sequenz von 31 auf 18 Aminosäuren die Sekundärstrukturanteile erhalten bleiben.

4.10.2. SPR-Bindungsstudien

Die Peptide **F1-F4** wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Peptide **D1** und **D2** (Kapitel 4.9.2) an einem Biacore 3000 in einem HBS-EP-Puffer auf ihre Bindung zum GP120 hin untersucht.

Es wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen (100, 60, 30, 10, 5, 2 μ M) vermessen. Zu Beginn wurde die Bindung des Peptids **F1**, welches keine Sulfotyrosine enthält, zum GP120 hin untersucht (Abbildung 47). Die SPR-Messungen zeigten jedoch unter den gewählten Messbedingungen unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und dem GP120.

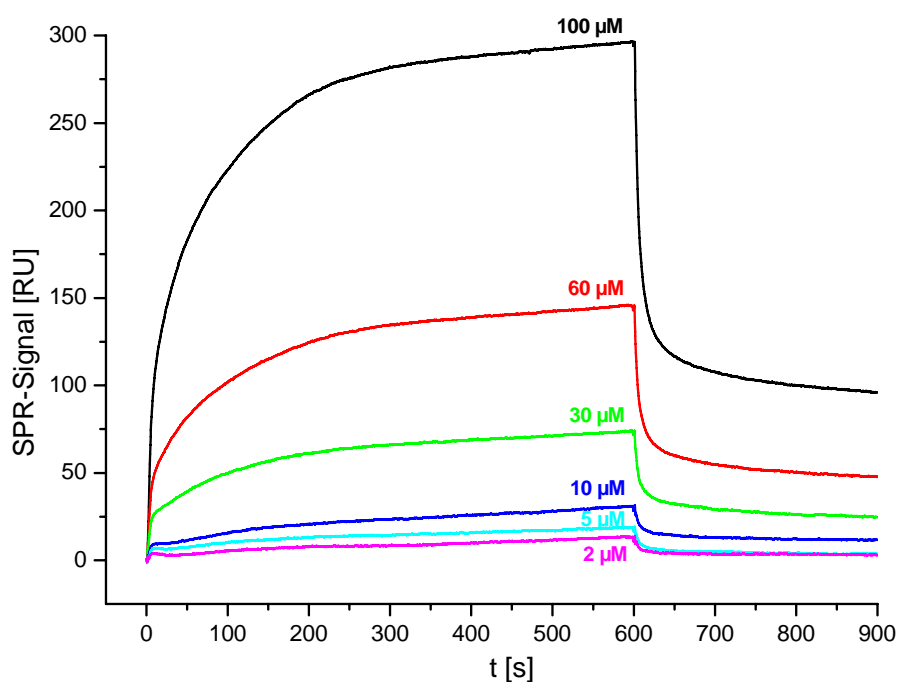


Abbildung 47: SPR-Bindungskurven der Verdünnungsreihe des Peptids F1.

Das Peptid **F1** zeigte beim *fit* in einem *one-site binding* Modell (Abbildung 48) über den gesamten Konzentrationsbereich einen nicht bestimmbar K_D -Wert, da die Kurve keinem Sättigungswert zustrebt. Ab einer Konzentration größer $5 \mu\text{M}$ scheint es zu unspezifischer Bindung zu kommen, die durch Aggregation des Peptids bei höheren Konzentrationen erklärt werden könnte. Dafür sprechen auch die sehr hohen RU-Antworten von bis zu 300 RU bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$. Die theoretisch maximale RU-Antwort des Peptids **F1** dürfte bei der durch CD4 bestimmten Aktivität nur bei 60 RU liegen. Daher wurde noch eine weitere Auswertung vorgenommen, in der nur die Konzentrationen bis $5 \mu\text{M}$ berücksichtigt wurden. Der K_D -Wert lag demnach bei $4 \mu\text{M}$.

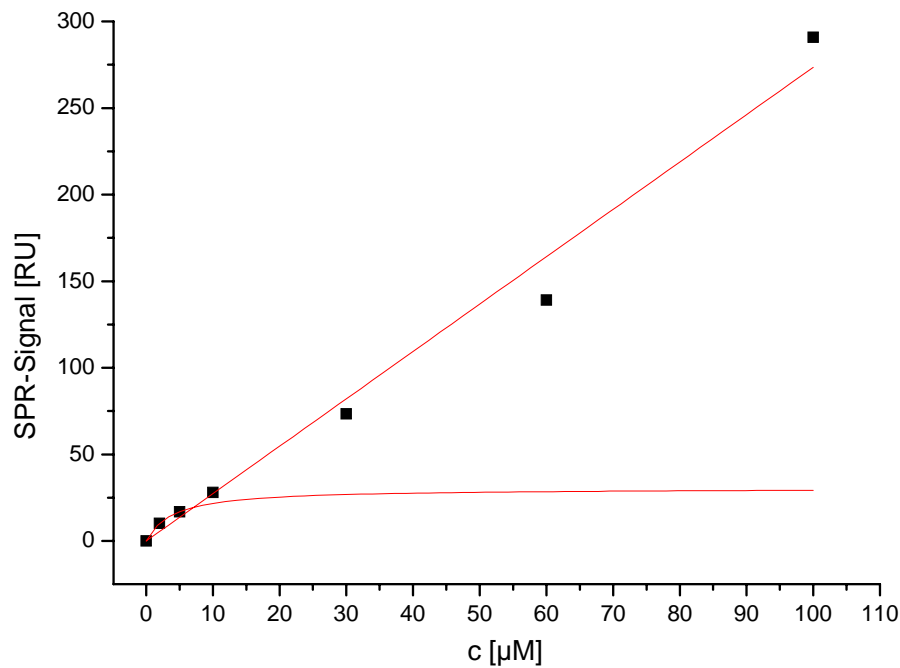


Abbildung 48: Ermittlung des K_D -Wertes von Peptid **F1** über das *one-site binding* Modell. Aufgetragen ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Peptid-Konzentration.

Das Peptid **F2** zeigte unter gleichen Messbedingungen wie bei Peptid **F1** einen vollständig anderen Kurvenverlauf (Abbildung 49). Die Bindungskurven geben hier am Anfang negative RU-Antworten wie bei Peptid **D1** (Kapitel 4.9.2) bevor ein fast linearer Anstieg der RU-Antwort erfolgt. Nach beendeter Injektion konnte so gut wie keine Dissoziation des Peptids von der Chipoberfläche beobachtet werden. Das deutet daraufhin, dass eine irreversible Bindung des Peptids an das GP120 vorlag. Die Ursache für die unterschiedlichen Kurvenverläufe von Peptid **F1** und **F2** ist erneut auf die Sulfatgruppen (Tyr-3 und Tyr-14) bei Peptid **F2** zurückzuführen (Kapitel 4.9.2).

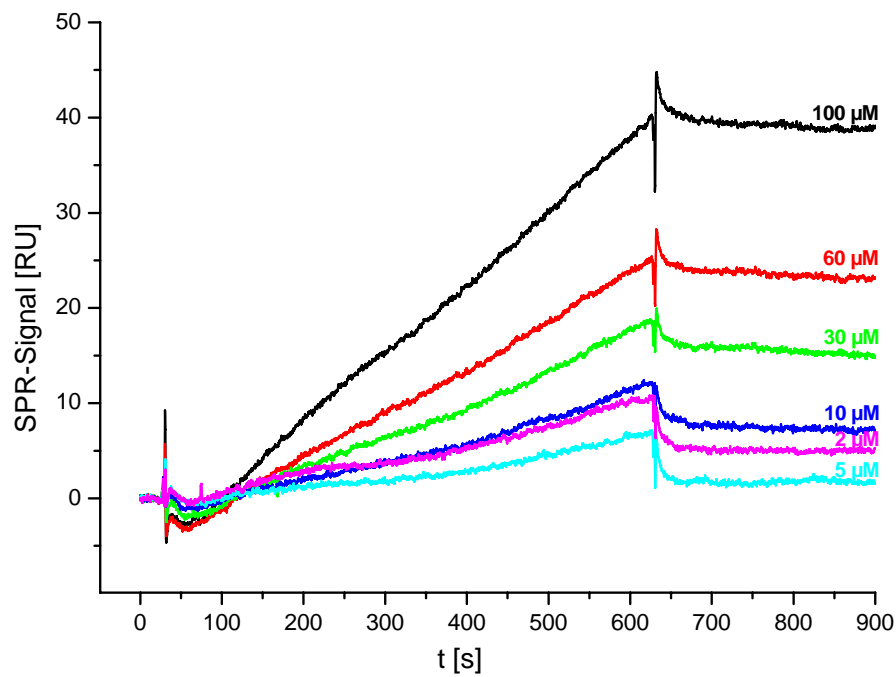


Abbildung 49: SPR-Bindungskurven der Verdünnungsreihe des Peptids F2.

Es konnte trotzdem eine Konzentrationsabhängigkeit im Bereich der ersten 100 s beobachtet werden, so dass auch hier für die Auswertung über das *one-site binding* Modell nicht RU_{\max} sondern RU_{\min} bestimmt wurde (Abbildung 50), da für die Bestimmung des K_D -Wertes nur die Konzentrationsabhängigkeit wichtig ist.

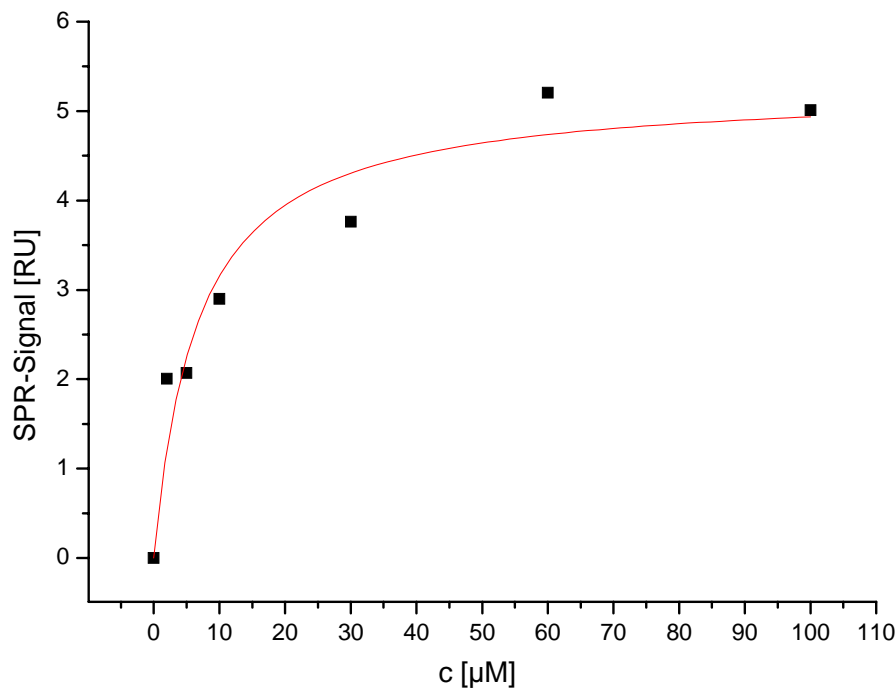


Abbildung 50: Ermittlung des K_D -Wertes von Peptid **F2** über das *one-site binding* Modell. Aufgetragen ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Peptid-Konzentration.

Für das Peptid **F2** konnte mit dem *fit* in einem *one-site binding* Modell ein K_D -Wert von $7 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Hierbei wurde über den gesamten Messbereich bis $100 \mu\text{M}$ ausgewertet.

Die Bindungskurven der Peptide **F3** und **F4** zeigten mit Peptid **F2** vergleichbare Kurvenverläufe. Diese wurden daher entsprechend ausgewertet. Der lineare Anstieg der Kurve bei den Peptiden mit Sulfotyrosinen scheint mit der Anzahl an Sulfotyrosinen zu korrelieren. Er ist umso stärker, je mehr Sulfotyrosine im Peptid vorhanden sind. Aus welchem Grund die Sulfotyrosine diesen Anstieg bewirken, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht genau geklärt werden. Es wird aber vermutet, dass ionische Wechselwirkungen zwischen Sulfatgruppe bzw. Hydrathülle und Protein die Ursache dafür sind.

Eine Auflistung der bestimmten K_D -Werte der Peptide **F1-F4** findet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Ergebnisse der SPR-Studien der Peptide F1 bis F4.

	K_D [μ M]	Chi^2	Messbereich [μ M]
F1	4	0.0	0-5
F2	7	0.3	0-100
F3	16	0.4	0-100
F4	66	0.9	0-100

Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten von Peptid **F1** mit den Peptiden **F2-F4** ist schwierig, da das Peptid **F1** ab einer Konzentration von 10 μ M eine unspezifische Bindung zeigt und daher über einen anderen Messbereich ausgewertet wurde. Die Peptide **F2-F4** zeigen keine unspezifische Bindung. Hier könnte man deshalb unterschiedliche Bindungsmodi annehmen.

Es wurde vermutet, dass die Sulfatgruppen an den Tyrosinen zur Bindung des Peptids **F2** an das GP120 beitragen und damit die Dissoziationskonstante erniedrigen müssten (vgl. Kapitel 4.9.2). Dieser Effekt kann nicht beobachtet werden. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Anzahl an Sulfotyrosinen im Peptid der K_D -Wert steigt. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür liegt in der Methode der Auswertung. Da die Bindungskurven der Peptide mit Sulfotyrosinen erst negative RU-Werte aufweisen und dann einen linearen Anstieg zeigen, der wahrscheinlich auf unspezifische ionische Wechselwirkungen zurückzuführen ist, kann die Methode der Auswertung hier insofern in Frage gestellt werden.

4.10.3. SPR-Bindungsstudien mit Zellen

Mit Hilfe der SPR-Bindungsstudien mit Zellen wurden erste Versuche zur Inhibition der GP120-CCR5-Wechselwirkung gemacht. Dafür wurden CCR5-überexprimierende vitale HOS-Zellen (*human osteo sarcoma*, HI5-Zellen) eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten HOS-Zellen ohne CCR5-Corezeptor (Parentalzellen).

Die SPR-Bindungsstudien wurden an einem Biacore J in einem PBS-Puffer durchgeführt. Für die Messungen wurde ein CM5-Goldchip verwendet, der mit 2694 RU (22.5 fmol) GP120 (SF162) belegt wurde. Die Aktivität des GP120 wurde durch ein lösliches, in CHO-Zellen exprimiertes CD4-Konstrukt bestimmt. Dieses wurde in einer Konzentration von 1 μ M über den Chip geleitet (*low flow*, Kontaktzeit 360 s) und die Kurve extrapoliert. Aus der Extrapolation der Bindungskurve ergab sich eine Aktivität von 42 % des immobilisierten GP120 (9.4 fmol aktives GP120).

Die Zellkulturen bestehend aus Osteosarkoma HI5- bzw. Parentalzellen wurden bei 37 °C in Wachstumsmedium kultiviert. Nach Abernten und Waschen der Zellen wurde deren Vitalitätsrate durch Auszählung der mit Trypanblau angefärbten Zellen auf ca. 90 % bestimmt. Auf Basis der Zellanzahlbestimmungen wurde eine Konzentration der Zellkulturen von 400 Zellen pro μL präpariert, mit denen die Messungen erfolgten.

Zu Beginn wurden 180 μl der Zellsuspension bei einer Flußrate von 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Die HI5-Zellen zeigten eine eindeutige Bindung an das auf dem Chip immobilisierte GP120. Zur Regeneration wurde nach jeder Messung 30 μL einer 0.0025 %igen Natriumdodecylsulfat-Lösung mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Zelle geleitet.

In weiteren Experimenten wurden Konzentrationen der Peptide **F2** bzw. **F4** von 400 μM in der Zellsuspension hergestellt, um eine mögliche Inhibition der GP120-CCR5-Wechselwirkung beobachten zu können. Dabei sollten die Peptid die Bindungsstelle des GP120 auf der Chipoberfläche blockieren, so dass keine Bindung des CCR5 zum GP120 mehr stattfinden könnte. Die Bindungskurven dieser SPR-Experimente ließen allerdings noch keine eindeutigen Aussagen über mögliche Inhibitionseffekte zu. Aufgrund der geringen Menge an Peptid, die für diese Experimente noch zur Verfügung stand, konnte deshalb keine weitere Auswertung erfolgen.

4.10.4. STD-NMR-Experimente

Die STD-NMR-Experimente wurden bei 285 K an einem 700 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Peptide **F2** und **F4** wurden in Tris- D_2O -Puffer als Liganden gegen GP120 (SF162) in einem Shigemi-Röhrchen vermessen. Es wurde hier das Isolat SF162 verwendet, da sich nach einer Sequenzanalyse der Isolate Bal und SF162 (*HIV Sequence Database*) zeigte, dass das Isolat SF162 das hochkonservierte GPGRAF-Motiv der V3-Loop beinhaltet, während das Isolat Bal in diesem Bereich Substitutionsmuster aufweist.¹⁷¹ Die Vergleichbarkeit der STD-Ergebnisse der Peptide **D1**, **D2** und **F1-F4** untereinander scheint auch gewährleistet zu sein, da vorherige SPR-Messungen der Peptide vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Isolate (Bal bzw. SF162) zeigten. Für jedes Peptid wurde sowohl ein *epitope mapping* als auch Titrationsexperimente zur Bestimmung von Affinitätskonstanten durchgeführt.

Epitope mapping Peptid **F2** und **F4**

Es wurden 1D-¹H-STD-NMR-Spektren für das *epitope mapping* mit einer Konzentration von 333 µM für das Peptid **F2** bzw. 500 µM für das Peptid **F4** (100facher Überschuss bezogen auf die Protein-Konzentration) aufgenommen.

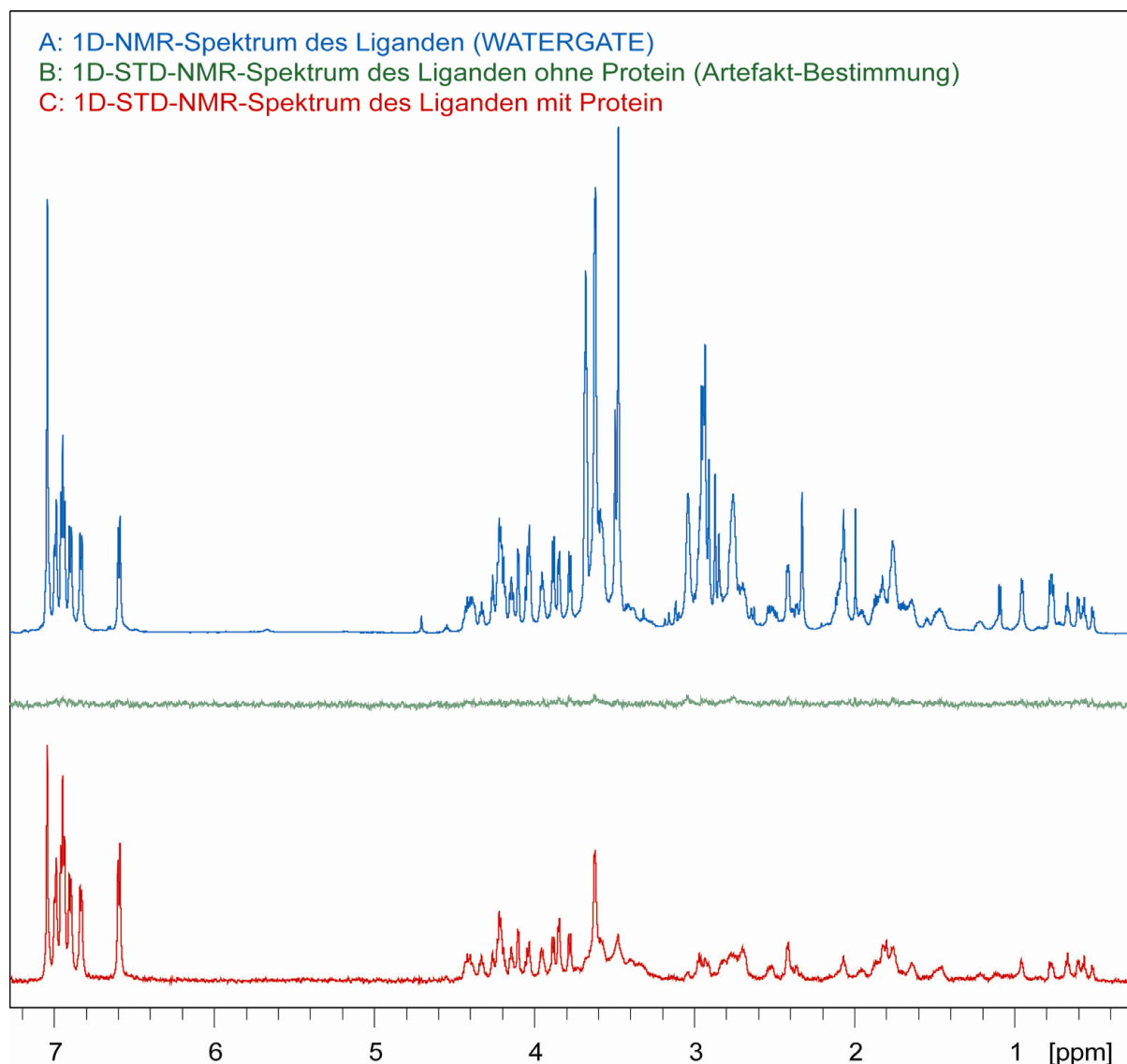


Abbildung 51: Vergleich des NMR-Spektrums des Peptids **F4 mit WATERGATE-Wasserunterdrückung (oben) und des STD-NMR-Spektrums ohne Protein mit dem STD-NMR-Spektrum mit Protein.**

Es konnten in den gesamten Peptiden STD-aktive Gruppen identifiziert werden. Beispielhaft ist dies anhand von Peptid **F4** in Abbildung 51 zu sehen. Besonders große STD-Effekte zeigen die Aromaten von Tyr-10, Tyr-14 und Tyr-15 und weitere Protonen in diesen Bereichen der Peptide. Daher wird hier ein wesentlicher Teil des Bindungsepitops vermutet. In Abbildung 52 sind die Ergebnisse des *epitope mappings* der Peptide **F2** und **F4** dargestellt.

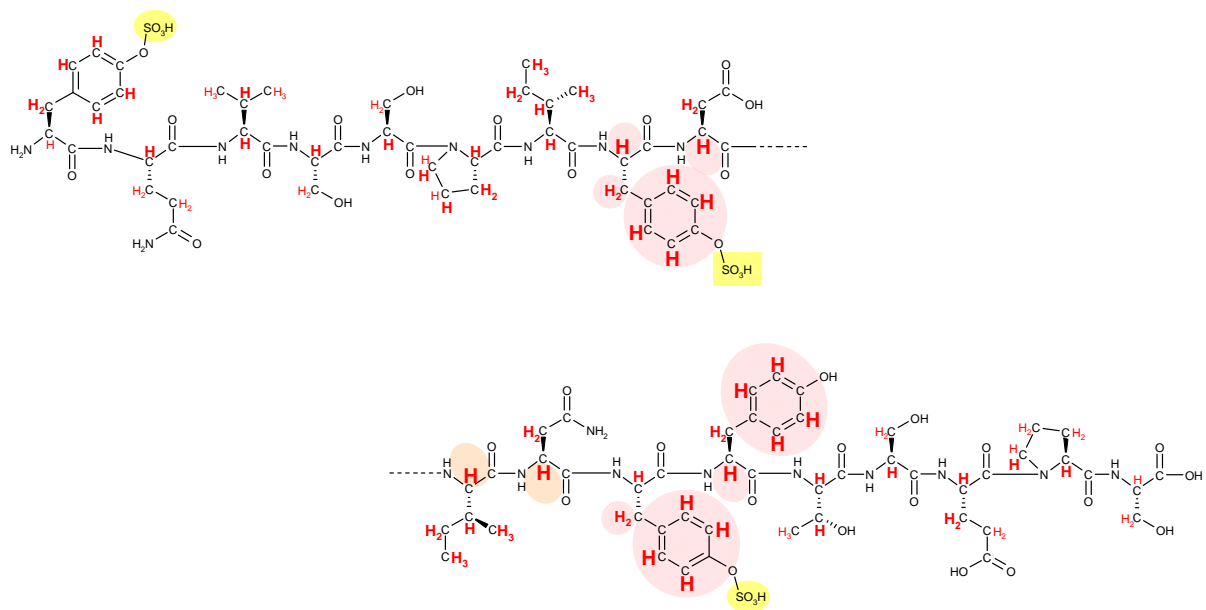


Abbildung 52: Epitope mapping der Peptide F2 und F4 gegen GP120 (SF162) per STD-NMR. Protonen, die einen STD-Effekt zeigen, sind rot markiert und der Größe nach in drei Kategorien (schwach, mittel, stark) eingeteilt. Der rötliche Hintergrund deutet den wesentlichen Teil des Bindungsepitops an, wobei die $H\alpha$ -Protonen an Ile-12 und Asn-13 nur bei F2 sehr starke STD-Effekte zeigten. Die Sulfatgruppen sind gelb hinterlegt. Die Sulfatgruppe an Tyr-10 ist nur in Peptid F4 vorhanden (gelber Kasten).

Verglichen mit dem Bindungsepitop der Peptide **D1** bzw. **D2** sind hier deutliche Gemeinsamkeiten zu erkennen. Es scheinen die gleichen Bereiche an der Bindung beteiligt zu sein. Der Wechsel von GP120 (Bal) auf GP120 (SF162) scheint keine wesentliche Änderung des Bindungsepitops zu bewirken.

Titration Peptid F2

Es wurden mehrere 1D- 1H -STD-Spektren mit unterschiedlichen Ligandkonzentrationen (5-100facher Überschuss bezogen auf die Protein-Konzentration von 3.3 μM) aufgenommen, um die Dissoziationskonstanten der Protonen im Peptid zu bestimmen. Die Ligandkonzentration wurde von Messung zu Messung erhöht. Es wurden für jede Messung nur die STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen bestimmt, die im *epitope mapping* den stärksten STD-Effekt zeigten. Die ermittelten Datenpunkte wurden nach einem *one-site binding* Modell gefittet (Abbildung 53).

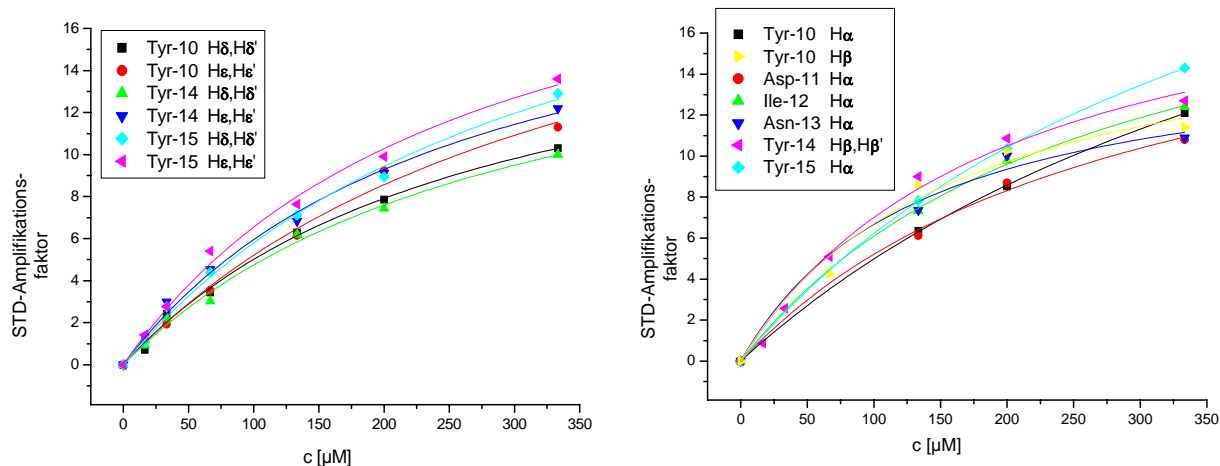


Abbildung 53: STD-Titration von Peptid F2. Für die Bestimmung der K_D -Werte individueller Protonen wurden die Datenpunkte über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Die ermittelten K_D -Werte reichen von 135 μM (Asn-13 $\text{H}\alpha$ -Proton) bis 523 μM (Tyr-10 $\text{H}\alpha$ -Proton). Die K_D -Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: K_D -Werte individueller Protonen von Peptid F2. Die Datenpunkte wurden über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	276
Tyr-10 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	364
Tyr-14 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	299
Tyr-14 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	256
Tyr-15 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	342
Tyr-15 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	266

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\alpha$	523
Tyr-10 $\text{H}\beta$	163
Asp-11 $\text{H}\alpha$	296
Ile-12 $\text{H}\alpha$	270
Asn-13 $\text{H}\alpha$	135
Tyr-14 $\text{H}\beta, \text{H}\beta'$	199
Tyr-15 $\text{H}\alpha$	415

Im Unterschied zu dem durch SPR-Experimente ermittelten K_D -Wert von 7 μM liegt der kleinste über STD-NMR bestimmte K_D -Wert um Faktor 19 höher. Der K_D -Wert der SPR-Experimente wurde aus den negativen RU_{\min} Werten ermittelt, so dass die ermittelte Dissoziationskonstante eher ungenau ist. Außerdem wurde bei den SPR-Experimenten GP120 (Bal) und bei den STD-Experimenten GP120 (SF162) verwendet, was eventuell doch zu Abweichungen führen kann, ohne dass diese in den SPR-Bindungsstudien detektiert werden konnten.

Titration Peptid F4

Es wurden mehrere 1D- ^1H -STD-Spektren mit unterschiedlichen Ligandkonzentrationen (5-100facher Überschuss bezogen auf die Protein-Konzentration von 5 μM) aufgenommen. Die Ligandkonzentration wurde von Messung zu Messung erhöht. Wieder wurden für jede Messung nur die STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen bestimmt, die im *epitope mapping* den stärksten STD-Effekt zeigten. Die ermittelten Datenpunkte wurden nach einem *one-site binding* Modell gefittet (Abbildung 54).

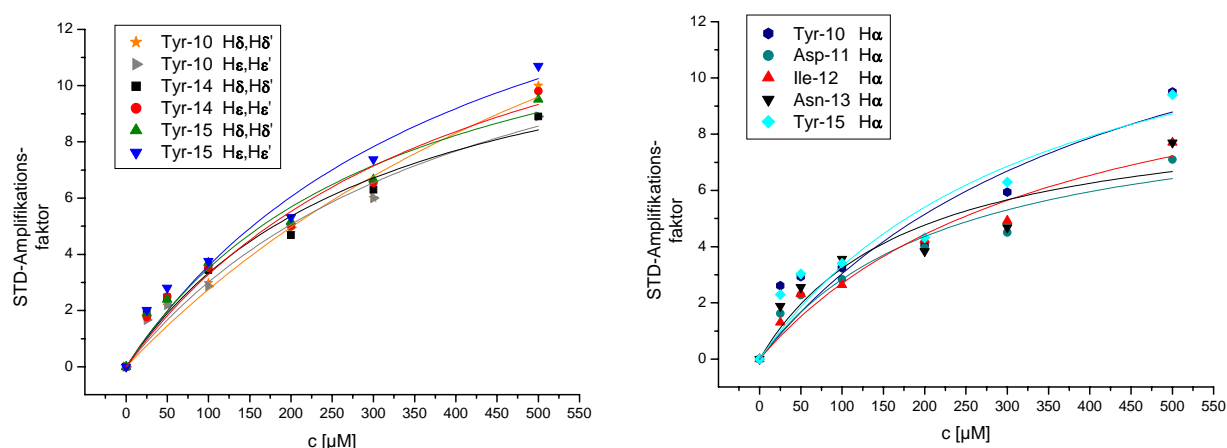


Abbildung 54: STD-Titration von Peptid F4. Für die Bestimmung der K_D -Werte individueller Protonen wurden die Datenpunkte über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Es konnten K_D -Werte von 181 μM (Asn-13 $\text{H}\alpha$ -Proton) bis 825 μM (Tyr-10 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$ -Protonen) bestimmt werden. Die K_D -Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: K_D -Werte individueller Protonen von Peptid F4. Die Datenpunkte wurden über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	825
Tyr-10 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	427
Tyr-14 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	310
Tyr-14 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	426
Tyr-15 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	327
Tyr-15 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	431

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\alpha$	447
Asp-11 $\text{H}\alpha$	230
Ile-12 $\text{H}\alpha$	361
Asn-13 $\text{H}\alpha$	181
Tyr-15 $\text{H}\alpha$	347

Wie in Abbildung 54 zu sehen ist, kommt es ab einer Ligandkonzentration größer $100\ \mu\text{M}$ teilweise zu einer unspezifischen Bindung, da die Messpunkte in diesem Bereich überproportional ansteigen und dadurch der *fit* des *one-site binding* Modells nicht gut angepasst ist. Dies könnte durch Aggregation verursacht werden. Die Dissoziationskonstanten wurden daher noch einmal aus den Titrationspunkten bis $100\ \mu\text{M}$ errechnet (Abbildung 55).

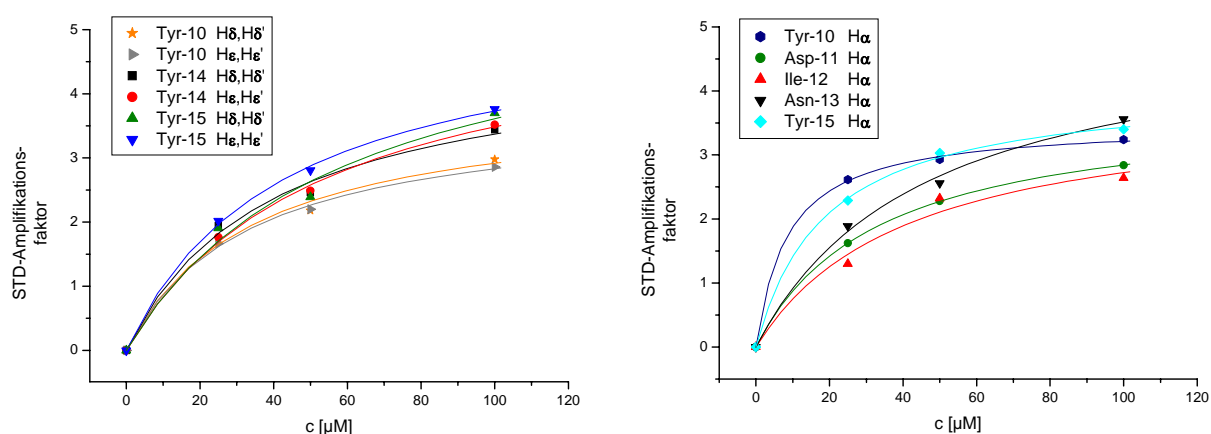


Abbildung 55: Ausschnitt der STD-Titration von Peptid F4 in einem Konzentrationsbereich bis $100\ \mu\text{M}$. Der *fit* über das *one-site binding* Modell passt sich den Datenpunkten besser an als über den gesamten Konzentrationsbereich bis $500\ \mu\text{M}$.

Es konnten K_D -Werte von $9\ \mu\text{M}$ (Tyr-10 $\text{H}\alpha$ -Proton) bis $58\ \mu\text{M}$ (Tyr-15 $\text{H}\delta,\text{H}\delta'$ -Protonen) bestimmt werden. Die im Konzentrationsbereich bis $100\ \mu\text{M}$ ermittelten K_D -Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: K_D -Werte individueller Protonen von Peptid F4. Die Datenpunkte wurden über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\delta,\text{H}\delta'$	34
Tyr-10 $\text{H}\epsilon,\text{H}\epsilon'$	33
Tyr-14 $\text{H}\delta,\text{H}\delta'$	39
Tyr-14 $\text{H}\epsilon,\text{H}\epsilon'$	54
Tyr-15 $\text{H}\delta,\text{H}\delta'$	58
Tyr-15 $\text{H}\epsilon,\text{H}\epsilon'$	42

Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\alpha$	9
Asp-11 $\text{H}\alpha$	33
Ile-12 $\text{H}\alpha$	41
Asn-13 $\text{H}\alpha$	46
Tyr-15 $\text{H}\alpha$	19

Verglichen mit den K_D -Werten von Peptid F4, die über den gesamten Konzentrationsbereich bestimmt wurden, sind diese K_D -Werte ca. um den Faktor zehn kleiner. In Bezug auf den K_D -

Wert aus den SPR-Ergebnissen von $K_D = 66 \mu\text{M}$ ist der kleinste durch STD-NMR ermittelte K_D -Wert um den Faktor sieben kleiner.

Abschließend wurde noch untersucht, ob eine äquimolare Menge CD4 in der Probenlösung einen Einfluss auf die Dissoziationskonstante bzw. das *epitope mapping* von Peptid **F4** hat. Da die Bindung des GP120 an das CD4 erst die Bindungsstelle für das CCR5 freilegt,^{37;44-46} wurde bei diesem Versuch mit einer Verringerung der K_D -Werte bzw. mit einer Veränderung des Bindungsepitops gerechnet. Es wurden wieder mehrere $1\text{D-}^1\text{H-STD}$ -Spektren mit unterschiedlichen Ligandkonzentrationen (5-100facher Überschuss bezogen auf die Proteinkonzentration von $3.3 \mu\text{M}$) aufgenommen, wobei die Ligandkonzentration von Messung zu Messung erhöht wurde. Da das Epitop mit CD4 in der Probenlösung dem Epitop ohne CD4 vergleichbar war, wurden die STD-Amplifikationsfaktoren der gleichen Protonen wie vorher bestimmt. Die ermittelten Datenpunkte wurden nach einem *one-site binding* Modell gefittet (Abbildung 56).

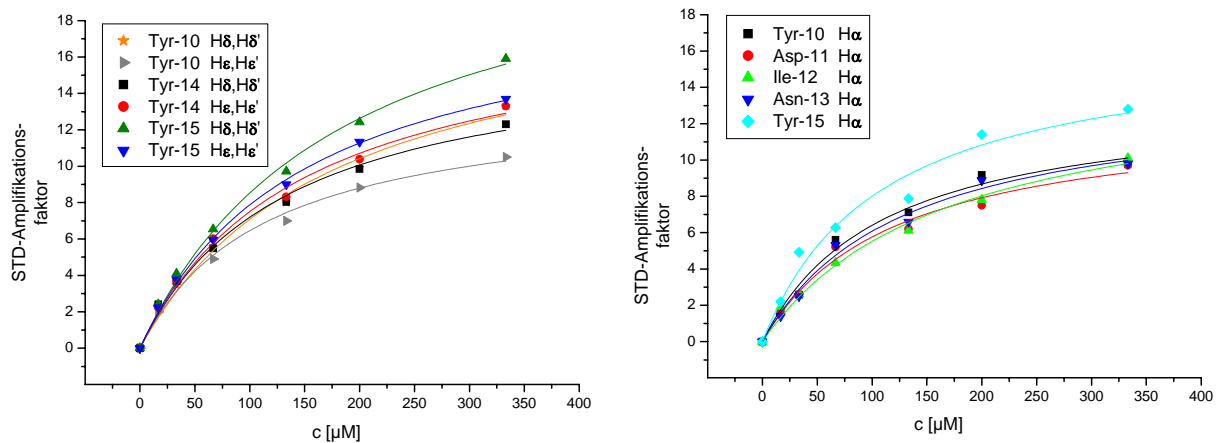


Abbildung 56: STD-Titration von Peptid **F4**. In der Probenlösung waren äquimolare Mengen GP120 (SF162) und CD4. Für die Bestimmung der K_D -Werte individueller Protonen wurden die Datenpunkte über den gesamten Konzentrationsbereich mit einem *one-site binding* Modell gefittet.

Wie aus den Titrationskurven zu sehen ist, kommt es hier nicht zu einer unspezifischen Wechselwirkung ab einer Konzentration größer 100 μM , wie es bei den gleichen Messungen ohne CD4 der Fall war. Daher wurde der K_D -Wert aus dem *fit* über den gesamten Konzentrationsbereich bestimmt. Es konnten K_D -Werte von 108 μM (Tyr-15 $\text{H}\alpha$ -Proton) bis 183 μM (Tyr-15 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$ -Protonen) bestimmt werden. Die K_D -Werte für die betrachteten Protonen sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: K_D -Werte individueller Protonen von Peptid F4 mit äquimolaren Mengen GP120 (SF162) und CD4 in der Probenlösung. Die Datenpunkte wurden über ein *one-site binding* Modell gefittet.

Proton	K_D -Werte [μM]	Proton	K_D -Werte [μM]
Tyr-10 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	177	Tyr-10 $\text{H}\alpha$	110
Tyr-10 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	113	Asp-11 $\text{H}\alpha$	119
Tyr-14 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	132	Ile-12 $\text{H}\alpha$	166
Tyr-14 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	148	Asn-13 $\text{H}\alpha$	126
Tyr-15 $\text{H}\delta, \text{H}\delta'$	183	Tyr-15 $\text{H}\alpha$	108
Tyr-15 $\text{H}\epsilon, \text{H}\epsilon'$	151		

Der kleinste K_D -Wert ist damit im Vergleich zu dem K_D -Wert der Messungen ohne CD4 ($K_D = 9 \mu\text{M}$ für das Tyr-10 $\text{H}\alpha$ -Proton, Konzentrationsbereich bis 100 μM) um den Faktor zehn schlechter. Durch die Zugabe von CD4 tritt jedoch im gesamten vermessenen Konzentrationsbereich im Unterschied zu der Messung ohne CD4 keine unspezifische Bindung mehr auf. Über die Ursachen für den schlechteren K_D -Wert kann allerdings nur spekuliert werden. Eine Ursache könnte sein, dass der trimolekulare Komplex aus CD4, GP120 und Peptid **F4** entropisch ungünstiger ist als der bimolekulare Komplex aus GP120 und Peptid **F4**. Man könnte auch diskutieren, dass durch die Bindung des CD4 an das GP120 die V3-Loop exponiert wird, die dadurch eine größere Flexibilität als vorher aufweist. Das Peptid **F4** kann in diesem Fall nur durch einen *induced fit* binden, wodurch der K_D -Wert schlechter wird. Würde man kein Peptid sondern das gesamte CCR5 als Bindungspartner betrachten, so würde die exponierte V3-Loop wahrscheinlich trotzdem günstiger für die Bindung sein, da vermutlich auch andere Teile des GP120 an der Bindung beteiligt sind.

4.11. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sulfatierte Peptide aus dem Bereich des N-Terminus des CCR5 an das GP120 des HIV-1 binden. Der nächste logische Schritt auf der Suche nach einer Leitstruktur für einen *Entry*-Inhibitor dieser Wechselwirkung wäre die Aufnahme von *trNOE*-Aufbaureihen des Peptids **F4**, die Aussagen über die bioaktive Konformation dieses Liganden machen können. Mit Hilfe dieser Daten kann anschließend durch *molecular modeling* eine dreidimensionale Struktur berechnet werden. Anhand der ermittelten dreidimensionalen Struktur des Peptids **F4** und der durch STD-NMR ermittelten Bindungsepitopanteile kann eine umfassende Aussage über die räumlichen Vorgaben für eine Leitstruktur gemacht werden. Auf Basis dieser Leitstruktur können peptidomimetische Liganden mit *Entry*-inhibitorischen Fähigkeiten entwickelt werden.

Die Weiterentwicklung der Inhibitionsversuche der GP120-CCR5-Wechselwirkung auf SPR-Basis mit Osteosarkoma HI5-Zellen könnte zum Testen dieser Substanzen hilfreich sein.

5. Zusammenfassung

Bei der Infektion einer Zelle mit dem HIV-1 bindet das virale Glycoprotein GP120 unter Ausbildung eines trimolekularen Komplexes an die Membranrezeptoren CD4 und CCR5. Bei der Bindung des CCR5-Rezeptors spielt der mehrere Sulfotyrosine enthaltende N-Terminus eine wichtige Rolle.^{43,46;47}

		5	10	15	20	25	30																											
N-Terminus	H ₂ N -	M	D	Y	Q	V	S	S	P	I	Y	D	I	N	Y	Y	T	S	E	P	C	Q	K	I	N	V	K	Q	I	A	A	R	- Protein	
Peptid F4	H ₂ N -																																	- COOH

Abbildung 57: Aminosäuresequenz des N-Terminus des CCR5-Rezeptors und beispielhaft des Peptids F4. C20 wurde in den entsprechenden Peptiden durch A oder S substituiert (blau). Die Sulfotyrosine sind rot hervorgehoben.

Im Laufe dieser Arbeit wurden zahlreiche Peptide aus dem Bereich des CCR5 N-Terminus auf dem Wege der Festphasenpeptidsynthese dargestellt und durch RP-HPLC aufgereinigt. Die Charakterisierung dieser Peptide gelang durch MALDI-TOF- bzw. ESI-MS sowie durch NMR-Spektroskopie. Informationen über die Sekundärstrukturanteile ausgewählter Peptide konnten weiterhin durch CD-Spektroskopie gesammelt werden. Dabei zeigte sich, dass alle vermessenen Peptide eine ähnliche Sekundärstruktur mit einem hohen Anteil an β -Faltblatt aufwiesen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Substitutionen von Aminosäuren und Sequenzverkürzungen bei Peptiden aus dem Bereich des CCR5 N-Terminus im Hinblick auf Löslicheigenschaften untersucht. Dafür wurde zu Beginn das Peptid **A1s** mit einer Länge von 31 AS entsprechend des N-Terminus des CCR5 synthetisiert. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass dieses Peptid gut löslich war, allerdings Aggregate bildete und daher nicht für Bindungsstudien eingesetzt werden konnte.

Mit vorher optimierten Bedingungen für die Festphasenpeptidsynthese wurden weitere 16 Peptide (**A1-A16**) basierend auf dieser Sequenz mit einer Länge von 31 AS dargestellt, die an unterschiedlichen Positionen (Y3, V5, Y10, Y14, Y15, C20, Q21, I23, V25, Q27, I28) durch S, D, E oder F substituiert wurden. Löslichkeitsversuche der Peptide zeigten, dass der Bereich um I23, V25 und I28 ausschlaggebend für die schlechte Löslichkeit ist. Die Peptide wurden mittels SPR auf ihre Bindung zum GP120 hin untersucht, wobei alle eine Bindung an das GP120 zeigten. Die ermittelten K_D -Werte lagen dabei im Bereich zwischen 3 und 2500 μ M.

Um den Einfluss von Sequenzverkürzungen auf die Löslichkeit der Peptide untersuchen zu können, wurden weiterhin die Peptide **C1-C6** mit unterschiedlichen AS-Sequenzlängen dargestellt. Verkürzungen wurden im Hinblick auf den CCR5 N-Terminus sowohl N-terminal als auch C-terminal vorgenommen, um den Effekt auf die Löslichkeit des jeweiligen Peptids bestimmen zu können. Der daraus abgeleitete optimale AS-Sequenzabschnitt von Y3 bis S20 für weitere Peptidsynthesen beinhaltet alle vier Tyrosine des CCR5 N-Terminus.

Im zweiten Teil der Arbeit gelang es Peptide mit Sulfotyrosinen darzustellen. Dafür wurde zunächst ein Fmoc-geschützter Sulfotyrosin-Baustein synthetisiert und anschließend eine Methode für die Festphasenpeptidsynthese mit diesem Baustein entwickelt.

Die Synthese des Fmoc-geschützten Tyrosins erfolgte ausgehend vom Tyrosin mit Fmoc-Succinimid. Anschließend wurde die phenolische Hydroxylgruppe mit einem $\text{SO}_3\cdot\text{DMF}$ -Addukt sulfatiert. Bei der NMR-spektroskopischen Charakterisierung konnte die eingeführte Sulfatgruppe indirekt über die Veränderungen der chemischen Verschiebung der ^1H - als auch der ^{13}C -Signale nachgewiesen werden.

Aufgrund der säurelabilen Sulfatgruppe ist die Festphasenpeptidsynthese von Peptiden mit Sulfotyrosinen bedeutend aufwendiger. Als feste Phase wurde ein 2-Chlortrityl-Polystyrolharz eingesetzt, von dem die Peptide schonend mit HFIP/DCM (30min bei 25 °C) abgespalten werden konnten. Als Kupplungsreagenzien für die Sulfotyrosine wurden HOBt und DIPCDI und für alle anderen Aminosäuren PyBob und NMM verwendet. Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde bei 0 °C in 90 % aq. TFA für 5 -7 h durchgeführt. Für die Aufreinigung über RP-HPLC wurden Laufmittelgemische ohne TFA-Zusatz gewählt, um eine Desulfatierung zu verhindern. Weiterhin wurden verschiedene Verfahren des *cappings* untersucht, um dabei die säurelabile Sulfatgruppe am Tyrosin zu erhalten. Die besten Ergebnisse wurden hier mit einer Mischung aus Ac_2O /Pyridin/DMF (1:1:38) erzielt. Eine Charakterisierung der sulfatierten Peptide mit MALDI-TOF-MS war nicht möglich. Letztendlich gelang die eindeutige massenspektroskopische Charakterisierung aller sulfatierten Peptide nur durch ESI-MS im *negative ion mode*.

SPR-Experimente mit den sulfatierten Peptiden zeigten im Gegensatz zu den unsulfatierten Peptiden negative Bindungskurven. Die Auswertung der SPR-Experimente erwies sich aufgrund der außergewöhnlichen Kurvenverläufe als schwierig. Eindeutige Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss der Sulfatierung konnten allerdings durch STD-NMR-Studien erhalten werden.

Es wurde das Peptid **D1** mit einem Sulfotyrosin und das Peptid **D2** ohne Sulfotyrosin hergestellt (AS-Sequenz: N13 bis K22). Das Peptid **D2** zeigte in SPR-Bindungsstudien eine

Dissoziationskonstante von $K_D = 14 \mu\text{M}$, die ca. um den Faktor zwei kleiner als die des Peptids **D1** mit $K_D = 35 \mu\text{M}$ war. Dieses Ergebnis ist aufgrund der ungewöhnlichen Bindungskurven kritisch zu betrachten. Das durch STD-NMR ermittelte Bindungsepitop zeigte, dass vor allem die Aromaten von Y14 und Y15 bei beiden Peptiden wesentlich an der Bindung beteiligt sind. Aus den STD-NMR Untersuchungen ergaben sich die stärksten Affinitäten einzelner Protonen von Peptid **D2** zu $K_D = 3 \text{ mM}$ und Peptid **D1** zu $K_D = 1 \text{ mM}$. Die Sulfatgruppe an Y14 verbessert damit die Bindungsaffinität zum GP120 um Faktor drei. Weiterhin konnten die Peptide **F1-F4** (AS-Sequenz: Y3 bis S20) dargestellt werden, die bis auf Peptid **F1** statt der Tyrosine zwei oder drei Sulfotyrosine enthielten. Das Peptid **F1** zeigte in SPR-Bindungsstudien unspezifische Bindung, so dass nur in einem kleineren Konzentrationsbereich bis $5 \mu\text{M}$ eine Dissoziationskonstante von $K_D = 4 \mu\text{M}$ ermittelt werden konnte, die somit allerdings kritisch zu betrachten ist. Die sulfatierten Peptide **F2-F4** zeigten am Anfang negative RU-Antworten, bevor ein fast linearer Anstieg der Bindungskurve erfolgte. Es ergaben sich Dissoziationskonstanten für Peptid **F2** von $K_D = 7 \mu\text{M}$, für Peptid **F3** von $K_D = 16 \mu\text{M}$ und für Peptid **F4** von $K_D = 66 \mu\text{M}$. Es konnte festgestellt werden, dass mit zunehmender Anzahl an Sulfotyrosinen der K_D -Wert steigt, was eventuell auf die ungewöhnlichen Bindungskurven zurückzuführen ist. Das durch STD-NMR ermittelte Bindungsepitop zeigte, dass auch hier vor allem die Aromaten von Y10, Y14 und Y15 und weitere Protonen in diesen Bereichen wesentlich an der Bindung beteiligt sind. Aus den STD-NMR Untersuchungen ergaben sich die stärksten Affinitäten einzelner Protonen von Peptid **F2** zu $K_D = 135 \mu\text{M}$ und Peptid **F4** zu $K_D = 9 \mu\text{M}$. Es konnte damit gezeigt werden, dass die Sulfatgruppe an Y10 die Bindungsaffinität zum GP120 um mehr als eine Größenordnung verbessert.

Es gelang in der vorliegenden Arbeit erstmals, detaillierte Aussagen über die an der Bindung zum GP120 beteiligten Atomgruppen des CCR5 N-Terminus zu machen und damit das Bindungsepitop zu charakterisieren. Dabei zeigte sich bei den STD-NMR Untersuchungen, dass die Sulfatgruppen an Y10 und Y14 die Bindungsaffinität der untersuchten Peptide zum GP120 verbessern.

6. Summary

Infection of a cell with HIV-1 begins with binding of the viral glycoprotein GP120 to the membranereceptors CD4 and CCR5 forming a trimolecular complex. The N-terminus of the CCR5-receptor, containing several sulfotyrosines, plays an important role in this binding event.^{43,46;47}

		5	10	15	20	25	30																										
N-Terminus	H ₂ N -	M	D	Y	Q	V	S	S	P	I	Y	D	I	N	Y	Y	T	S	E	P	C	Q	K	I	N	V	K	Q	I	A	A	R	- Protein
Peptide F4	H ₂ N -	<u>Y</u>	Q	V	S	S	P	I	<u>Y</u>	D	I	N	<u>Y</u>	Y	T	S	E	P	S	- COOH													

Figure 58: Amino acid sequence of the N-terminus of the CCR5-receptor and of peptide F4. In all peptides in this thesis C20 was substituted by A oder S (blue). Sulfotyrosines are highlighted in red.

Numerous peptides deriving from the region of the CCR5 N-terminus were synthesized during this thesis using solid phase peptide synthesis and were purified by RP-HPLC. Characterization of these peptides was performed by MALDI-TOF- and ESI-MS respectively and NMR-spectroscopy. Information about the secondary structure of selected peptides was obtained by CD-spectroscopy. All peptides showed a similar secondary structure with a high portion of β -sheet.

In the first part of this thesis aminoacid substitutions and sequence truncation of peptides derived from the region of the CCR5 N-terminus were investigated in regard to solubility. First, peptide **A1s** was synthesized containing 31 amino acids according to the N-terminus of CCR5. It showed a good solubility in water based solutions. However NMR-spectroscopy revealed an aggregation of this peptide, so it could not be used for binding studies.

Previously optimized conditions for the solid phase peptide synthesis were the basis for the synthesis of further 16 peptides (**A1-A16**) containing 31 amino acids according to the N-terminus of CCR5. Some of the amino acids in these peptides (Y3, V5, Y10, Y14, Y15, C20, Q21, I23, V25, Q27, I28) were substituted by S, D, E or F. Solubility studies of these peptides revealed that the region containing I23, V25 and I28 is responsible for the poor solubility. SPR showed binding of all these peptides to GP120 with K_D -values from 3 to 2500 μ M.

Peptides **C1-C6**, differing in length, were synthesized to analyze the effect of the sequence truncations on solubility. Truncations were performed N-terminal and C-terminal related to

the CCR5 N-terminus. The optimal amino acid sequence for further peptide synthesis deriving from this results includes Y3 to S20 and contains all four tyrosines.

Peptides containing sulfotyrosines were synthesized in the second part of this thesis. For this purpose an Fmoc-protected sulfotyrosine building block was synthesized and a method for solid phase peptide synthesis using this building block developed.

The synthesis of the Fmoc-protected tyrosine was performed with tyrosine and Fmoc-succinimide. Subsequently the phenolic hydroxylgroup was sulfated using a $\text{SO}_3 \cdot \text{DMF}$ -adduct. The sulfate group could be detected indirectly by NMR-spectroscopy through the chemical shift of the ^1H - and ^{13}C -signals.

Because of the acid lability of the sulfate group the solid phase peptide synthesis of sulfotyrosine containing peptides is more complex. As solid phase a 2-chlorotrityl resin was used. Cleavage was performed with HFIP/DCM (30 min at 25 °C). As coupling reagents for the sulfotyrosine building block HOBt and DIPCDI were used, whereas all other amino acids were coupled with PyBob and NMM. The cleavage of the protecting groups was performed at 0 °C in 90 % aq. TFA for 5 -7 h. For the purification by RP-HPLC solvents without TFA were used to prevent desulfation.

To conserve the acid labile sulfate group during the synthesis several capping-methods were investigated. Best results were obtained with a mixture of Ac_2O /Pyridin/DMF (1:1:38). A characterization of the sulfated peptides with MALDI-TOF-MS was not possible. In the end a massspectrometric characterization was successful only with ESI-MS in negative ion mode.

SPR-experiments with the sulfated peptides, in contrast to non sulfated peptides, showed negative binding curves. The analysis of these exceptional binding curves proved to be difficult. However, clear insights into the influence of the sulfate group were provided by STD-NMR-studies.

The peptides **D1** with one sulfotyrosine and **D2** without a sulfotyrosine were synthesized (amino acid-sequence: N13 to K22). Peptide **D2** showed a K_D -value of 14 μM in SPR-studies, which was factor two smaller than that one of peptide **D1** ($K_D = 35 \mu\text{M}$). But with regard to the unusual binding curves these results must be viewed critically. The binding epitope determined by STD-NMR revealed that the aromatic protons of Y14 and Y15 are of particular importance. Affinities were obtained by STD-NMR for peptide **D2** with $K_D = 3 \text{ mM}$ and peptide **D1** with $K_D = 1 \text{ mM}$. The sulphate group at Y14 improves the binding affinity about threefold. Furthermore the peptides **F1-F4** (amino acid-sequence: Y3 to S20) were synthesized. Except peptide **F1** these peptides contained two or three sulfotyrosines instead of the tyrosines. In SPR-studies peptide **F1** showed unspecific binding to GP120. Only in the

concentration range up to 5 μM it was possible to obtain a dissociation constant of $K_D = 4 \mu\text{M}$, that must be regarded critically. At the beginning the sulfated peptides **F2-F4** showed negative binding curves followed by a linear rise during the SPR-experiments. Dissociation constants of $K_D = 7 \mu\text{M}$ for peptide **F2**, $K_D = 16 \mu\text{M}$ for peptide **F3** and $K_D = 66 \mu\text{M}$ for peptide **F4** were obtained. Thus the dissociation constant increased with an higher number of sulfotyrosines. Maybe this strange observation results from the unusual binding curves. The binding epitope obtained by STD-NMR shows that the aromatic protons of Y10, Y14, Y15 and some other protons in this region are involved particularly. Affinities were obtained by STD-NMR for peptide **F2** with $K_D = 135 \mu\text{M}$ and Peptide **F4** with $K_D = 9 \mu\text{M}$. Thus the sulphate group at Y10 improves the binding affinity to GP120 about one order of magnitude.

In this thesis detailed information about the atom groups of the CCR5 N-terminus involved in the binding to GP120 were obtained, whereby a characterization of the binding epitope of the CCR5 N-terminus was possible. STD-NMR-studies showed that the sulfate groups at Y10 and Y14 increase the binding affinity to GP120.

7. Experimenteller Teil

7.1. *Verwendete Chemikalien*

Tabelle 12: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Hersteller / Lieferant	Chemikalien
Acros	Ammoniumacetat
Advanced ChemTech	Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Cl-Trt-Harz, Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-2-Cl-Trt-Harz , Fmoc-L-Lys(Boc)-2-Cl-Trt-Harz
Applied Biosystems	DIPEA, Piperidin/DMF (1:4), TBTU, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
Bachem	Fmoc-Tyr(SO ₃ H)-OH Natrium-Salz
BIACORE AB	NHS, EDC, EA, HBS-EP, HBS-N, HBS-P, SDS 0.5 % (w/v), Glycine 50 mM pH 9.5, sonstige Chemikalien Biacore
Biochrom	FKS
Cambridge Isotope Lab.	Tris-d ₁₁
Deutero	Deuteriumoxid 99.9 %, DMSO-d ₆ 99.8 %
Fluka	Di-Natriumhydrogenphosphat, DIPCDI, DMF-SO ₃ , Fmoc-OSu, PyBOP, Pyridin, 2,2,2-Trifluorethanol-d ₃
Gepep	Peptid CGPYSGEPKPKTKIPERRVVTQ
Gibco	Zellkulturmedium RPMI 1640, Trypsin
Hewlett Packard	ES Tuning Mix

Iris Biotech GmbH, Nova Biochem, Perseptive	Fmoc-L-Arg(Pbf)-2-Cl-Trt-Harz, Fmoc-L-Lys(Boc)-2-Cl-Trt-Harz, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg-(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn-(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys-(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser-(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr-(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr-(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, TBTU
J.T. Baker	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade)
Lancaster	TIPS 99 %
Merck	Acetanhydrid, Aceton, Ammoniumhydrogencarbonat, Butan-1-ol, <i>tert</i> -Butylmethylether, Chloroform, α -Cyano-4-hydroxymizsäure, Dichlormethan, Diethylether, 1,4-Dioxan, DSS, Essigsäure 100 %, HFIP, Kaliumbromid, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Calciumchlorid, Kieselgel 60, Methanol, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, NMM, Phosphorsäure 100 %, 2-Propanol, Salzsäure 37 %, Trifluoressigsäure
Nova Biochem	HOBt
Proligo	DMF
Sigma-Aldrich	DMSO, Fibrinopeptid A, Neomycin, Penicillin, Puromycin, Streptomycin

Proteine

Recombinant human soluble CD4. 1 mg in Aliquoten zu 100 μ g (1 mg/mL) in 1 mL, MES-Puffer 50 mM, pH 6.0, NaCl 350 mM. Reinheit > 95 %. Aminosäure 1-370 des natürlichen CD4 (55 kDa). Expressionssystem: CHO-Zellen. Progenics Pharmaceuticals, Tarrytown, New York, USA. Katalog-Nr.: PRO1008-1, Lot 48, Gelagert bei -80 °C.

Recombinant HIV-1 SF162 GP120. 100 μ g (1.1 mg/mL) in 10 mM Natriumcitrat, 0.3 mM NaCl, pH 6.0. 120 kDa. Reinheit > 95 %. Expressionssystem: CHO-Zellen. NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville USA. Catalog Number: 7363, <http://www.aidsreagent.org/>, Gelagert bei -80 °C.

Recombinant HIV-1 Bal GP120. 100 μg (1 mg/mL) in PBS. 116 kDa. Reinheit > 95 %. Expressionssystem: HEK 293-Zellen. NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville USA. Catalog Number: 4961, <http://www.aidsreagent.org/>, Gelagert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Puffer

HBS-EP-Puffer. 0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Polysorbat P20. Sterilfiltriert, entgast. Bezogen von BIACORE AB.

HBS-P-Puffer. 0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005 % Polysorbat P20. Sterilfiltriert, entgast. Bezogen von BIACORE AB.

HBS-N-Puffer. 0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl. Sterilfiltriert, entgast. Bezogen von BIACORE AB.

Tris-Puffer. 0.01 M Tris- d_{11} , 0.15 M NaCl, 0.004 M NaN_3 in D_2O , pH = 7.0.

7.2. Verwendete Geräte und Materialien

Peptidsynthesizer

Die Peptidsynthesen wurden sowohl im *continuous flow*- als auch im *batch*- Verfahren durchgeführt.

Pioneer™ Peptide Synthesis System: Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, *continuous flow*-Verfahren.

Advanced Chemtech MOS 496 Ω : Firma Advanced ChemTech, Giessen, Syntheseroboter, Reaktionsblock mit 96 Kammern, *batch*-Verfahren.

Chromatographie

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Auftrennungen bzw. Aufreinigungen von Rohproduktgemischen über HPLC wurden an einer Biocad Sprint-HPLC-Anlage oder einer Biocad 700E-HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden, durchgeführt.

Dabei wurden Säulen mit RP- bzw. RP-analogen Phasen verwendet. Alle Laufmittel (HPLC *grade*) waren filtriert und im Ultraschallbad vorentgast.

HPLC-Säulen: Als stationäre RP-Phasen wurden in analytischem Maßstab eine VP 250/4.6 mm NUCLEOSIL 100-5 μm C18-Säule (Flußrate 0.8 mL/min) und im präparativem Maßstab eine VP 250/21 mm NUCLEOSIL 100-7 μm C18-Säule (Flußrate 20 mL/min) der Firma Macherey & Nagel eingesetzt. Als RP-analoge Phase diente eine semipräparative 218TP510-Säule (1.0 x 25 cm, 5 μm) der Firma Vydac (Flußrate 5 mL/min).

Laufmittel: Als mobile Phase wurden Gradienten zwischen Eluent C ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$, 95:5:0.1) und Eluent D ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$, 5:95:0.1), bzw. Eluent E (0.1 M aq. NH_4OAc -Lösung/ MeCN , 95:5) und Eluent F (0.1 M aq. NH_4OAc -Lösung/ MeCN , 5:95) verwendet.

Fraktionssammler: Die Fraktionen wurden mit Hilfe eines Gilson FC205 bzw. Gilson FC203B „*Fraction Collector*“, Gilson, Middleton, WI, USA, gesammelt.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA, im *reflector mode*. Die Peptide wurden mit einer Konzentration von etwa 10 pmol/ μl in einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) - oder α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CCA) - Matrix vermessen.

LC-ESI-Messungen

Die ESI-Massenspektren mit HPLC-Kopplung wurden an einem HP5989B MS *Engine* Massenspektrometer der Firma Hewlett Packard, Böblingen, aufgenommen. Als Ionenquelle diente ein HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface der Firma Hewlett Packard, Böblingen. Zur Flüssigchromatographie wurde ein HPLC-System der Serie 1100 der Firma Agilent, Waldbronn, eingesetzt. Als stationäre RP-Phase wurde eine CC 250/2 mm NUCLEOSIL 100-5 μm C₁₈-Säule, Volumen 900 μL , der Firma Macherey und Nagel, Düren, verwendet.

NMR-Spektrometer

NMR-Spektren wurden an Bruker DRX500 und Avance700-Spektrometern der Firma Bruker, Rheinstetten, bei 285 K bzw. 300 K aufgenommen.

Bruker DRX500 Spektrometer: Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für Protonen und 125.77 MHz für ^{13}C -Kerne. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet.

Bruker Avance700 Spektrometer: Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 16.35 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 700.13 MHz für Protonen und 176.07 MHz für ^{13}C -Kerne. Das Spektrometer ist wahlweise mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen oder mit einem analogen TXI-Probenkopf ohne Cryo-Technologie ausgestattet.

Software: Die Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kalibrierung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR (Version 3.1), Topspin (Version 1.3) und Aurelia (Version 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (Octane, Octane2) und PCs.

SPR-Messungen

Biacore 3000: Die SPR-Experimente wurden an einem Biacore 3000 Gerät der Firma BIACORE AB, Uppsala, Schweden, im AK Prof. Peters an der Medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt. Es wurden CM5-Sensorchips eingesetzt.

Biacore J: Einige Substanzen wurden zusätzlich mit einem Biacore J Gerät der Firma BIACORE AB, Uppsala, Schweden, untersucht. Es wurden ebenfalls CM5-Sensorchips eingesetzt.

Software: Die Auswertung erfolgte mit den Programmen BIAevaluation (Version 3.0.2) und Biacore Control Software (Version 3.1.1).

Zentrifugen

Eppendorf Centrifuge 5415C: Alle zu zentrifugierenden nicht proteinhaltigen Proben wurden auf einer Tischzentrifuge 5415C der Firma Eppendorf, Hamburg, bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Eppendorf Centrifuge 5804R: Proteinhaltige Proben wurden bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge 5805R von Eppendorf, Hamburg, zentrifugiert.

Circular Dichroismus

Die CD-Spektren wurden an einem *Circular Dichroism Spectrometer* der Firma AVIV Instruments Inc., Lakewood, Modell 215 aufgenommen.

Photometer

Die photometrischen Untersuchungen wurden an einem UV-160A, UV-VIS *Recording Spectrophotometer*, der Shimadzu Corporation, Kyoto, vorgenommen.

Ultrafiltrationsmembranen

VIVASPIN CONCENTRATOR. Zentrifugen-Filter, Ausschlussgrenze: 30 kDa, Volumen: 4 mL, Sartorius AG, Göttingen. Vor der Benutzung wurde die Membran zehnmals mit 2 mL H₂O (10 min, 3500 g) gewaschen.

Spin-X. Zentrifugen-Filter, Volumen: 2 mL, Nylon, 0.45 µM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München.

Float-A-Lyzer. Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, USA, Ausschlussgrenze: 30 kDa, Volumen: 1 mL

Verschiedenes

Alle Gefriertrocknungen erfolgten an einer Lyophylle *Alpha 1-2* bzw. *Alpha 1-4* der Firma Christ durchgeführt.

Die Zellkonzentrationen wurden in einer Neubauer Zählkammer (0.1 mm Tiefe/0.0025 mm²) und einem Mikroskop der Firma Hund/Wetzlar bestimmt.

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde über eine *USF Purelab Plus* Anlage gereinigt und in reinster Qualität eingesetzt.

7.3. *Allgemeine Arbeitsvorschriften*

7.3.1. **AAV 1: Peptidsynthesen**

a) Peptide: Zu Beginn wird das Harz durch aufeinanderfolgendes Zugabe und Absaugen von DMF und 2-Propanol zum Quellen gebracht (jeweils 1 mL, 10 min). Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe vom Harz abgespalten, indem zweimal je 1 mL einer Mischung aus Piperidin und DMF (1:4) für jeweils 10 min hinzugegeben wird. Nach einer Waschsequenz mit DMF wird die Amidbindung in einer 30, 60, 90 min Dreifachkupplung geknüpft. Zu diesem Zweck wird ein vierfacher Überschuss an N-terminaler Fmoc- und gegebenenfalls seitenkettengeschützter Aminosäure (0.5 M Lösung in DMF, 160 μ L) und je ein fünffacher Überschuss (bezogen auf freie Aminogruppen am Harz) Aktivator (TBTU, 0.5 M, 200 μ L) und DIPEA (1 M, 100 μ L) zugesetzt. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz mit 1.5 mL DMF gewaschen. Das *cappen* der nicht umgesetzten Aminofunktionen erfolgt zweimal mit je 1 mL einer Mischung von Ac_2O /DMF (1:9) für jeweils 10 min. Nach dem Waschen des Harzes mit 5x 1.5 mL DMF beginnen die weiteren Aminosäurekupplungen nun jeweils mit dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (s. o.). Im letzten Schritt wird das Harz mit DMF und anschließend zweimal mit DCM und 2-Propanol (je 1.5 mL) gewaschen und im Stickstoffstrom für 60 min getrocknet.

b) Sulfatierte Peptide: Zu Beginn wird das Harz in DMF (s.o.) gequollen, indem nacheinander DMF, 2-Propanol und wieder DMF (jeweils 1 mL) für jeweils 5 min hinzugegeben werden. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe von der ersten Aminosäure am Harz abgespalten, indem zweimal je 1 mL einer Mischung aus Piperidin und DMF (1:4) für jeweils 10 min hinzugegeben wird. Nach einer Waschsequenz mit DMF wird die Amidbindung in einer 30, 60, 90 min Dreifachkupplung geknüpft, wobei ein dreifacher Überschuss an N-terminaler Fmoc- und gegebenenfalls seitenkettengeschützter Aminosäure (0.5 M Lösung in DMF, 120 μ L) und je ein neunfacher Überschuss (bezogen auf freie Aminogruppen am Harz) NMM (1 M, 180 μ L) und ein dreifacher Überschuss PyBOP (0.5 M, 120 μ L) zugesetzt wird. Der N-terminale Fmoc-Sulfotyrosin-Baustein wird ebenfalls in einer 30, 60, 90 min Dreifachkupplung gekuppelt, wobei ein dreifacher Überschuss an Aminosäurebaustein (0.5 M Lösung in DMF, 120 μ L) und je ein dreifacher Überschuss (bezogen auf freie Aminogruppen am Harz) DIPCDI (0.5 M, 120 μ L) und ein dreifacher

Überschuss HOBt (0.5 M, 120 μ L) zugesetzt wird. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz mit 1.5 mL DMF gewaschen. Das *cappen* der nicht umgesetzten Aminofunktionen erfolgt zweimal mit je 1 mL einer Mischung von DMF/Ac₂O/Pyridin (38:1:1) für jeweils 10 min. Nach Waschen des Harzes mit 5x1.5 mL DMF beginnen die weiteren Aminosäurekupplungen nun jeweils mit dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (s. o.). Im letzten Schritt wird das Harz mit DMF und anschließend zweimal mit 2-Propanol und DCM (je 1.5 mL) gewaschen und im Stickstoffstrom für 60 min getrocknet.

7.3.2. AAV 2: Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens (Fmoc-Wert)

Zur Bestimmung des Fmoc-Wertes wird das Harz in eine Glasfritte überführt und zweimal mit je 2 mL Piperidin/DMF (1:4) 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und die Reaktionslösungen in einem Kolben, der mit Alufolie umwickelt ist, aufgefangen. Das Harz wird nun achtmal mit je 2 mL DMF gespült und die Lösung ebenfalls in dem Kolben aufgefangen. Für 50 μ mol Ansätze werden aus dem Kolben 100 μ L entnommen und 1900 μ L DMF hinzugegeben. Bei 20 μ mol Ansätzen werden aus dem Kolben 250 μ L entnommen und 1750 μ L DMF hinzugegeben. Die Menge an gelöstem Methylenfluoren wird in einer Glasküvette bei 301 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

7.3.3. AAV 3: Abspaltung vom Harz und der Schutzgruppen

a) Peptide manuell: Für die Abspaltung des Peptids vom PAL-PEG-PS-Harz wird dieses mit 12 mL TFA/H₂O/TIPS (18:1:1) versetzt und 90 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wird anschließend in einen Kolben abgesaugt und das Harz fünfmal mit je 2 mL TFA gewaschen. Das Harz wird erneut mit 12 mL TFA/H₂O/TIPS (18:1:1) versetzt und 60 min geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abgesaugt und noch fünfmal mit je 2 mL TFA gewaschen. Es werden alle Reaktions- und Waschlösungen vereinigt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Der Rückstand wird mit 5 mL Wasser versetzt, im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend lyophilisiert.

b) Peptide automatisiert: Für die automatisierte Abspaltung des Peptids am Peptidsynthesizer wird ein Abspaltblock eingesetzt, mit dessen Hilfe die Abspaltprodukte in Gefäßen

aufgefangen werden können (Volumen der Auffanggefäße: 4.5 mL). Dann werden 80 μ L TIPS und 1520 μ L 95 % wässrige TFA zu dem getrockneten Harz zupipettiert und 60 min geschüttelt. Nach Entleeren in die Auffanggefäße werden erneut 80 μ L TIPS und 1520 μ L 95 % wässrige TFA zugegeben und 60 min geschüttelt. Nach erneutem Entleeren wird abschließend mit 0.5 mL 95 % wässriger TFA nachgespült. Die Lösung wird an der TFA-stabilen Speedvac mit Elektrokühlfalle bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird anschließend in Wasser aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert und lyophilisiert.

c) Sulfatierte Peptide manuell: Für die Abspaltung des Peptids vom 2'-Chlortritylharz wird dieses mit 5 mL (pro 100 mg Harz) HFIP/DCM (1:4) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wird anschließend in einem Kolben aufgefangen und das Harz ein weiteres Mal auf die gleiche Weise behandelt. Die Reaktionslösung wird abgesaugt und noch fünfmal mit je 2 mL DCM gewaschen. Bei diesem Vorgang werden alle Reaktions- und Waschlösungen vereinigt. Das Lösungsmittel wird nun im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Anschließend werden 25 mL Diethylether hinzugegeben, so dass das Peptid präzipitiert. Nach Zentrifugation wird abdekantiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Für die Abspaltung der Schutzgruppen vom Peptid wird das Rohprodukt mit 2 mL einer eisgekühlten wässrigen 90 %igen TFA bei 0 °C für 5 h geschüttelt. Ist Arg(Pbf) zugegen, so verlängert sich die Zeit auf 8 h. Anschließend wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum unter Eiskühlung entfernt. Der Rückstand wird mit 25 mL eiskaltem Diethylether versetzt, so dass das Peptid präzipitiert. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 0 °C wird abdekantiert und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Der Rückstand wird nun im Vakuum getrocknet. Es werden 25 mL einer 25 μ M Ammoniumhydrogencarbonatlösung hinzugegeben, im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend lyophilisiert.

7.3.4. AAV 4: Etherextraktion

Das lyophilisierte Peptidrohprodukt wird mit 5 mL eiskaltem Diethylether versetzt und im Ultraschallbad homogenisiert. Nach Zentrifugation wird von den unlöslichen Stoffen abdekantiert. Der Rückstand wird mit 5 mL Wasser versetzt, im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wird bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.3.5. AAV 5: Reinigung per RP-HPLC

a) Peptide: Es werden ca. 10 mg des jeweiligen trockenen Rohproduktes in 1.5 mL H₂O/MeCN/TFA (95:5:0.1) im Ultraschallbad über 2 min homogenisiert und die leicht trübe Mischung für 4 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und unlösliche Verunreinigungen über einen 0.45 µm Nylon Zentrifugationsfilter (Costar Spin-X, Corning Inc, Corning, NY, USA) abgetrennt. Für jeden präparativen HPLC-Lauf wird 1 mL der erhaltenen Lösung eingesetzt.

Die Aufreinigung der Peptide erfolgt an der BioCAD Sprint- oder Biocad 700E-HPLC-Anlage. Es werden die für jedes Peptid angegebenen Gradienten zwischen Eluent C (H₂O/MeCN/TFA, 95:5:0.1) und Eluent D (H₂O/MeCN/TFA, 5:95:0.1) verwendet. Die photometrische Detektion wird bei einer Wellenlänge von 215 nm durchgeführt. Die Fraktionen werden mit dem angeschlossenen Fraktionssammler mit Peak-Erkennung in Reagenzgläser gesammelt und der Produktpeak durch MALDI-TOF-MS identifiziert. Die vereinigten Fraktionen des Zielpeptids werden lyophilisiert und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

b) Sulfatierte Peptide: Im Gegensatz zu AAV 5a werden die Rohprodukte in einem Gemisch aus 0.1 M aq. NH₄OAc-Lösung/MeCN (95:5) gelöst. Es werden die angegebenen Gradienten zwischen Eluent E (0.1 M aq. NH₄OAc-Lösung/MeCN, 95:5) und Eluent F (0.1 M aq. NH₄OAc-Lösung/MeCN, 5:95) verwendet. Die photometrische Detektion erfolgt zusätzlich bei einer Wellenlänge von 254 nm. Der Produktpeak wurde durch MALDI-TOF-MS bzw. ESI-MS im *negative ion mode* identifiziert.

7.3.6. NMR-Experimente zur Peptid-Charakterisierung

Soweit nicht anders erwähnt werden die NMR-Spektren der Peptide in H₂O/D₂O (9:1) bei einem pH-Wert von 4.0 (TFA) bei 285 oder 300 K aufgenommen. Die Zuordnung der ¹H-chemischen Verschiebungen erfolgt mit Hilfe von 1D-¹H- (Pulsprogramme zg, zgpr, p3919gp) sowie 2D-TOCSY- (mlevgppl19), ROESY- (roesygppl19) und COSY- (cosydfgppl19, cosygs) Experimenten, während die ¹³C-chemischen Verschiebungen aus 1D-¹³C- (pendant) sowie 2D-HSQC- (inviedetgs) und HMBC- (inv4gslplrnd) Spektren ermittelt werden. Die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals wird mittels Vorsättigung oder WATERGATE erreicht.

Die 2D-Spektren werden üblicherweise mit 512 Inkrementen in F1 aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm werden 8 bis 40 Scans mit 4k Datenpunkten pro Inkrement aufsummiert. Alle Spektren werden mittels TPPI- (*time proportional phase increment*) oder Echo-Antiecho-Verfahren phasensensitiv aufgenommen. Der Phasenfehler der Spektren wird korrigiert und anschließend eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades durchgeführt. Als *Window*-Funktionen werden in beiden Dimensionen typischerweise verschobene Quadrat-Sinusfunktionen eingesetzt. Die Nomenklatur der Aminosäuren folgt der IUPAC-Empfehlung zur Präsentation von NMR-spektroskopischen Daten von Proteinen.¹⁷²

7.4. Darstellung des Sulfoxyrosin-Bausteins S2

9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-L-Tyrosin (S1)

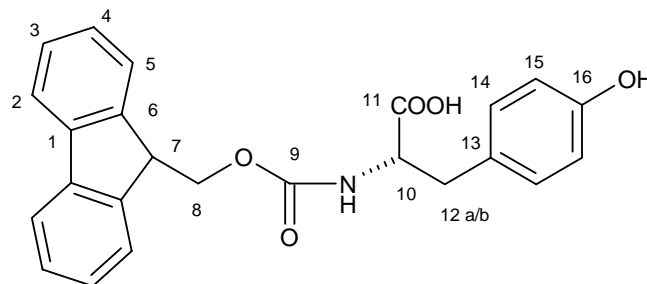
Es wurden 2.56 g (14.1 mmol) Tyrosin in 7 mL Dioxan und 35 mL 10 %ige Natriumcarbonatlösung suspendiert. In einem weiteren Gefäß wurden 4.79 g (14.2 mmol) *N*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-succinimid in 17 mL Dioxan gelöst. Diese Lösung wurde nun unter Eiskühlung langsam zu dem suspendierten Tyrosin zugetropft und bei Raumtemperatur für 75 min gerührt. Anschließend wurden 30 mL Wasser zugegeben und die Reaktionslösung mehrfach mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde nun mit verd. Salzsäure auf pH 3.5 angesäuert und nochmals extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer destillativ entfernt.

Ausbeute:

Es wurden 2.15 g (5.36 mmol) des Produkts erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 38 % bezogen auf das Tyrosin.

Charakterisierung:

DC: Laufmittel: CHCl₃/Aceton/AcOH (82:15:3), R_F = 0.17.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, T = 300 K)

δ [ppm] = 7.88 (m, 2H, H-2), 7.67-7.63 (m, 3H, H-5, NH), 7.43-7.38 (m, 2H, H-3), 7.34-7.27 (m, 2H, H-4), 7.09-7.03 (m, 2H, H-14), 6.69-6.63 (m, 2H, H-15), 4.21-4.15 (m, 3H, H-7, H-8), 4.11-4.06 (m, 1H, H-10), 2.96 (dd, 1H, ²J_{H12aH12b} = 13.6 Hz, ³J_{H12aH10} = 4.4 Hz, H-12a), 2.75 (dd, 1H, ²J_{H12bH12a} = 13.6 Hz, ³J_{H12bH10} = 3.8 Hz, H-12b).

^{13}C - NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , T = 300 K)

δ [ppm] = 173.84 (C-11), 156.28 (C-13), 144.13 (C-1), 141.03 (C-6), 130.39 (C-14), 128.34 (C-3), 127.98 (C-16), 127.42 (C-4), 125.67 (C-5), 120.45 (C-2), 115.32 (C-15), 65.96 (C-8), 56.25 (C-10), 46.94 (C-7), 36.10 (C-12).

9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-L-Tyrosin-Sulfat Natrium-Salz (S2)

Es wurden 1.50 g (3.7 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-L-Tyrosin (**S1**) in 36 mL DMF, 9 mL Pyridin und 4.5 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurden 1.70 g (11.1 mmol) DMF \cdot SO $_3$ zügig hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde nun bei 40 °C für 5 h gerührt.

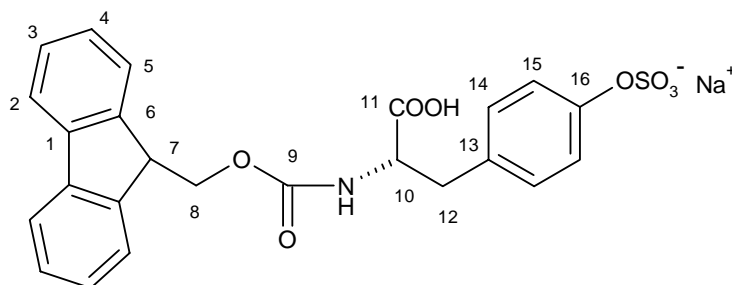
Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt und der Rückstand in MeOH/H $_2$ O (1:1) aufgenommen und mit Natriumcarbonatlösung auf pH 7 neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit MeOH/CHCl $_3$ (2:3) über Kieselgel gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Öl wurde nun in wenig MeOH aufgenommen und mit 1-Butanol gefällt. Nach Trocknen im Vakuum wurden farblose Kristalle erhalten.

Ausbeute:

Es wurden 387 mg (800 μ mol) des Produkts erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 21 % bezogen auf das Fmoc-Tyrosin.

Charakterisierung:

DC: Laufmittel CHCl $_3$ /MeOH (3:2), R_F = 0.39.



^1H - NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , T = 300 K)

δ [ppm] = 7.90-7.84 (m, 2H, H-2), 7.67-7.64 (m, 2H, H-5), 7.41-7.40 (m, 2H, H-3), 7.35-7.29 (m, 2H, H-4), 7.03-7.00 (m, 4H, H-14, H-15), 4.40-4.37 (m, 1H, H-8a), 4.21-4.19 (m, 1H, H-7), 4.15-4.12 (m, 1H, H-8b), 3.97 (d, 1H, H-10), 3.06-3.04 (m, 1H, H-12a), 2.90-2.87 (m, 1H, H-12b).

^{13}C - NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , T = 300 K)

δ [ppm] = 152.07 (C-16), 144.29 (C-1), 141.06 (C-6), 137.78 (C-13), 129.98 (C-14), 127.94 (C-3), 127.42 (C-4), 125.35 (C-5), 121.41 (C-2), 120.84 (C-15), 65.67 (C-8), 47.07 (C-7), 53.21 (C-10), 36.18 (C-12).

7.5. Peptidsynthesen

Die Peptidsynthese des Peptids **A1s** erfolgte automatisiert an einem *Pioneer Peptide Synthesis* System der Firma PerSeptive Biosystems. Alle anderen Peptidsynthesen erfolgten an einem Parallelsyntheseroboter MOS 496 der Firma Advanced. Es wurden sowohl Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz als auch 2'-Chlortritylharze mit bereits an das Harz gekuppelter AS eingesetzt. Als Aminosäurebausteine wurden die Fmoc-geschützten L-Aminosäuren verwendet, deren funktionelle Gruppen an den Seitenketten geschützt waren (Tabelle 12).

7.5.1. Synthese des Peptids **A1s**

Die Synthese von Peptid **A1s** wurde an einem vollautomatischen Festphasenpeptidsynthesizer nach AAV 1a unter Verwendung eines *continuous flow*-Systems der Firma PerSeptive Biosystems durchgeführt. Es wurden 313 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz (Belegung: 0.16 mmol/g) in eine Stempelsäule mit Frittenboden eingewogen. Dies entspricht einer Ansatzgröße von 50 μmol pro Ansatz. Abweichend von der AAV wurde die erste Amidbindung der Sequenz in einer 3x120 min Dreifachkupplung geknüpft. Nach der letzten Kupplungsreaktion wurde das Harz nur mit DMF und anschließend mit 2-Propanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Nach der Überführung des Harzes in eine Glasfritte wurde nach AAV 2 die Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten, um unter Messung der UV-Absorption die Rohausbeute zu bestimmen.

Entschützung und Abspaltung des Peptids vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte nach AAV 3a. Anschließend wurde noch eine Vorreinigung des Rohproduktes nach AAV 4 vorgenommen.

Reinigung per HPLC

Das Peptid wurde nach AAV 5a über die Vydac-C18-Säule mit einer Flussrate von 5 mL/min gereinigt.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Die Peptide wurden in einer α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

Tabelle 13: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Synthese- position	Aminosäurederivat	Einwaage pro Kupplung	Synthese- position	Aminosäurederivat	Einwaage pro Kupplung
1	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	je 130 mg	17	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	je 92 mg
2	Fmoc-L-Ala-OH	je 62 mg	18	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	je 92 mg
3	Fmoc-L-Ala-OH	je 62 mg	19	Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	je 119 mg
4	Fmoc-L-Ile-OH	je 71 mg	20	Fmoc-L-Ile-OH	je 71 mg
5	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	je 122 mg	21	Fmoc-L-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	je 82 mg
6	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	je 94 mg	22	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	je 92 mg
7	Fmoc-L-Val-OH	je 68 mg	23	Fmoc-L-Ile-OH	je 71 mg
8	Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	je 119 mg	24	Fmoc-L-Pro-OH	je 67 mg
9	Fmoc-L-Ile-OH	je 71 mg	25	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	je 77 mg
10	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	je 94 mg	26	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	je 77 mg
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	je 122 mg	27	Fmoc-L-Val-OH	je 68 mg
12	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	je 77 mg	28	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	je 122 mg
13	Fmoc-L-Pro-OH	je 67 mg	29	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	je 92 mg
14	Fmoc-L-Glu(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	je 85 mg	30	Fmoc-L-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	je 82 mg
15	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	je 77 mg	31	Fmoc-L-Met-OH	je 74 mg
16	Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	je 79 mg			

Kupplungsanzahl	Dreifachkupplung
Kupplungsdauer	R31: 120, 120, 120 min; A30-M1: 30, 60, 90 min
Peptid A1s	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3622.09 g/mol
Ansatzgröße	50 µmol
Harzmenge	313 mg (Belegung: 0.16 mmol/g)
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (in Glasfritte)
Rohausbeute	233 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1 CV 0 % D, 2.5 CV 0-20 % D, 1.5 CV 20 % D, 4.5 CV 20-30 % D, 1 CV 30-100 % D. Das Peptid A1s eluierte bei 25 % D.
Theoretische Ausbeute	181 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	30.2 µmol, 60.4 %
Ausbeute nach HPLC	10.0 mg, 5.5 %
MALDI-TOF (m/z)	3622.04 [M+H] ⁺ , berechnet 3619.78 [M]
Bemerkung	-

¹H-NMR

H₂O/D₂O (9:1). Das NMR-Spektrum zeigte breite Signale, so dass keine Zuordnung möglich war. Nach wiederholter Messung mit vorheriger Filtration durch einen 0.22 µm Cellulose-Acetat Zentrifugationsfilter (Costar Spin-X, Corning Inc, Corning, NY, USA) waren keine Signale im NMR zu sehen.

7.5.2. Optimierung der Synthese des Peptids A1

In die ersten zwei der vier Reaktionskammern (Volumen: 4 mL) des Parallelsyntheseroboters wurden 105 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz (Belegung: 0.19 mmol/g) eingewogen. In die anderen beiden Reaktionskammern wurden 28.5 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz (Belegung: 0.7 mmol/g) eingewogen. Dies entspricht in allen vier Reaktionskammern einer Ansatzgröße von 20 µmol. Die Synthese des Peptids erfolgte nach AAV 1a, wobei die erste Amidbindung der Sequenz in einer 3x120 min Dreifachkupplung geknüpft wurde. Nach der letzten Aminosäure wurden nur in den Reaktionskammern 1 und 3 die Fmoc-Schutzgruppen automatisch entfernt und anschließend acetyliert. Nach der Überführung des Harzes in eine Glasfritte wurde für die Peptide aus den Reaktionskammern 2 und 4 nach AAV 2 die Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten, um unter Messung der UV-Absorption die Rohausbeute zu bestimmen.

Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte für die Peptide in den Reaktionskammern 1 und 3 automatisiert am Peptidsynthesizer nach AAV 3b. Die Entschützung und Abspaltung der Peptide aus den Reaktionskammern 2 und 4 erfolgte manuell nach AAV 3a. Anschließend wurde noch eine Vorreinigung des Rohproduktes nach AAV 4 vorgenommen.

Reinigung per HPLC

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte nach AAV 5a über die Vydac C18-Säule mit einer Flussrate von 5 mL/min

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Die Peptide wurden in einer α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

Tabelle 14: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Aminosäurederivat	Einwaage [g]	Aminosäurederivat	Einwaage [g]
Fmoc-L-Ala-OH	1.21	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1.37
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1.27	Fmoc-L-Met-OH	0.73
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	1.74	Fmoc-L-Pro-OH	0.99
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	1.20	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1.49
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2.37	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	0.78
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	0.83	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	2.22
Fmoc-L-Ile-OH	1.71	Fmoc-L-Val-OH	0.99

Kupplungsanzahl	Dreifachkupplung
Kupplungsdauer	R31: 120, 120, 120 min; A30-M1: 30, 60, 90 min
Peptid A1 – Methode a	AcHN-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3648.13 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	105 mg (Belegung: 0.19 mmol/g)
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	52.8 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 2.5 CV 0-20 % D, 1.5 CV 20 % D, 3.5 CV 20-30 % D, 1 CV 30-100 % D. Das Peptid A1 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	73.0 mg
Ausbeute nach HPLC	2.3 mg, 3.2 %
MALDI-TOF (m/z)	3648.90 [M+H] ⁺ , berechnet 3645.82 [M]
Bemerkung	Außer eines analytischen HPLC-Laufes fand keine weitere Aufreinigung statt. Da die Abspaltung automatisiert am Peptidsynthesizer durchgeführt wurde, kann keine Fmoc-Ausbeutebestimmung angegeben werden. Eine NMR-spektroskopische Charakterisierung fand nicht statt, da es sich nur um eine Optimierung der Synthese handelte.
Peptid A1 – Methode b	AcHN-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3648.13 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	105 mg (Belegung: 0.19 mmol/g)
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (in Glasfritte)
Rohausbeute	59.3 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 2.5 CV 0-20 % D, 1.5 CV 20 % D, 3.5 CV 20-30 % D, 1 CV 30-100 % D. Das Peptid A1 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	73.0 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	8.9 µmol, 44.7 %
Ausbeute nach HPLC	2.2 mg, 3.0 %
MALDI-TOF (m/z)	3648.70 [M+H] ⁺ , berechnet 3645.82 [M]
Bemerkung	Außer eines analytischen HPLC-Laufes fand keine weitere Aufreinigung statt. Eine NMR-spektroskopische Charakterisierung fand nicht statt, da es sich nur um eine Optimierung der Synthese handelte.
Peptid A1 – Methode c	AcHN-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3648.13 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg (Belegung: 0.7 mmol/g)
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	69.6 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 2.5 CV 0-20 % D, 1.5 CV 20 % D, 3.5 CV 20-30 % D, 1 CV 30-100 % D. Das Peptid A1 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	73.0 mg
Ausbeute nach HPLC	2.6 mg, 3.5 %
MALDI-TOF (m/z)	3648.78 [M+H] ⁺ , berechnet 3645.82 [M]
Bemerkung	Außer eines analytischen HPLC-Laufes fand keine weitere Aufreinigung statt. Da die Abspaltung automatisiert am Peptidsynthesizer durchgeführt wurde, kann keine Fmoc-Ausbeutebestimmung angegeben werden. Eine NMR-spektroskopische Charakterisierung fand nicht statt, da es sich nur um eine Optimierung der Synthese handelte.

Peptid A1 – Methode d	AcHN-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3648.13 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg (Belegung: 0.7 mmol/g)
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (in Glasfritte)
Rohausbeute	74.8 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 2.5 CV 0-20 % D, 1.5 CV 20 % D, 3.5 CV 20-30 % D, 1 CV 30-100 % D. Das Peptid A1 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	73.0 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	12.0 µmol, 59.8 %
Ausbeute nach HPLC	2.7 mg, 3.7 %
MALDI-TOF (m/z)	3648.92 [M+H] ⁺ , berechnet 3645.82 [M]
Bemerkung	Außer eines analytischen HPLC-Laufes fand keine weitere Aufreinigung statt. Eine NMR-spektroskopische Charakterisierung fand nicht statt, da es sich nur um eine Optimierung der Synthese handelte.

7.5.3. Synthese der Peptide A1-A16

In jede der 11 Reaktionskammern (Volumen: 4 mL) des Parallelsyntheseroboters wurden 28.5 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz (Belegung: 0.7 mmol/g) eingewogen. Dies entspricht einer Ansatzgröße von 20 µmol pro Reaktionskammer. Die Synthese der Peptide erfolgte nach AAV 1a, wobei die erste Amidbindung der Sequenz in einer 3x120 min Dreifachkupplung geknüpft wurde. Nach der Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Fmoc-Schutzgruppe automatisch entfernt und nur das Peptid **A1** acetyliert. Die Peptide **A2-A16** behielten einen freien N-Terminus.

Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz und den Schutzgruppen erfolgte nach AAV 3b. Danach wurde noch eine Vorreinigung des Rohproduktes nach AAV 4 vorgenommen.

Reinigung per HPLC

Die Peptide wurden nach AAV 5a aufgereinigt. Das Peptid **A1** wurde dabei über die Vydac-C18-Säule mit einer Flussrate von 5 mL/min gereinigt, während die Peptide **A2-A16** über die präparative C18-Säule mit einer Flussrate von 20 mL/min gereinigt wurden.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Die Peptide wurden in einer α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

Tabelle 15: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Aminosäurederivat	Einwaage [g]	Aminosäurederivat	Einwaage [g]
Fmoc-L-Ala-OH	2.70	Fmoc-L-Met-OH	1.71
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2.98	Fmoc-L-Phe-OH	1.96
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	5.03	Fmoc-L-Pro-OH	2.84
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	3.86	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	8.38
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	6.91	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	1.82
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	2.36	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	5.75
Fmoc-L-Ile-OH	4.34	Fmoc-L-Val-OH	1.56
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	3.95		

Kupplungsanzahl
Kupplungsdauer

Dreifachkupplung
R31: 120, 120, 120 min; A30-M1: 30, 60, 90 min

Peptid A1

Molare Masse
Ansatzgröße
Harzmenge
Aktivator
Abspaltung
Rohausbeute
Vorreinigung
HPLC

AcHN-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-A-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
3648.13 g/mol
20 μ mol
28.5 mg
TBTU
90 % TFA, 5 % H₂O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
83.0 mg
AAV 4 - Ethervorreinigung
1.5 CV 0 % D, 2.5 CV 0-20 % D, 1.5 CV 20 % D, 3.5 CV 20-30 % D, 1 CV 30-100 % D. Das Peptid **A1** eluierte bei 31 % D.

Theoretische Ausbeute
Ausbeute nach HPLC
MALDI-TOF (m/z)
Bemerkung

72.9 mg
2.1 mg, 2.9 %
3648.21 [M+H]⁺, berechnet 3645.82 [M]
-

Peptid A2	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-S-N-S-K-Q-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3557.89 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	69.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-15 % D, 7 CV 15-32 % D, 0.5 CV 32-100 % D. Das Peptid A2 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	71.1 mg
Ausbeute nach HPLC	2.8 mg, 3.9 %
MALDI-TOF (m/z)	3557.02 [M+H] ⁺ , berechnet 3555.64 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A3	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-F-D-I-N-F-F-T-S-E-P-S-Q-K-S-N-S-K-Q-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3509.89 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	73.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 2 CV 0-30 % D, 4 CV 30-46 % D, 0.8 CV 46-100 % D. Das Peptid A3 eluierte bei 35 % D.
Theoretische Ausbeute	70.2 mg
Ausbeute nach HPLC	3.2 mg, 4.6 %
MALDI-TOF (m/z)	3510.11 [M+H] ⁺ , berechnet 3507.67 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A4	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-D-N-D-K-Q-D-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3641.92 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	107.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 2 CV 0-15 % D, 7 CV 15-35 % D, 0.5 CV 35-100 % D. Das Peptid A4 eluierte bei 29 % D.
Theoretische Ausbeute	72.8 mg
Ausbeute nach HPLC	5.3 mg, 7.3 %
MALDI-TOF (m/z)	3641.96 [M+H] ⁺ , berechnet 3639.64 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A5	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-F-N-F-K-Q-F-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3738.19 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	83.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1.5 CV 0-20 % D, 7 CV 20-35 % D, 1 CV 35-100 % D. Das Peptid A5 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	74.7 mg
Ausbeute nach HPLC	3.1 mg, 4.1 %
MALDI-TOF (m/z)	3738.30 [M+H] ⁺ , berechnet 3735.76 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.

Peptid A6	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-F-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3606.11 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	86.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-20 % D, 7 CV 20-47 % D, 0.5 CV 47-100 % D. Das Peptid A6 eluierte bei 34 % D.
Theoretische Ausbeute	72.1 mg
Ausbeute nach HPLC	2.5 mg, 3.5 %
MALDI-TOF (m/z)	3605.61 [M+H] ⁺ , berechnet 3603.79 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A7	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-F-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3606.11 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	70.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-20 % D, 7 CV 20-40 % D, 0.5 CV 40-100 % D. Das Peptid A7 eluierte bei 29 % D.
Theoretische Ausbeute	72.1 mg
Ausbeute nach HPLC	4.0 mg, 5.5 %
MALDI-TOF (m/z)	3606.02 [M+H] ⁺ , berechnet 3603.79 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A8	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-F-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3606.11 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	65.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-20 % D, 7 CV 20-40 % D, 0.5 CV 40-100 % D. Das Peptid A8 eluierte bei 31 % D.
Theoretische Ausbeute	72.1 mg
Ausbeute nach HPLC	3.8 mg, 5.3 %
MALDI-TOF (m/z)	3605.01 [M+H] ⁺ , berechnet 3603.79 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A9	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-E-K-I-N-V-K-E-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3624.08 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	53.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-20 % D, 7 CV 20-35 % D, 0.5 CV 35-100 % D. Das Peptid A9 eluierte bei 29 % D.
Theoretische Ausbeute	72.4 mg
Ausbeute nach HPLC	3.0 mg, 4.1 %
MALDI-TOF (m/z)	3625.42 [M+H] ⁺ , berechnet 3621.74 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.

Peptid A10	H₂N-M-D-Y-Q-S-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-S-K-Q-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3571.92 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	70.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-15 % D, 6 CV 15-35 % D, 0.5 CV 35-100 % D. Das Peptid A10 eluierte bei 34 % D.
Theoretische Ausbeute	71.4 mg
Ausbeute nach HPLC	3.1 mg, 4.3 %
MALDI-TOF (m/z)	3571.33 [M+H] ⁺ , berechnet 3569.65 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A11	H₂N-M-D-Y-Q-D-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-S-N-S-K-Q-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3573.84 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	67.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-15 % D, 6 CV 15-35 % D, 0.5 CV 35-100 % D. Das Peptid A11 eluierte bei 33 % D.
Theoretische Ausbeute	71.4 mg
Ausbeute nach HPLC	5.3 mg, 7.4 %
MALDI-TOF (m/z)	3573.24 [M+H] ⁺ , berechnet 3571.60 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A12	H₂N-M-D-F-Q-S-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3594.05 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	63.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-20 % D, 7 CV 20-42 % D, 0.5 CV 42-100 % D. Das Peptid A12 eluierte bei 31 % D.
Theoretische Ausbeute	71.8 mg
Ausbeute nach HPLC	2.9 mg, 4.0 %
MALDI-TOF (m/z)	3594.34 [M+H] ⁺ , berechnet 3591.75 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A13	H₂N-M-D-F-Q-S-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-E-K-S-N-S-K-E-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3531.80 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	59.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-15 % D, 7 CV 15-32 % D, 0.5 CV 32-100 % D. Das Peptid A13 eluierte bei 31 % D.
Theoretische Ausbeute	70.6 mg
Ausbeute nach HPLC	4.6 mg, 6.5 %
MALDI-TOF (m/z)	3530.93 [M+H] ⁺ , berechnet 3529.57 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.

Peptid A14	H₂N-M-D-F-Q-S-S-P-I-F-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-S-N-S-K-Q-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3513.84 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	100.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-15 % D, 7 CV 15-30 % D, 0.5 CV 30-100 % D. Das Peptid A14 eluierte bei 29 % D.
Theoretische Ausbeute	70.2 mg
Ausbeute nach HPLC	5.6 mg, 8.0 %
MALDI-TOF (m/z)	3512.89 [M+H] ⁺ , berechnet 3511.62 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A15	H₂N-M-D-F-Q-S-S-P-I-F-D-I-N-F-F-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-Q-I-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3546.05 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	85.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-20 % D, 7 CV 20-42 % D, 0.5 CV 42-100 % D. Das Peptid A15 eluierte bei 29 % D.
Theoretische Ausbeute	70.9 mg
Ausbeute nach HPLC	2.6 mg, 3.7 %
MALDI-TOF (m/z)	3546.22 [M+H] ⁺ , berechnet 3543.78 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.
Peptid A16	H₂N-M-D-F-Q-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-S-K-Q-S-A-A-R-CONH₂
Molare Masse	3555.92 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	28.5 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS (im Peptidsynthesizer)
Rohausbeute	63.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.5 CV 0 % D, 1 CV 0-15 % D, 6 CV 15-32 % D, 0.5 CV 32-100 % D. Das Peptid A16 eluierte bei 34 % D.
Theoretische Ausbeute	71.1 mg
Ausbeute nach HPLC	2.8 mg, 3.9 %
MALDI-TOF (m/z)	3555.12 [M+H] ⁺ , berechnet 3553.66 [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-spektroskopische Charakterisierung vorgenommen.

7.5.4. Synthese der Peptide C1-C6

In jede der sechs Reaktionskammern (Volumen: 4 mL) des Parallelsyntheseroboters wurden 103 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz (Belegung: 0.291 mmol/g) eingewogen. Dies entspricht einer Ansatzgröße von 30 µmol pro Ansatz. Die Synthese der Peptide erfolgte nach AAV 1a. Nach der Überführung des Harzes in eine Glasfritte wurde nach AAV 2 die

Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten, um durch Messung der UV-Absorption die Rohausbeute zu bestimmen.

Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte nach AAV 3a. Anschließend wurde noch eine Vorreinigung des Rohproduktes nach AAV 4 vorgenommen.

Reinigung per HPLC

Die Peptide wurden nach AAV 5a über die Vydac-C18-Säule mit einer Flussrate von 5 mL/min gereinigt.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Die Peptide wurden in einer α -Cyano-4-hydroxymethyl-2-imidazolinsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

Tabelle 17: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Aminosäurederivat	Einwaage [g]	Aminosäurederivat	Einwaage [g]
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	1.50	Fmoc-L-Met-OH	0.53
Fmoc-L-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH	1.63	Fmoc-L-Pro-OH	1.34
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1.54	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	3.17
Fmoc-L-Glu(O <i>t</i> Bu)-OH	0.92	Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	0.86
Fmoc-L-Ile-OH	1.65	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	3.80
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	0.51	Fmoc-L-Val-OH	0.73

Kupplungsanzahl
Kupplungsdauer

Dreifachkupplung
30, 60, 90 min

Peptid C1

Molare Masse
Ansatzgröße
Harzmenge
Aktivator
Abspaltung
Rohausbeute
Vorreinigung
HPLC

$\text{H}_2\text{N-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-CONH}_2$

1734.85 g/mol

30 μ mol

103 mg

TBTU

90 % TFA, 5 % H_2O , 5 % TIPS

92.6 mg

AAV 4 - Ethervorreinigung

2.0 CV 0 % D, 7 CV 0-40 % D, 1.0 CV 40-100 % D. Das Peptid C1 eluierte bei 28 % D.

49.1 mg

3.9 mg, 7.9 %

MALDI-TOF (m/z)

1757.20 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet 1733.75 g/mol [M]

Bemerkung

-

Tabelle 18: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids C1 in H₂O/D₂O 9:1 pH = 4.0 bei 300 K. Kalibriert auf HDO = 4.700 ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ
Ser-6	8.325	4.286	3.765	3.765	n.b.	-	-	-	-	-
Ser-7	8.238	4.291	3.765	3.765	4.581	---	---	---	---	---
Pro-8	---	n.b.	1.582	1.582	1.892	1.892	---	3.731	3.605	--
Ile-9	7.952	3.920	1.616	---	n.b.	n.b.	0.680	0.680	---	---
Tyr-10	7.925	4.506	2.923	2.787	---	---	---	n.b.	n.b.	n.b.
Asp-11	8.231	4.566	2.735	2.613	---	---	---	---	---	---
Ile-12	7.885	3.963	1.703	---	n.b.	n.b.	0.660	0.660	---	---
Asn-13	8.162	4.569	2.751	2.609	---	---	---	n.b.	n.b.	---
Tyr-14	7.878	4.295	2.788	2.788	---	---	---	n.b.	n.b.	n.b.
Tyr-15	7.888	4.451	2.963	2.826	---	---	---	n.b.	n.b.	n.b.
Thr-16	7.806	4.217	4.102	---	1.960	---	---	---	---	---
Ser-17	8.047	4.332	3.747	3.747	n.b.	---	---	---	---	---
Glu-18	8.142	4.579	1.782	1.986	2.358	2.358	---	---	---	---
Pro-19	---	n.b.	1.816	1.896	2.202	2.202	---	3.678	3.678	---
Ser-20	8.613	4.739	3.783	3.705	n.b.	---	---	---	---	---

Peptid C2

Molare Masse

Ansatzgröße

Harzmenge

Aktivator

Abspaltung

Rohausbeute

Vorreinigung

HPLC

Theoretische Ausbeute

Ausbeute nach HPLC

MALDI-TOF (m/z)

Bemerkung

H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-CONH₂

2187.38 g/mol

30 μ mol

103 mg

TBTU

90 % TFA, 5 % H₂O, 5 % TIPS

105.5 mg

AAV 4 - Ethervorreinigung

Es wurde aufgrund der geringen Löslichkeit keine gereinigte Substanz erhalten. Von einer weiteren Aufreinigung wurde daher abgesehen.

52.83 mg

0 mg

Aus Rohprodukt bei 2188.93 g/mol [M+H]⁺, berechnet 2187.38 g/mol [M] identifiziert.

Es wurde keine NMR-Charakterisierung durchgeführt.

Peptid C3

Molare Masse

Ansatzgröße

Harzmenge

Aktivator

Abspaltung

Rohausbeute

Vorreinigung

HPLC

Theoretische Ausbeute

Ausbeute nach HPLC

MALDI-TOF (m/z)

Bemerkung

H₂N-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-CONH₂

2240.38 g/mol

30 μ mol

103 mg

TBTU

90 % TFA, 5 % H₂O, 5 % TIPS

102.7 mg

AAV 4 - Ethervorreinigung

1.0 CV 0 % D, 1.0 CV 0-10 % D, 7 CV 10-40 % D, 1.0 CV 40-100 % D.

Peptid C3 eluierte bei 28 % D.

52.2 mg

2.4 mg, 4.5 %

2262.10 [M+Na]⁺, berechnet 2238.97 g/mol [M]

Es wurde keine NMR-Charakterisierung durchgeführt.

Peptid C4	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-CONH₂
Molare Masse	2371.58 g/mol
Ansatzgröße	30 µmol
Harzmenge	103 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS
Rohausbeute	140.0 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.0 CV 0 % D, 1.0 CV 0-10 % D, 7 CV 10-40 % D, 1.0 CV 40-100 % D. Peptid C4 eluierte bei 28 % D.
Theoretische Ausbeute	60.1 mg
Ausbeute nach HPLC	1.8 mg, 2.9 %
MALDI-TOF (m/z)	2393.40 [M+Na] ⁺ , berechnet 2370.01 g/mol [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-Charakterisierung durchgeführt.
Peptid C5	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-CONH₂
Molare Masse	2627.88 g/mol
Ansatzgröße	30 µmol
Harzmenge	103 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS
Rohausbeute	136.3 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.0 CV 0 % D, 1.0 CV 0-10 % D, 7 CV 10-30 % D, 1.0 CV 30-100 % D. Peptid C5 eluierte bei 25 % D.
Theoretische Ausbeute	65.4 mg
Ausbeute nach HPLC	6.5 mg, 9.9 %
MALDI-TOF (m/z)	2649.90 [M+Na] ⁺ , berechnet 2626.17 g/mol [M]
Bemerkung	Es konnte keine Auswertung der NMR-Spektren erfolgen, da die Konzentration des freien Peptids in der Lösung zu gering war. Das Peptid bildet unter den hier durchgeführten Messbedingungen wahrscheinlich Aggregate. Hinweis dafür sind die breiten Signale im NMR-Spektrum. Auch ein Zusatz von 30 % TFE als Lösungsvermittler führte zu keiner ausreichenden Intensität der Signale um per NOESY eine Sequenzzuordnung vorzunehmen. Daher wurde auf eine weitere Auswertung verzichtet.
Peptid C6	H₂N-M-D-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-I-N-V-K-CONH₂
Molare Masse	3082.46 g/mol
Ansatzgröße	30 µmol
Harzmenge	103 mg
Aktivator	TBTU
Abspaltung	90 % TFA, 5 % H ₂ O, 5 % TIPS
Rohausbeute	167.5 mg
Vorreinigung	AAV 4 - Ethervorreinigung
HPLC	1.0 CV 0 % D, 1.0 CV 0-10 % D, 7 CV 10-40 % D, 1.0 CV 40-100 % D. Peptid C6 eluierte bei 26 % D.
Theoretische Ausbeute	69.9 mg
Ausbeute nach HPLC	4 mg, 5.7 %
MALDI-TOF (m/z)	3104.40 [M+Na] ⁺ , berechnet 3080.46 g/mol [M]
Bemerkung	Es wurde keine NMR-Charakterisierung durchgeführt.

7.5.5. Synthese des Peptids E

Das Peptid **E** wurde in einer Glasfritte synthetisiert. Es wurden 94 mg Fmoc-Lys(Boc)-2-Cl-Trt-Harz (Belegung: 0.214 mmol/g) eingewogen. Dies entspricht einer Ansatzgröße von 20 μ mol. Die Synthese des Peptids erfolgte nach AAV 1b. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde nach AAV 2 manuell abgespalten, um durch Messung der UV-Absorption die Rohausbeute zu bestimmen.

Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte nach AAV 3c.

Reinigung per HPLC

Das Peptid wurde nach AAV 5b über die präparative C18-Säule mit einer Flussrate von 20 mL/min gereinigt.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Das Peptid wurde in einer α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

ESI-MS: Das Peptid wurde in 99 μ L eines Gemisches aus Wasser und Acetonitril (1:1) gelöst und mit 1 μ L Triethylamin versetzt. Die Messung erfolgt über kontinuierliche Direkteinspritzung im *negative ion mode*. Die Messdauer betrug 90 s.

Tabelle 19: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Aminosäurederivat	Einwaage [mg]	Aminosäurederivat	Einwaage [mg]
Fmoc-L-Ile-OH	21.2	Fmoc-L-Tyr(SO ₃)Na (S2)	30.6

Kupplungsanzahl	Dreifachkupplung
Kupplungsdauer	30, 60, 90 min
Peptid E	H₂N-I-Y-K-COOH
Molare Masse	502.53 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	94 mg
Aktivator	PyBOP bzw. DIPCDI
Abspaltung	HFIP/DCM (1:4)
Rohausbeute	7.0 mg
Vorreinigung	AAV 3c - Ethervorreinigung
HPLC	12.0 CV 0-50 % F, 1.0 CV 50-100 % F. Das Peptid E eluierte bei 8 % F.
Theoretische Ausbeute	10.1 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	9.4 µmol, 47 %
Ausbeute nach HPLC	0.9 mg, 8.9 % (s. Bemerkung)
ESI-MS <i>neg. ion mode</i> (m/z)	501.20 [M] ⁻
MALDI-TOF (m/z)	503.24 [M+H] ⁺ , berechnet 502.32 g/mol [M]
Bemerkung	Es wurde nur ein Teil der Substanz über HPLC gereinigt, um weitere Charakterisierungen vornehmen zu können.

7.5.6. Synthese der Peptide D1 und D2

In jede der vier Reaktionskammern (Volumen: 4 mL) des Parallelsyntheseroboters wurden 94 mg Fmoc-Lys(Boc)-2-Cl-Trt-Harz (Belegung: 0.214 mmol/g) eingewogen. Das entspricht einer Ansatzgröße von 20 µmol pro Ansatz. Die Synthese der Peptide erfolgte nach AAV 1b. Das *cappen* der nicht umgesetzten Aminofunktionen erfolgte im Gegensatz zur Vorschrift für Peptid **D1** zweimal mit je 1 mL einer Mischung von Essigsäureanhydrid, Pyridin und DMF in unterschiedlichen Verhältnissen abhängig von der Methode (s. Methode a bis c) für jeweils 10 min. Nach der Überführung des Harzes in eine Glasfritte wurde nach AAV 2 die Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten, um unter Messung der UV-Absorption die Rohausbeute zu bestimmen.

Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgten nach AAV 3c.

Reinigung per HPLC

Die Peptide wurden nach AAV 5b über die präparative C18-Säule mit einer Flussrate von 20 mL/min gereinigt.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Die Peptide wurden in einer α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

ESI-MS: Die Peptide wurden in 99 μ L eines Gemisches aus Wasser und Acetonitril (1:1) gelöst und mit 1 μ L Triethylamin versetzt. Die Messung erfolgt über kontinuierliche Direkteinspritzung im *negative ion mode*. Die Messdauer betrug 90 s.

Tabelle 20: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Aminosäurederivat	Einwaage [g]	Aminosäurederivat	Einwaage [g]
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	0.58	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	0.65
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	0.59	Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	0.39
Fmoc-L-Glu(O <i>t</i> Bu)-OH	0.41	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	0.53
Fmoc-L-Pro-OH	0.33	Fmoc-L-Tyr(SO ₃)Na (S2)	0.38

Kupplungsanzahl
Kupplungsdauer

Dreifachkupplung
30, 60, 90 min

Peptid **D1** (Methode a)

Molare Masse
Ansatzgröße
Harzmenge
Aktivator
Abspaltung
Rohausbeute
Vorreinigung
HPLC

$\text{H}_2\text{N-N-Y-T-S-E-P-S-Q-K-COOH}$

1296.34 g/mol

20 μ mol

94 mg

PyBOP bzw. DIPCDI

HFIP/DCM (1:4)

11.0 mg

AAV 3c - Ethervorreinigung

1.0 CV 0-10 % F, 3.0 CV 10 % F, 11.0 CV 10-23 % F, 1.0 CV 23-100 % F.

Das Peptid **D1** eluierte bei 10 % F.

Theoretische Ausbeute

25.9 mg

Ausbeute nach Fmoc-Wert

12.4 μ mol, 62 %

Ausbeute nach HPLC

2.4 mg, 9.3 %

ESI-MS *neg. ion mode* (m/z)

646.91 [M]²⁻, berechnet 1295.60 g/mol [M].

MALDI-TOF (m/z)

1216.52 [M-SO₃+H]⁺, 1239.54 [M-SO₃+Na]⁺, berechnet 1295.60 g/mol [M].

Bemerkung

Bei diesem Ansatz wurde nur bis zu Synthese-Position 8 mit Ac₂O/DMF (1:10) *gecappt*. Nach der Kupplung des Sulfotyrosins wurde auf das *cappen* verzichtet.

Tabelle 21: $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids **D1** in ppm bei 285 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH = 4.0. Kalibriert auf HDO = 4.700 ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	H ζ
Asn-13	6.595	3.992	2.594	2.594	-	-	-	6.833	7.437	-	-	-
Tyr-14	8.456	4.381	2.772	2.772	-	-	-	6.940	6.940	6.972	6.972	-
Tyr-15	8.048	4.356	2.797	2.670	-	-	-	6.868	6.868	6.578	6.578	-
Thr-16	7.868	4.064	3.942	-	0.953	n.b.	-	-	-	-	-	-
Ser-17	8.087	4.191	3.635	3.635	n.b.	-	-	-	-	-	-	-
Glu-18	8.125	4.473	1.861	1.642	2.251	2.251	-	-	-	-	-	-
Pro-19	-	4.191	2.081	2.081	1.692	1.783	-	3.457	3.554	-	-	-
Ser-20	8.266	4.152	3.640	3.640	n.b.	-	-	-	-	-	-	-
Gln-21	8.240	4.137	1.915	1.759	2.149	2.149	-	-	-	6.708	7.393	-
Lys-22	8.169	4.064	1.661	1.661	1.194	1.194	-	1.452	1.515	2.753	2.753	7.319

Peptid D1 (Methode b)

Molare Masse	$\text{H}_2\text{N-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-COOH}$ 1296.34 g/mol
Ansatzgröße	20 μmol
Harzmenge	94 mg
Aktivator	PyBOP bzw. DIPCDI
Abspaltung	HFIP/DCM (1:4)
Rohausbeute	18.2 mg
Vorreinigung	AAV 3c - Ethervorreinigung
HPLC	9.0 CV 0-30 % F, 1.0 CV 30-100 % F. Das Peptid D1 eluierte bei 16 % F.
Theoretische Ausbeute	25.9 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	11.4 μmol , 57 %
Ausbeute nach HPLC	0.6 mg, 2.3 %
ESI-MS <i>neg. ion mode</i> (m/z)	646.91 $[\text{M}]^{2-}$, 1295.21 $[\text{M}]^-$ berechnet 1295.60 g/mol $[\text{M}]$.
Bemerkung	Bei diesem Ansatz wurde bis zum Ende der Synthese mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}$ (1:10) <i>gecappt</i> .

Peptid D1 (Methode c)

Molare Masse	$\text{H}_2\text{N-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-COOH}$ 1296.34 g/mol
Ansatzgröße	20 μmol
Harzmenge	94 mg
Aktivator	PyBOP bzw. DIPCDI
Abspaltung	HFIP/DCM (1:4)
Rohausbeute	17.2 mg
Vorreinigung	AAV 3c - Ethervorreinigung
HPLC	9.0 CV 0-30 % F, 1.0 CV 30-100 % F. Das Peptid D1 eluierte bei 16 % F.
Theoretische Ausbeute	25.9 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	9.2 μmol , 46 %
Ausbeute nach HPLC	2.3 mg, 8.7 %
ESI-MS <i>neg. ion mode</i> (m/z)	646.97 $[\text{M}]^{2-}$, 1295.36 $[\text{M}]^-$, berechnet 1295.60 g/mol $[\text{M}]$.
Bemerkung	Bei diesem Ansatz wurde bis zum Ende der Synthese mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}/\text{DMF}$ (s.o.) <i>gecappt</i> .

Peptid D2	H₂N-N-Y-Y-T-S-E-P-S-Q-K-COOH
Molare Masse	1216.28 g/mol
Ansatzgröße	20 µmol
Harzmenge	94 mg
Aktivator	PyBOP
Abspaltung	HFIP/DCM (1:4)
Rohausbeute	15.2 mg
Vorreinigung	AAV 3c - Ethervorreinigung
HPLC	9.0 CV 0-30 % F, 1.0 CV 30-100 % F. Das Peptid D2 eluierte bei 17 % F.
Theoretische Ausbeute	24.3 mg
Ausbeute nach Fmoc-Wert	12.1 µmol, 61 %
Ausbeute nach HPLC	6.3 mg, 25.9 %
ESI-MS <i>neg. ion mode</i> (m/z)	1214.04 [M] ⁻ , berechnet 1215.45 g/mol [M]
MALDI-TOF (m/z)	1216.51 [M+H] ⁺ , 1239.57 [M-SO ₃ +Na] ⁺ , berechnet 1216.28 g/mol [M].
Bemerkung	Bei diesem Ansatz wurde bis zum Ende der Synthese mit Ac ₂ O/DMF (1:10) <i>gecappt</i> .

Tabelle 22: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids **D2** in ppm bei 285 K in H₂O/D₂O 9:1 pH = 4.0. Kalibriert auf HDO = 4.700 ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'	H ζ
Asn-13	6.584	4.017	2.628	2.628	-	-	-	6.847	7.460	-	-	-
Tyr-14	8.428	4.296	2.680	2.680	-	-	-	6.777	6.777	6.564	6.564	-
Tyr-15	7.933	4.327	2.781	2.662	-	-	-	6.849	6.849	6.572	6.572	-
Thr-16	7.843	4.046	3.911	-	0.940	n.b.	-	-	-	-	-	-
Ser-17	8.065	4.192	3.629	3.629	n.b.	-	-	-	-	-	-	-
Glu-18	8.136	4.464	1.855	1.636	2.257	2.257	-	-	-	-	-	-
Pro-19	-	4.197	2.079	2.079	1.691	1.782	-	3.453	3.558	-	-	-
Ser-20	8.277	4.141	3.639	3.639	n.b.	-	-	-	-	-	-	-
Gln-21	8.248	4.135	1.916	1.753	2.153	2.153	-	-	-	6.707	7.372	-
Lys-22	8.265	4.112	1.686	1.686	1.194	1.194	-	1.451	1.528	2.746	2.746	7.328

7.5.7. Synthese der Peptide F1-F5

In jede der fünf Reaktionskammern (Volumen: 4 mL) des Parallelsyntheseroboters wurden 66.6 mg Fmoc-Ser(*t*Bu)-2-Cl-Trt-Harz (Belegung: 0.6 mmol/g) eingewogen. Das entspricht einer Ansatzgröße von 40 µmol pro Ansatz. Die Synthese der Peptide erfolgte nach AAV 1b. Nach der Überführung des Harzes in eine Glasfritte wurde nach AAV 2 die Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten, um durch Messung der UV-Absorption die Rohausbeute zu bestimmen.

Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz

Die Entschützung und Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgten nach AAV 3c.

Reinigung per HPLC

Die Peptide wurden nach AAV 5b über die präparative C18-Säule mit einer Flussrate von 20 mL/min gereinigt.

Charakterisierung

MALDI-TOF-MS: Das Peptid **F1** wurde in einer α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CCA)-Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ L vermessen.

ESI-MS: Die Peptide **F2-F5** wurden in 99 μ L eines Gemisches aus Wasser und Acetonitril (1:1) gelöst und mit 1 μ L Triethylamin versetzt. Die Messung erfolgt über kontinuierliche Direkteinspritzung im *negative ion mode*. Die Messdauer betrug 90 s.

Tabelle 23: Verwendete Aminosäurederivate und ihre Einwaagen.

Aminosäurederivat	Einwaage [g]	Aminosäurederivat	Einwaage [g]
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	1.22	Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	0.65
Fmoc-L-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH	0.84	Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	0.81
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1.25	Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	1.60
Fmoc-L-Glu(O <i>t</i> Bu)-OH	0.87	Fmoc-L-Tyr(SO ₃)Na (S2)	2.04
Fmoc-L-Ile-OH	1.36	Fmoc-L-Val-OH	0.70
Fmoc-L-Pro-OH	1.30		

Kupplungsanzahl
Kupplungsdauer

Dreifachkupplung
30, 60, 90 min

Peptid **F1**

Molare Masse
Ansatzgröße
Harzmenge
Aktivator
Abspaltung
Rohausbeute
Vorreinigung
HPLC

H₂N-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-COOH

2126.28 g/mol

40 μ mol

66.6 mg

PyBOP bzw. DIPCDI

HFIP/DCM (1:4)

52.9 mg

AAV 3c - Ethervorreinigung

1.0 CV 0-10 % F, 3.0 CV 10 % F, 11.0 CV 10-23 % F, 1.0 CV 23-100 % F.
Das Peptid **F1** eluierte bei 18 % F.

Theoretische Ausbeute
Ausbeute nach Fmoc-Wert
Ausbeute nach HPLC
MALDI-TOF (m/z)
Bemerkung

85.1 mg

20.1 μ mol, 50 %

2.5 mg, 2.9 %

2127.90 [M+H]⁺, berechnet: 2124.93 g/mol [M].

-

Tabelle 24: $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids **F1** in ppm bei 300 K in DMSO-d_6 . Kalibriert auf $\text{DMSO} = 2.530$ ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'
Tyr-3	8.176	4.476	2.982	2.803	-	-	-	7.089	7.089	6.667	6.667
Gln-4	7.860	4.055	1.902	1.902	2.447	2.447	-	-	-	n.b.	n.b.
Val-5	8.066	4.285	2.051	-	0.876	0.876	-	-	-	-	-
Ser-6	8.023	4.381	3.579	3.479	n.b.	-	-	-	-	-	-
Ser-7	8.051	4.648	3.574	3.474	n.b.	-	-	-	-	-	-
Pro-8	-	4.423	2.051	2.051	1.882	1.882	-	3.631	3.631	-	-
Ile-9	7.761	4.066	1.650	-	1.010	1.310	0.726	0.726	-	-	-
Tyr-10	7.842	4.504	2.938	2.687	-	-	-	7.026	7.026	6.627	6.627
Asp-11	8.238	4.621	2.730	2.505	-	-	-	-	-	-	-
Ile-12	7.684	4.192	1.704	-	1.034	1.372	0.731	0.731	-	-	-
Asn-13	8.200	4.557	2.554	2.436	-	-	-	7.538	7.538	-	-
Tyr-14	7.997	4.269	2.842	2.639	-	-	-	6.930	6.930	6.611	6.611
Tyr-15	8.157	4.472	2.986	2.789	-	-	-	7.053	7.053	6.694	6.694
Thr-16	7.772	4.354	4.028	-	1.068	n.b.	-	-	-	-	-
Ser-17	7.871	4.344	3.612	3.612	n.b.	-	-	-	-	-	-
Glu-18	8.008	4.557	1.923	1.725	2.340	2.340	-	-	-	-	-
Pro-19	-	4.431	2.162	2.162	1.882	1.882	-	3.377	3.377	-	-
Ser-20	7.939	4.167	3.665	3.665	n.b.	-	-	-	-	-	-

Peptid F2

Molare Masse

Ansatzgröße

Harzmenge

Aktivator

Abspaltung

Rohausbeute

Vorreinigung

HPLC

Theoretische Ausbeute

Ausbeute nach Fmoc-Wert

Ausbeute nach HPLC

ESI-MS *neg. ion mode* (m/z)

Bemerkung

H₂N-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-COOH

2286.40 g/mol

40 μmol

66.6 mg

PyBOP bzw. DIPCDI

HFIP/DCM (1:4)

40.7 mg

AAV 3c - Ethervorreinigung

1.0 CV 0-10 % F, 3.0 CV 10 % F, 13.0 CV 10-25 % F, 1.0 CV 25-100 % F.

Das Peptid **F2** eluierte bei 18 % F.

91.5 mg

6.7 μmol , 17 %

2.7 mg, 3.0 %

760.51 [M]³⁻, 1141.74 [M]²⁻, berechnet: 2285.05 g/mol [M].

-

Tabelle 25: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids F2 in ppm bei 285 K in H₂O/D₂O 9:1 pH = 4.0. Kalibriert auf HDO = 4.700 ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'
Tyr-3	n.b.	4.008	2.938	2.938	-	-	-	7.012	7.012	7.012	7.012
Gln-4	8.366	4.159	1.713	1.713	2.033	2.033	-	-	-	7.018	7.018
Val-5	8.227	3.856	1.835	-	0.740	0.740	-	-	-	-	-
Ser-6	8.289	4.238	3.615	3.615	n.b.	-	-	-	-	-	-
Ser-7	8.161	4.519	3.603	3.603	n.b.	-	-	-	-	-	-
Pro-8	-	4.123	1.928	1.928	1.726	1.726	-	3.497	3.497	-	-
Ile-9	7.857	3.783	1.463	-	0.847	1.086	0.532	0.532	-	-	-
Tyr-10	7.857	4.209	2.716	2.716	-	-	-	6.816	6.816	6.521	6.521
Asp-11	8.094	4.419	2.622	2.622	-	-	-	-	-	-	-
Ile-12	7.857	3.808	1.569	-	0.916	1.185	0.551	0.551	-	-	-
Asn-13	8.096	4.395	2.413	2.413	-	-	-	7.002	7.002	-	-
Tyr-14	7.857	4.212	2.734	2.734	-	-	-	6.804	6.804	6.912	6.912
Tyr-15	7.857	4.349	2.744	2.744	-	-	-	6.872	6.872	6.575	6.575
Thr-16	7.759	4.055	3.933	-	0.920	n.b.	-	-	-	-	-
Ser-17	8.032	4.183	3.616	3.616	n.b.	-	-	-	-	-	-
Glu-18	8.118	4.438	1.849	1.625	2.232	2.232	-	-	-	-	-
Pro-19	-	4.239	2.022	2.022	1.747	1.747	-	3.655	3.655	-	-
Ser-20	8.127	4.132	3.657	3.657	n.b.	-	-	-	-	-	-

Peptid F3

Molare Masse

Ansatzgröße

Harzmenge

Aktivator

Abspaltung

Rohausbeute

Vorreinigung

HPLC

Theoretische Ausbeute

Ausbeute nach Fmoc-Wert

Ausbeute nach HPLC

ESI-MS *neg. ion mode* (m/z)

Bemerkung

H₂N-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-COOH

2286.40 g/mol

40 μ mol

66.6 mg

PyBOP bzw. DIPCDI

HFIP/DCM (1:4)

35.8 mg

AAV 3c - Ethervorreinigung

1.0 CV 0-10 % F, 3.0 CV 10 % F, 9.5 CV 10-21 % F, 1.0 CV 21-100 % F.

Das Peptid F3 eluierte bei 16 % F.

91.5 mg

5.4 μ mol, 14 %

2.5 mg, 2.7 %

1142.92 [M]²⁻, berechnet: 2285.05 g/mol [M]

-

Tabelle 26: $^1\text{H-NMR}$ -chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids F3 in ppm bei 285 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 pH = 4.0. Kalibriert auf HDO = 4.700 ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'
Tyr-3	n.b.	4.198	2.853	2.853	-	-	-	6.872	6.872	6.608	6.608
Gln-4	8.333	4.190	1.766	1.702	2.054	2.054	-	-	-	6.883	6.883
Val-5	8.213	3.875	1.867	-	0.749	0.749	-	-	-	-	-
Ser-6	8.282	4.275	3.630	3.630	n.b.	-	-	-	-	-	-
Ser-7	8.161	4.216	3.619	3.619	n.b.	-	-	-	-	-	-
Pro-8	-	4.154	1.963	1.963	1.753	1.753	-	3.597	3.597	-	-
Ile-9	7.823	3.785	1.463	-	0.850	1.122	0.500	0.500	-	-	-
Tyr-10	7.908	4.440	2.934	2.733	-	-	-	6.986	6.986	7.025	7.025
Asp-11	8.169	4.445	2.677	2.528	-	-	-	-	-	-	-
Ile-12	7.937	3.817	1.585	-	0.930	1.207	0.557	0.557	-	-	-
Asn-13	8.136	4.435	2.427	2.427	-	-	-	6.716	7.365	-	-
Tyr-14	7.911	4.243	2.720	2.720	-	-	-	6.856	6.856	6.953	6.953
Tyr-15	7.899	4.334	2.829	2.704	-	-	-	6.904	6.904	6.600	6.600
Thr-16	7.787	4.083	3.961	-	0.957	n.b.	-	-	-	-	-
Ser-17	8.050	4.197	3.630	3.630	n.b.	-	-	-	-	-	-
Glu-18	8.139	4.451	1.878	1.660	2.267	2.267	-	-	-	-	-
Pro-19	-	4.213	1.972	1.972	1.706	1.706	-	3.568	3.568	-	-
Ser-20	8.265	4.222	3.689	3.689	n.b.	-	-	-	-	-	-

Peptid F4

Molare Masse

Ansatzgröße

Harzmenge

Aktivator

Abspaltung

Rohausbeute

Vorreinigung

HPLC

Theoretische Ausbeute

Ausbeute nach Fmoc-Wert

Ausbeute nach HPLC

ESI-MS *neg. ion mode* (m/z)

Bemerkung

H₂N-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-COOH

2366.46 g/mol

40 μmol

66.6 mg

PyBOP bzw. DIPCDI

HFIP/DCM (1:4)

38.7 mg

AAV 3c - Ethervorreinigung

1.0 CV 0-10 % F, 3.0 CV 10 % F, 8.0 CV 10-20 % F, 1.0 CV 20-100 % F.

Das Peptid **F4** eluierte bei 14 % F.

94.7 mg

5.4 μmol , 14 %

2.9 mg, 3.1 %

787.57 [M]³⁻, berechnet: 2365.11 g/mol [M]

-

Tabelle 27: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen der Aminosäurespinsysteme des Peptids F4 in ppm bei 285 K in H₂O/D₂O 9:1 pH = 4.0. Kalibriert auf HDO = 4.700 ppm.

	NH	H α	H β	H β'	H γ	H γ'	H γ''	H δ	H δ'	H ϵ	H ϵ'
Tyr-3	5.610	3.986	2.910	2.910	-	-	-	6.994	6.994	6.994	6.994
Gln-4	8.344	4.145	1.739	1.659	2.019	2.019	-	-	-	6.525	6.525
Val-5	8.198	3.842	1.821	-	0.723	0.723	-	-	-	-	-
Ser-6	8.265	4.204	3.578	3.578	n.b.	-	-	-	-	-	-
Ser-7	8.138	4.496	3.564	3.564	n.b.	-	-	-	-	-	-
Pro-8	-	4.107	1.910	1.910	1.703	1.703	-	3.553	3.553	-	-
Ile-9	7.815	4.102	1.429	-	0.811	1.074	0.465	0.465	-	-	-
Tyr-10	7.931	4.375	2.863	2.694	-	-	-	6.932	6.932	6.974	6.974
Asp-11	8.140	4.403	2.620	2.472	-	-	-	-	-	-	-
Ile-12	7.893	3.775	1.541	-	0.881	1.150	0.510	0.510	-	-	-
Asn-13	8.091	4.397	2.376	2.376	-	-	-	7.314	7.314	-	-
Tyr-14	7.869	4.196	2.684	2.684	-	-	-	6.808	6.808	6.908	6.908
Tyr-15	7.851	4.285	2.786	2.632	-	-	-	6.848	6.848	6.552	6.552
Thr-16	7.739	4.039	3.910	-	0.909	n.b.	-	-	-	-	-
Ser-17	8.001	4.148	3.577	3.577	n.b.	-	-	-	-	-	-
Glu-18	8.094	4.434	1.833	1.613	2.211	2.211	-	-	-	-	-
Pro-19	-	4.172	2.012	1.924	1.709	1.709	-	3.640	3.640	-	-
Ser-20	8.167	4.139	3.633	3.633	n.b.	-	-	-	-	-	-

Peptid F5

Molare Masse

Ansatzgröße

Harzmenge

Aktivator

Abspaltung

Rohausbeute

Vorreinigung

HPLC

Theoretische Ausbeute

Ausbeute nach Fmoc-Wert

Ausbeute nach HPLC

ESI-MS *neg. ion mode* (m/z)

Bemerkung

H₂N-Y-Q-V-S-S-P-I-Y-D-I-N-Y-Y-T-S-E-P-S-COOH

2446.52 g/mol

40 μ mol

66.6 mg

PyBOP bzw. DIPCDI

HFIP/DCM (1:4)

46.9 mg

AAV 3c - Ethervorreinigung

1.0 CV 0-10 % F, 3.0 CV 10 % F, 7.0 CV 10-25 % F, 1.0 CV 18-100 % F.

97.9 mg

10.8 μ mol, 27 %

-

-

Das Produkt konnte nicht identifiziert werden.

7.6. STD-NMR-Experimente

Um die Stabilität des Proteins während der Messreihen zu gewährleisten, wurden die Messungen bei möglichst tiefen Temperaturen von 285 K am 700 MHz-Cryo-Probenkopf durchgeführt.

Probenvorbereitung

Um maximale Sensitivität zu erreichen, wurden alle STD-Experimente in Shigemi-NMR Röhren vom Typ BMS-008TB, Shigemi, Inc., Allison Park, PA, USA durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 250-300 μL .

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Peptide **D1**, **D2**, **F2** und **F4** vermessen. Im Folgenden ist aufgeführt, welches Protein bzw. welche Proteinkonzentration verwendet wurde.

Tabelle 28: Protein und zugehörige Ligandenkonzentrationen der durchgeführten STD-Messungen.

Ligand	Protein	Proteinmenge	Proteinkonzentration	Überschüsse für Titration
D1	GP120Bal	150 μg , 1.25 nmol	5.0 μM	5, 10, 20, 40, 60, 100
D4	GP120Bal	150 μg , 1.25 nmol	5.0 μM	5, 10, 20, 40, 60, 100
F2	GP120SF162	100 μg , 0.83 nmol	3.3 μM	5, 10, 20, 40, 60, 100
F4	GP120SF162	150 μg , 1.25 nmol	5.0 μM	5, 10, 20, 40, 60, 100
F4	GP120SF162 + CD4	100 μg , 0.83 nmol	3.3 μM	5, 10, 20, 40, 60, 100

Die Proteine wurden durch wiederholtes Verdünnen und Membranzentrifugation in einen deuterierten Tris-Puffer überführt, so dass 250 μL Lösung mit der in Tabelle 28 aufgeführten Proteinkonzentration erhalten wurden. Nach Überführung in ein Shigemi-NMR Röhren wurde die Ligandkonzentration mit jeder Messung erhöht (Tabelle 28), wobei das Durchmischen mit Hilfe des Shigemi-Glaszylinders durchgeführt wurde.

1D-¹H-STD-NMR-Spektren

Die 1D-¹H-NMR-STD-Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 10.0021 ppm und 32 k Datenpunkten mit WATERGATE Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde über einen T1 ρ -Filter, bestehend aus einem Spinlock-Puls mit einer Länge von 15 ms, bei einer Abschwächung von 9 dB erreicht. Die *on* und *off resonance*-Frequenz der Vorsättigung wechselt nach jedem Scan. Dadurch werden

Subtraktionsartefakte aufgrund von Temperatur- oder Magnetfeldinhomogenitäten minimiert. Während der Aquisition werden *on* und *off resonance*-Spektren in unterschiedliche *memory buffer* geschrieben. Der Phasenzklus wird dabei so gewählt, dass die *on* und *off resonance*-Spektren verschiedene Vorzeichen haben. Addition der beiden FIDs führt dann zum STD-Spektrum.

Der Einstrahlpunkt für die Vorsättigung des Proteins (*on resonance*) lag bei -560 Hz (Spektrometerfrequenz 700 MHz, -0.8 ppm). Die *off resonance*-Frequenz betrug 40000 Hz (57.1 ppm). Die optimale Sättigungsleistung und Sättigungsdauer lag bei 40 db und 4 s. Damit STD-Artefakte aufgrund von direkter Sättigung des Liganden, Aggregationseffekten o. ä. unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden konnten, wurden zu Beginn Ligandenproben mit höchster geplanter Konzentration vermessen, die aber kein Protein enthielten. Bei diesen Messungen wurden die für das Protein optimierten Einstrahlpunkte, Sättigungsleistung und Sättigungsdauer verwendet. Da die aufgetretenden Artefakte deutlich unter einem STD% blieben, konnten diese Parameter für die nachfolgenden Messungen verwendet werden.

Der prozentualen STD-Effekt bzw. STD-Amplifikations-Faktor wurde bestimmt, indem bei jedem Ligandüberschuss ein NMR-Experiment unter identischen Konditionen aufgenommen wurde. Die zu vergleichenden NMR-Experimente wurden mit den gleichen Parametereinstellungen prozessiert. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde durch eine Multiplikation des FID mit einer Exponentialfunktion (Linienverbreiterung um 2 Hz) verbessert und anschließend die Phase korrigiert. Über den Dual-Display Modus in XWINNMR konnten dann die STD-Intensitäten miteinander verglichen werden.

7.7. SPR-Bindungsstudien

Die Biacore-Studien wurden sowohl an einem Biacore 3000 Gerät als auch an einem Biacore J Gerät der Firma BIACORE AB bei einer Temperatur von 298 K durchgeführt. Als Sensorchips wurden ausschließlich CM5-Chips verwendet.

Für die Immobilisierung des GP120 wurde die carboxymethylierte Dextranmatrix zunächst mit einer Mischung aus 0.1 M NHS und 0.1 M EDC für 7 min aktiviert. Anschließend wurde eine Lösung von 4.5 μ L (4.5 μ g) GP120 in 150 μ L Acetatpuffer pH 4.5 mit Hilfe des *Quick Inject*-Befehls über die jeweiligen Flusszellen Fc2-Fc4 geleitet, wobei sie unterschiedlich lange belegt wurden. Zum Schluss wurden die Flusszellen mit 1 M Ethanolamin für 15 min

gecappt. Der gesamte Immobilisierungsvorgang wurde bei einer Flußrate von 5 µL/min am Biacore 3000 bzw. 15 µL/min (*low flow*) am Biacore J durchgeführt.

Die Aktivität des immobilisierten GP120 wurde durch Injektion des natürlichen Liganden CD4 vor und nach den Messungen geprüft. Das CD4 wurde dafür in einer Konzentration von 1 bzw. 1.5 µM (Flussrate *low flow* bzw. 5 µL/min, Assoziationszeit: 11 min) über den Chip geleitet, und die Bindungskurve mit dem Programm *BiaEvaluation* analysiert. Als Negativkontrolle diente das Peptid CGPYSGEPKPKTKIPERRVVTQ, welches kaum Bindung an das GP120 zeigte. Eine Auftragung der maximalen RU-Werte dieses Peptids gegen die Konzentration zeigte, dass die Bindung nur schwach und unspezifisch war.

Für die SPR-Experimente wurden CM5-Chips sowohl mit GP120 (Bal) als auch mit GP120 (SF162) belegt. Im Folgenden sind die Belegungen und Aktivitäten der einzelnen Chips in Tabelle 29 und Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 29: Belegung des 1. CM5-Chips mit GP120 für die Messungen der Peptide A1-A16. Zur Auswertung wurden später die Kurven der Fc2 verwendet.

Flusszelle	GP120	Belegung	(fmol)	% Aktivität	Aktives GP120 (fmol)
Fc1	-	(Referenz)	-	-	-
Fc2	Bal	2989	24.9	27.0	6.7

Tabelle 30: Belegung des 2. CM5-Chips mit GP120 für die Messungen der Peptide D1, D2 und F1-F4. Zur Auswertung wurden später die Kurven der Fc2 verwendet.

Flusszelle	GP120	Belegung	(fmol)	% Aktivität	Aktives GP120 (fmol)
Fc1	-	(Referenz)	-	-	-
Fc2	Bal	9322	77.7	36.2	28.1
Fc3	SF162	7583	63.2	52.9	33.4

Von den Ligandproben wurden Stammlösungen angesetzt, indem der jeweilige Feststoff mit dem Laufpuffer versetzt wurde. Aus dieser Stammlösung wurden dann durch weitere Verdünnungen mit dem Laufpuffer die unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt.

Die Messungen wurden bei einer Flußrate von 10 µL/min am Biacore 3000 bzw. 15 µL/min (*low flow*) am Biacore J durchgeführt. Zu Beginn jeder Messung wurde zunächst abgefüllter Puffer injiziert (*Quick Inject*-Befehl, Assoziationszeit 10 min, Dissoziationszeit 5 min). Anschließend wurde gewartet, bis wieder eine stabile Grundlinie vorlag, dann wurde die

Probe injiziert (*Kinject*-Befehl, Assoziationszeit 10 min, Dissoziationszeit 5 min). Die Regeneration erfolgte mit einem SDS-Puls (0.0025 %) bei einer Flussrate von 35 $\mu\text{L}/\text{min}$. Es wurden bei jedem Liganden für jede Konzentration Doppelbestimmungen durchgeführt, um einen korrekten Wert für das SPR-Signal zu erhalten. Es wurde das SPR-Signal der unbelegten Referenzzelle von dem einer GP120-belegten Zelle abgezogen. Aufgrund von stärkeren SPR-Signalen von reinen Pufferkurven wurde für die Peptide **A2-A16** von diesem Wert zusätzlich das Differenzsignal abgezogen, das sich ergab, wenn reiner Puffer injiziert wurde. Das Pufferdifferenzsignal wurde aus dem Mittelwert von zwei Pufferinjektionen ermittelt, die direkt vor bzw. nach der entsprechenden Peptidinjektion durchgeführt worden waren.

7.8. CD-Messungen

Die CD-Messungen wurden in Wasser mit einer Peptidkonzentration von 20 μM durchgeführt. Nachdem vorab ein Absorptionsspektrum von Wasser aufgenommen wurde, das als Referenz diente, wurde die Messung mit drei Scans über einen Wellenlängenbereich von 260 nm bis 180 nm bei $T = 298 \text{ K}$ durchgeführt. Von den gemessenen Peptidspektren wurde das Referenzspektrum abgezogen. Die anschließende Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms CDPro vorgenommen, wobei die Auswertungsmodule CONTIN, SELCON und CDSSTR zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile genutzt wurden. Diese Module benötigen einen Satz von Referenzproteinen mit bekannter Sekundärstruktur. Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurden von zehn möglichen zwei unterschiedliche Sätze von Referenzproteinen gewählt. Zum einen wurde der Datensatz SP43 (43 lösliche Proteine) und zum anderen SMP56 (43 lösliche Proteine + 13 Membranproteine) gewählt. Die Berechnungen wurden über einen Wellenlängenbereich von 240-190 nm durchgeführt.

7.9. Zellkultur und Zellpräparation

Der Zellrasen, bestehend aus Osteosarkoma HI5- bzw. Parentalzellen, einer 185 cm^2 Zellkulturschale wurde zweimal pro Woche abgeerntet. Dazu wurden zunächst die adhären wachsenden Zellen durch Inkubation bei 37 °C mit 8 mL Trypsin-EDTA-Lösung (0.5 g/L Trypsin und 0.2 g/L EDTA in einer modifizierten Puck's Salzlösung A ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) von der Oberfläche abgelöst. Dieser Vorgang wurde nach 5 min durch Zugabe von 10 mL

Kulturmedium (94 % RPMI 1640, 5 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) gestoppt. Die Zellen wurden für 5 min zentrifugiert (1000 rpm/174 xG), in 10 mL frischem Kulturmedium suspendiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. $3 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter wurden in einer neuen Kulturschale mit 25 mL Kulturmedium ausgesät und bis zur nächsten Ernte bei 37 °C kultiviert. Alle vier Wochen wurden die Parentalzellen mit Neomycin (50 µg/mL Kulturmedium) und die HI5 Zellen mit Puromycin (1 µg/mL Kulturmedium) selektiert.

Für die SPR-Messungen wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und zur Regeneration für 5 min mit 1 mL Kulturmedium bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde abzentrifugiert, dreimal mit 1 mL PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4) gewaschen und in 1 mL entgastem PBS-Puffer aufgenommen. Die Zahl der vitalen Zellen in einer 10 µL Probe wurde durch Zugabe von 10 µL Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Sie lag bei ca. 90 % bezogen auf die Gesamtzellzahl. Anschließend wurde durch Verdünnung die gewünschte Zellkonzentration hergestellt.

8. Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

Tabelle 31: Sicherheitshinweise.

Substanzname	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Ammoniumacetat	Xi	36/37/38	-
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	-
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-tetrafluoroborat	Xi	5/36/37/38	26-36
Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat	Xi	36/37/38	26-36
Butan-1-ol	Xn	10-22-37/38-41-67	7/9-13-26-37/39-46
tert-Butylmethylether	F	11-66	16-23.2-29-33
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33
Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	T+	10-26-41	24-26-28.1-39-45
N,N'-Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid		20/21/22-36/37/38	26-36
N,N'-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure	-	-	24/25
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	-
Glycin	-	-	24/25
1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol	C	20-34	26-36/37/39-45
1-Hydroxybenzotriazol	F	11	7/9-16-33
N-Hydroxysuccinimid	-	-	24/25
Kaliumbromid	Xn	21/22	-
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
4-Methylmorpholin	F, C	11-21/22-34	16-23.2-26-36/37/39-45
Natriumacetat	-	-	24/25
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	22-36/38	26-36

Natronlauge	C	35	26-37/39-45
Phosphorsäure konz.	C	34	26-45
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure konz.	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefeltrioxid-Dimethylformamid-Komplex	C	34	26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
2,2,2-Trifluorethanol	Xn	10-20/21/22 36/38	16-23-28A
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

9. Literaturverzeichnis

1. UNAIDS. Report on the global HIV/AIDS epidemic. 2002.
2. UNAIDS. AIDS Epidemic Update December 2004. 2004.
3. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220: 868-71, 1983.
4. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224: 500-3, 1984.
5. Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., and Kaptue, L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol*, 68: 1581-5, 1994.
6. Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun-Vezinet, F., Simon, F., and Saragosti, S. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol*, 69: 5640-9, 1995.
7. Vanden Haesevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H., and Saman, E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol*, 68 : 1586-96, 1994.
8. Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, 4: 1032-7, 1998.
9. Moore, J. P., Parren, P. W., and Burton, D. R. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol*, 75: 5721-9, 2001.
10. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, 288: 1789-96, 2000.
11. Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M., and Vandamme, A. M. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 6588-92, 2003.
12. Louwagie, J., Delwart, E. L., Mullins, J. I., McCutchan, F. E., Eddy, G., and Burke, D. S. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10: 561-7, 1994.
13. Nkengasong, J. N., Kalou, M., Maurice, C., Bile, C., Borget, M. Y., Koblavi, S., Boateng, E., Sassan-Morokro, M., Anatole-Ehounou, E., Ghys, P., Greenberg, A. E., and Wiktor, S. Z. Comparison of NucliSens and Amplicor monitor assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in plasma of persons with HIV-1 subtype A infection in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Clin Microbiol*, 36: 2495-8, 1998.
14. Turner, B. G. and Summers, M. F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, 285: 1-32, 1999.
15. Johnson, W. E. and Desrosiers, R. C. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med*, 53: 499-518, 2002.

16. Burke, D. S. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis*, 3: 253-9, 1997.
17. Henderson, L. E. and Arthur, L. O. Defeating AIDS: What will it take? *Sci Am*, 279: 61-87, 1998.
18. Wyatt, R. and Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 280: 1884-8, 1998.
19. Stryer, L. *Biochemie*, 4. Auflage. Berlin: Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1996.
20. Pognard, P., Saphire, E. O., Parren, P. W., and Burton, D. R. gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol*, 19: 253-74, 2001.
21. Dewhurst, S. and Whetter, L. Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci*, 2: 147-59, 1997.
22. Bartlett, J. G. and Moore, R. D. Improving HIV therapy. *Sci Am*, 279: 84-7, 89, 1998.
23. Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373 : 123-6, 1995.
24. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271: 1582-6, 1996.
25. Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., and Hahn, B. H. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373: 117-22, 1995.
26. Informationen des Robert Koch Institutes, Hamburg, <http://www.rki.de>. 2000.
27. Janeway, C. and Travers, P. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verlag, 1997.
28. MRC / ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. Concorde Coordinating Committee. *Lancet*, 343: 871-81, 1994.
29. Gunthard, H. F., Frost, S. D., Leigh-Brown, A. J., Ignacio, C. C., Kee, K., Perelson, A. S., Spina, C. A., Havlir, D. V., Hezareh, M., Looney, D. J., Richman, D. D., and Wong, J. K. Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol*, 73: 9404-12, 1999.
30. Pomerantz, R. J. Primary HIV-1 resistance: a new phase in the epidemic? *JAMA*, 282: 1177-9, 1999.
31. Rockstroh, J. K. Antiretroviral therapy of HIV-infections. *Pharm Unserer Zeit*, 29: 284-96, 2000.
32. Pereira, C. F. and Paridaen, J. T. Anti-HIV drug development-an overview. *Curr Pharm Des*, 10: 4005-37, 2004.
33. Imamichi, T. Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr Pharm Des*, 10: 4039-53, 2004.
34. Moore, J. P. and Stevenson, M. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 40-9, 2000.
35. Richman, D. D. HIV chemotherapy. *Nature*, 410: 995-1001, 2001.
36. VaxGen Inc. Brisbane CA. Presseerklärung zur Phase III Studie des Impfstoffs AIDS-VAX, <http://www.vaxgen.com/pressroom/index.html>. 2003.
37. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272: 872-7, 1996.

38. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., and Montagnier, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312: 767-8, 1984-1985.
39. Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, 47: 333-48, 1986.
40. Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 272: 1955-8, 1996.
41. Koolman, J. and Röhm, K.-H. Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 1994.
42. Bowers, K., Pitcher, C., and Marsh, M. CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 871-5, 1997.
43. Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393: 648-659, 1998.
44. Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R. A. A new classification for HIV-1. *Nature*, 391: 240, 1998.
45. Bandres, J. C., Wang, Q. F., O'Leary, J., Baleaux, F., Amara, A., Hoxie, J. A., Zolla-Pazner, S., and Gorny, M. K. Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J Virol*, 72: 2500-4, 1998.
46. Farzan, M., Choe, H., Vaca, L., Martin, K., Sun, Y., Desjardins, E., Ruffing, N., Wu, L., Wyatt, R., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. A tyrosine-rich region in the N-terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol*, 72: 1160-4, 1998.
47. Doranz, B. J., Lu, Z. H., Rucker, J., Zhang, T. Y., Sharron, M., Cen, Y. H., Wang, Z. X., Guo, H. H., Du, J. G., Accavitti, M. A., Doms, R. W., and Peiper, S. C. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 71: 6305-14, 1997.
48. Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A., and Sattentau, Q. J. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science*, 250: 1139-42, 1990.
49. Gallaher, W. R. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell*, 50: 327-8, 1987.
50. Hart, T. K., Kirsh, R., Ellens, H., Sweet, R. W., Lambert, D. M., Petteway, S. R. Jr, Leary, J., and Bugelski, P. J. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 2189-93, 1991.
51. Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Wyatt, R., and Sodroski, J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol*, 68: 469-84, 1994.

52. Papandreou, M. J. and Fenouillet, E. Effect of changes in the glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope on the immunoreactivity and sensitivity to thrombin of its third variable domain. *Virology*, 241: 163-7, 1998.
53. Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R. F., and Pavlakis, G. N. Human Retroviruses and AIDS. a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos National Laboratory. Los Alamos. N. Mex. 92.
54. Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D., and Matthews, T. J. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science*, 250: 1590-3, 1990.
55. Dojahn, J. Kombinatorische Synthese und Untersuchung von V3-Peptiden und Glycopeptidbibliotheken als potentielle HIV Impfstoffe. 2002. Institut für Organische Chemie, Dissertation. Universität Hamburg.
56. Sakaida, H., Hori, T., Yonezawa, A., Sato, A., Isaka, Y., Yoshie, O., Hattori, T., and Uchiyama, T. T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol*, 72: 9763-70, 1998.
57. Ogert, R. A., Lee, M. K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M. A., and Cho, M. W. 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*, 75: 5998-6006, 2001.
58. Chiou, S. H., Freed, E. O., Panganiban, A. T., and Kenealy, W. R. Studies on the role of the V3 loop in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8: 1611-8, 1992.
59. Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Cara, A., Gallo, R. C., and Lusso, P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med*, 2: 1244-7, 1996.
60. Cheng-Mayer, C., Quiroga, M., Tung, J. W., Dina, D., and Levy, J. A. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol*, 64: 4390-8, 1990.
61. Fernandez, E. J. and Lolis, E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 469-99, 2002.
62. Hill, C. M., Kwon, D., Jones, M., Davis, C. B., Marmon, S., Daugherty, B. L., DeMartino, J. A., Springer, M. S., Unutmaz, D., and Littman, D. R. The amino terminus of human CCR5 is required for its function as a receptor for diverse human and simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology*, 248: 357-71, 1998.
63. Bieniasz, P. D. and Cullen, B. R. Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection. *Front Biosci*, 3: 44-58, 1998.
64. Dragic, T., Trkola, A., Lin, S. W., Nagashima, K. A., Kajumo, F., Zhao, L., Olson, W. C., Wu, L., Mackay, C. R., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Moore, J. P., and Maddon, P. J. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, 72: 279-85, 1998.

65. Blanpain, C., Doranz, B. J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S. S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem*, 274: 34719-27, 1999.
66. Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 17: 657-700, 1999.
67. Horuk, R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today*, 20: 89-94, 1999.
68. Dimitrov, D. S., Xiao, X., Chabot, D. J., and Broder, C. C. HIV coreceptors. *J Membr Biol*, 166: 75-90, 1998.
69. Cheng-Mayer, C., Seto, D., Tateno, M., and Levy, J. A. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science*, 240: 80-2, 1988.
70. Scarlatti, G., Tresoldi, E., Bjorndal, A., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H. K., Malnati, M. S., Plebani, A., Siccardi, A. G., Littman, D. R., Fenyo, E. M., and Lusso, P. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med*, 3: 1259-65, 1997.
71. Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52: 145-76, 2000.
72. Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K., and Cullen, B. R. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*, 253: 71-4, 1991.
73. Schreiber, M. Private Mitteilung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg. 2000.
74. Polzer, S. Bedeutung von N-Glycanen im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1. 2002. Institut für Organische Chemie, Dissertation. Universität Hamburg.
75. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86: 367-77, 1996.
76. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382: 722-5, 1996.
77. Atchison, R. E., Gosling, J., Monteclaro, F. S., Franci, C., Digilio, L., Charo, I. F., and Goldsmith, M. A. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science*, 274: 1924-6, 1996.
78. Bieniasz, P. D., Fridell, R. A., Aramori, I., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Cullen, B. R. HIV-1-induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *EMBO J*, 16: 2599-609, 1997.
79. Rucker, J., Samson, M., Doranz, B. J., Libert, F., Berson, J. F., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Broder, C. C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell*, 87: 437-46, 1996.

-
80. Bettelheim, F. R. Tyrosine-O-sulfate in a peptide from fibrinogen. *J Am Chem Soc*, 76: 2838–9, 1954.
 81. Huttner, W. B. Sulphation of tyrosine residues—a widespread modification of proteins. *Nature*, 299: 273-6, 1982.
 82. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D., and Camphausen, R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell*, 103: 467-79, 2000.
 83. Hille, A. and Huttner, W. B. Occurrence of tyrosine sulfate in proteins—a balance sheet. 2. Membrane proteins. *Eur J Biochem*, 188: 587-96, 1990.
 84. Hille, A., Braulke, T., von Figura, K., and Huttner, W. B. Occurrence of tyrosine sulfate in proteins—a balance sheet. 1. Secretory and lysosomal proteins. *Eur J Biochem*, 188: 577-86, 1990.
 85. Baeuerle, P. A. and Huttner, W. B. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J Cell Biol*, 105: 2655-64, 1987.
 86. Lee, R. W. and Huttner, W. B. (Glu62, Ala30, Tyr8)_n serves as high-affinity substrate for tyrosylprotein sulfotransferase: a Golgi enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 6143-7, 1985.
 87. Moore, K. L. The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem*, 278: 24243-6, 2003.
 88. Huttner, W. B. and Baeuerle, P. A. *Modern Cell Biology*. New York: Alan R. Liss Inc., 1988.
 89. Lee, R. W. and Huttner, W. B. Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J Biol Chem*, 258: 11326-34, 1983.
 90. Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N. P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*, 96: 667-76, 1999.
 91. Farzan, M., Vasilieva, N., Schnitzler, C. E., Chung, S., Robinson, J., Gerard, N. P., Gerard, C., Choe, H., and Sodroski, J. A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J Biol Chem*, 275: 33516-21, 2000.
 92. Cormier, E. G., Persuh, M., Thompson, D. A., Lin, S. W., Sakmar, T. P., Olson, W. C., and Dragic, T. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5762-7, 2000.
 93. Choe, H., Li, W., Wright, P. L., Vasilieva, N., Venturi, M., Huang, C. C., Grundner, C., Dorfman, T., Zwick, M. B., Wang, L., Rosenberg, E. S., Kwong, P. D., Burton, D. R., Robinson, J. E., Sodroski, J. G., and Farzan, M. Tyrosine sulfation of human antibodies contributes to recognition of the CCR5 binding region of HIV-1 gp120. *Cell*, 114: 161-70, 2003.
 94. Thompson, D. A., Cormier, E. G., and Dragic, T. CCR5 and CXCR4 usage by non-clade B human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Virol*, 76: 3059-64, 2002.
 95. Cormier, E. G., Tran, D. N., Yukhayeva, L., Olson, W. C., and Dragic, T. Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes. *J Virol*, 75: 5541-9, 2001.
 96. Farzan, M., Chung, S., Li, W., Vasilieva, N., Wright, P. L., Schnitzler, C. E., Marchione, R. J., Gerard, C., Gerard, N. P., Sodroski, J., and Choe, H. Tyrosine-sulfated peptides functionally reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region. *J Biol Chem*, 277: 40397-402, 2002.

97. Dettin, M., Zanchetta, M., Pasquato, A., Borrello, M., Piatier-Tonneau, D., Di Bello, C., and De Rossi, A. CCR5 N-terminus peptides enhance X4 HIV-1 infection by CXCR4 up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 307: 640-6, 2003.
98. Rabut, G. E., Konner, J. A., Kajumo, F., Moore, J. P., and Dragic, T. Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 72: 3464-8, 1998.
99. Seibert, C., Cadene, M., Sanfiz, A., Chait, B. T., and Sakmar, T. P. Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 11031-6, 2002.
100. Smith, D. H., Byrn, R. A., Marsters, S. A., Gregory, T., Groopman, J. E., and Capon, D. J. Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science*, 238: 1704-7, 1987.
101. Trauneker, A., Luke, W., and Karjalainen, K. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature*, 331: 84-6, 1988.
102. Kahn, J. O., Allan, J. D., Hodges, T. L., Kaplan, L. D., Arri, C. J., Fitch, H. F., Izu, A. E., Mordenti, J., Sherwin, J. E., Groopman, J. E., and et, a. l. The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase 1 study. *Ann Intern Med*, 112: 254-61, 1990.
103. Daar, E. S., Li, X. L., Moudgil, T., and Ho, D. D. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 6574-8, 1990.
104. Allaway, G. P., Davis-Bruno, K. L., Beaudry, G. A., Garcia, E. B., Wong, E. L., Ryder, A. M., Hasel, K. W., Gauduin, M. C., Koup, R. A., McDougal, J. S., and et, a. l. Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 11: 533-9, 1995.
105. Jacobson, J. M., Lowy, I., Fletcher, C. V., O'Neill, T. J., Tran, D. N., Ketas, T. J., Trkola, A., Klotman, M. E., Maddon, P. J., Olson, W. C., and Israel, R. J. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis*, 182: 326-9, 2000.
106. Mori, T. and Boyd, M. R. Cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus-inactivating protein, blocks both CD4-dependent and CD4-independent binding of soluble gp120 (sgp120) to target cells, inhibits sCD4-induced binding of sgp120 to cell-associated CXCR4, and dissociates bound sgp120 from target cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 664-72, 2001.
107. Bolmstedt, A. J., O'Keefe, B. R., Shenoy, S. R., McMahon, J. B., and Boyd, M. R. Cyanovirin-N defines a new class of antiviral agent targeting N-linked, high-mannose glycans in an oligosaccharide-specific manner. *Mol Pharmacol*, 59: 949-54, 2001.
108. Wang, J. H., Meijers, R., Xiong, Y., Liu, J. H., Sakihama, T., Zhang, R., Joachimiak, A., and Reinherz, E. L. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10799-804, 2001.
109. Neffe, A. Design, Synthese und Analyse CD4-bindender Peptidomimetika. 2004. Institut für Organische Chemie, Dissertation. Universität Hamburg.

110. Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., and Lusso, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, 270: 1811-5, 1995.
111. Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. A. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382: 829-33, 1996.
112. Trkola, A., Ketas, T. J., Nagashima, K. A., Zhao, L., Cilliers, T., Morris, L., Moore, J. P., Maddon, P. J., and Olson, W. C. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol*, 75 : 579-88, 2001.
113. Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y., Meguro, K., and Fujino, M. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 5698-703, 1999.
114. Dragic, T., Trkola, A., Thompson, D. A., Cormier, E. G., Kajumo, F. A., Maxwell, E., Lin, S. W., Ying, W., Smith, S. O., Sakmar, T. P., and Moore, J. P. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5639-44, 2000.
115. De Clercq, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, 1587: 258-75, 2002.
116. Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J. A., Henson, G., and De Clercq, E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med*, 186: 1383-8, 1997.
117. Neurath, A. R., Strick, N., Jiang, S., Li, Y. Y., and Debnath, A. K. Anti-HIV-1 activity of cellulose acetate phthalate: synergy with soluble CD4 and induction of "dead-end" gp41 six-helix bundles. *BMC Infect Dis*, 2: 6, 2002.
118. Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y. Y., and Debnath, A. K. Cellulose acetate phthalate, a common pharmaceutical excipient, inactivates HIV-1 and blocks the coreceptor binding site on the virus envelope glycoprotein gp120. *BMC Infect Dis*, 1: 17, 2001.
119. Gorny, M. K., Williams, C., Volsky, B., Revesz, K., Cohen, S., Polonis, V. R., Honnen, W. J., Kayman, S. C., Krachmarov, C., Pinter, A., and Zolla-Pazner, S. Human monoclonal antibodies specific for conformation-sensitive epitopes of V3 neutralize human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from various clades. *J Virol*, 76: 9035-45, 2002.
120. Root, M. J., Kay, M. S., and Kim, P. S. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science*, 291: 884-8, 2001.
121. Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M., and Saag, M. S. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*, 4 : 1302-7, 1998.
122. Trimeris Inc. Information on Fuzeon, <http://www.trimeris.com/pipeline/t-20.html>. 2002.
123. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 387: 426-30, 1997.
124. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 89: 263-73, 1997.

125. Ferrer, M., Kapoor, T. M., Strassmaier, T., Weissenhorn, W., Skehel, J. J., Oprian, D., Schreiber, S. L., Wiley, D. C., and Harrison, S. C. Selection of gp41-mediated HIV-1 cell entry inhibitors from biased combinatorial libraries of non-natural binding elements. *Nat Struct Biol*, 6: 953-60, 1999.
126. Eckert, D. M., Malashkevich, V. N., Hong, L. H., Carr, P. A., and Kim, P. S. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*, 99: 103-15, 1999.
127. Kullmann, W. *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton. 1987.
128. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., and Boyer, H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198: 1056-63, 1977.
129. Merrifield, R. B. Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol*, 21: 412, 1962.
130. Sheppard, R. C. *Peptides "Solid phase peptide synthesis: assessment of the present position"*. Amsterdam: North Holland Publishing Company, 111-25, 1971.
131. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L., and Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett*, 30: 2739-42, 1989.
132. Carpino, L. A., El-Faham, and Albericio, F. Racemization studies solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Lett*, 35: 2279-2282, 1994.
133. Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc*, 115: 4397-98, 1993.
134. Kröplien, B. *Synthese eines N-Typ-Glycopeptides analog der dritten extrazellulären Loop des humanen Corezeptors CCR5 und Bindungsstudien am gp120 des HIV-1*, Diplomarbeit, 2000. Institut für Organische Chemie, Hamburg.
135. Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B. *Massenspektren in Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. New York: S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1995.
136. Zenobi, R. and Knochenmuss, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 17: 337-66, 1998.
137. Lottspeich, F. and Zorbas, H. *Bioanalytik*. Berlin: Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1998.
138. Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 3. Auflage. New York: Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
139. Braunschweiler, L. and Ernst, R. R. Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *J Magn Reson*, 53: 521-28, 1983.
140. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R. *J Chem Soc*, 71: 4546-53, 1979.
141. Kessler, H., Gehrke, M., and Griesinger, C. *Angew Chem*, 100: 507-54, 1988.
142. Galla, H. J. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. New York: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988.
143. Firmansyah, J. and Jianxing, S. Structural and unfolding study of a well-folded β -turn isolated from human EphrinB2, a bi-directional signal protein, National University of Singapore, Scientific Papers, <http://staff.science.nus.edu.sg>. 2004.
144. Cantor, C. R. and Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman, 1980.
145. Winter, R. and Noll, F. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner, Stuttgart, 1998.

146. Sreerama, N. and Woody, R. W. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci*, *13*: 100-12, 2004.
147. Turbadar, T. Complete absorption of light by thin metal films. *Proc Phy Soc*, *73*: 40-4, 1959.
148. Weimar, T. Neue Trends bei der Verwendung von Biosensoren aus der Basis evaneszierender Wellen. *Angew Chem*, *112*: 1271-4, 2000.
149. Informationen der Firma BIACORE AB, Uppsala, <http://www.biacore.com>.
150. Holmes, S. D., May, K., Johansson, V., Markey, F., and Critchley, I. A. Studies on the interaction of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore). *J Microbiol Meth*, *28*: 77-84, 1997.
151. Xing, L., Tjarlund, K., Lindqvist, B., Kaplan, G. G., Feigelstock, D., Cheng, R. H., and Casasnovas, J. M. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J*, *19*: 1207-16, 2000.
152. Quinn, J. G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B. D., and O'Kennedy, R. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem*, *281*: 135-43, 2000.
153. Karlsson, R. and Stahlberg, R. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal Biochem*, *228*: 274-80, 1995.
154. Meinecke, R. and Meyer, B. Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin alphaIIb beta3. *J Med Chem*, *44*: 3059-65, 2001.
155. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*, *38*: 1784-8, 1999.
156. Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M., and Meyer, B. Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J Am Chem Soc*, *121*: 5336-7, 1999.
157. Mayer, M. and Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc*, *123*: 6108-17, 2001.
158. Möller, H., Serttas, N., Paulsen, H., Burchell, J. M., Taylor-Papadimitriou, J., and Meyer, B. NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3. *Eur J Biochem*, *269*: 1444-55, 2002.
159. Meyer, B., Klein, J., Mayer, M., Meinecke, R., Möller, H., Neffe, A., Schuster, O., Wülken, J., Ding, Y., Knaie, O., Labbe, J., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., Wagner, B., and Ernst, B. Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy to Identify Ligand Epitopes and Binding Specificities in Leucocyte Trafficking - The Role of Fucosyltransferases and Selectines. *Springer Berlin*, *44*: 149-68, 2004.
160. Meyer, B. and Peters, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew Chem Int Ed*, *42*: 864-90, 2003.
161. Jayalakshmi, V. and Krishna, N. R. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson*, *155*: 106-18, 2002.
162. Meinecke, R. STD NMR Spektroskopie zur Untersuchung der Bindungsspezifität des integralen Membranproteins alphaIIb-beta3 auf Liposomen und intakten Thrombozyten. 2003. Institut für Organische Chemie, Dissertation. Universität Hamburg.

163. Kühnemund, T. Synthese und Strukturuntersuchungen von Peptiden aus dem N-terminalen Bereich des humanen CCR5 mit anschließenden Bindungsstudien am HIV-Glycoprotein gp120, Diplomarbeit, 2000. Institut für Organische Chemie, Hamburg.
164. BIAevaluation. Software Handbook, Version 3.0. A-6, July 1997.
165. Kitagawa, K., Futaki, S., Yagami, T., Sumi, S., and Inoue, K. Solid-phase synthesis of cionin, a protochordate-derived octapeptide related to the gastrin/cholecystokinin family of peptides, and its mono-tyrosine-sulfate-containing derivatives. *Int J Pept Protein Res*, *43*: 190-200, 1994.
166. Kitagawa, K., Aida, C., Fujiwara, H., Yagami, T., and Futaki, S. Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: Part II. Total synthesis of human big gastrin-II and its C-terminal glycine-extended peptide (G34-Gly sulfate) by the solid-phase segment condensation approach. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *49*: 958-63, 2001.
167. Yagami, T., Shiwa, S., Futaki, S., and Kitagawa, K. Evaluation of the final deprotection system for the solid-phase synthesis of Tyr(SO₃H)-containing peptides with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-strategy and its application to the synthesis of cholecystokinin (CCK)-12. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *41*: 376-80, 1993.
168. Kitagawa, K., Aida, C., Fujiwara, H., Yagami, T., Futaki, S., Kogire, M., Ida, J., and Inoue, K. Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: total synthesis of human big gastrin-II and cholecystokinin (CCK)-39. *J Org Chem*, *66*: 1-10, 2001.
169. Kitagawa, K., Aida, C., Fujiwara, H., Yagami, T., and Futaki, S. Efficient Solid-Phase Synthesis of Sulfated Tyrosine-Containing Peptides Using 2-Chlorotrityl Resin: Facile Synthesis of Gastrin/Cholecystokinin Peptides. *Tetrahedron Letters*, *38*: 599-602, 1997.
170. Yagami, T., Kitagawa, K., Aida, C., Fujiwara, H., and Futaki, S. Stabilization of a tyrosine O-sulfate residue by a cationic functional group: formation of a conjugate acid-base pair. *J Pept Res*, *56*: 239-49, 2000.
171. HIV Sequence Database, <http://www.hiv.lanl.gov>. 2005.
172. Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E., and Wuthrich, K. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy. *J Biomol NMR*, *12*: 1-23, 1998.

Mein Dank gilt

- Meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung, die Studium und Promotion erst ermöglicht haben.
- Nancy und Rolf Mittelbach für die jahrelange Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte zur richtigen Zeit.
- Boris Kröplien für die jahrelange hervorragende Zusammenarbeit in allen Bereichen und die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge während dieser Zeit.
- Birgit Claasen für die schöne Zeit in Labor 20, den vielen Beratungen zum midas-Problem und die Überlassung ihres Autos für die Fahrten nach Lübeck.
- Mirko Lindner für den notwendigen sportlichen Ausgleich, der gleichzeitig Raum für etliche interessante Diskussionen bereit hielt.
- Christian Flüge für die Zusammenarbeit an verschiedenen Projekten und die Überlassung seines Autos für die Fahrten nach Lübeck.
- Winrich Scherres für die zahlreichen langen Abende bei sunshinelive und Malzbier im Computerraum.
- Dirk Rehders für den hohen Arbeitseinsatz als Schwerpunktpraktikant und die lustige Zeit.
- Dr. Patrick Ziegel Müller, Dr. Edzard Spillner und der ganzen Hamburger Biochemie für die Unterstützung beim Anzüchten der Zellen.
- Frau Dr. Hanne Peters, Dr. Thomas Weimar und Thies Köhli für Tipps, Tricks und Seelsorge am Biacore3000 in Lübeck.
- Mirko Lindner, Boris Kröplien und Dennis Wilhelm für das exzellente Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich für die freundliche Unterstützung und die schöne Zeit danken...

Marco Axmann, Atilla Coksezen, Jörg Dojahn, Florian Ende, Thomas Hackl, Martin Hollinger, Britta Hünnefeld, Robin Job, Kolja Klein, Martina Krasova, Vera Leitmann, Moriz Mayer, Robert Meinecke, Sonja Meyer, Heiko Möller, Ilona Grüneberg, Olaf Nagel, Nicolai Nagorny, Axel Neffe, Erika Paul, Svenja Scheid, So-Young Shin, Volker Sinnwell, Jutta Tost, Katharina Wallach, Jan-C. Westermann ...

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Thomas Kühnemund
Geburtsort/-datum Hamburg, 29.03.1973

Ausbildung

1980 - 1984 Grundschule (Altstadt-Schule-Wedel)

1984 - 1993 Johann-Rist-Gymnasium in Wedel, Abitur Juni 1993

1993 - 1994 Grundwehrdienst in der Dithmarsen-Kaserne in Albersdorf

1994 - 1996 Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg,
Vordiplom: 21.10.1996 (Note: gut)

1996 - 2000 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg,
Diplom: 21.12.2000 (Note: sehr gut)

03-12.2000 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg,
betreut durch Prof. Dr. B. Meyer. Thema: Synthese und Struktur-
untersuchungen von Peptiden aus dem N-terminalen Bereich des humanen
CCR5 mit anschließenden Bindungsstudien am HIV-Glycoprotein gp120.

Seit 03.2001 Dissertation bei Prof. Dr. B. Meyer. Thema: Synthese von Peptiden aus dem
N-terminalen Bereich des humanen CCR5 unter Verwendung von
Sulfotyrosinen und deren Bindung an das HIV-Glycoprotein GP120.

Anstellungsverhältnisse

04.1997 - 04.1998 Wissenschaftliche Hilfskraft an der GKSS, Geesthacht, Aufbau des
Elbeinformationssystems für Forschung und Verwaltung ELBiS.

03.1999 - 11.1999 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Hamburg für das IOP-Projekt
(*International Odra Project*).

06.1999 Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Probennahme an der Oder in Polen im
Rahmen des IOP-Projektes (*International Odra Project*).

04.2000 - 12.2000 Computerbetreuung des Instituts für Organische Chemie.

01.2001 - 02.2001 Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Prologo Biochemie GmbH, Hamburg.

- 03.2001 - 09.2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg.
- 11.2001 - 12.2001 Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum in Organischer und Anorganischer Chemie für Medizinstudenten, Medizinische Universität zu Lübeck.
- 03.2002 - 04.2002 Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum in Organischer und Anorganischer Chemie für Medizinstudenten, Medizinische Universität zu Lübeck.
- 10.2002 - 09.2005 Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum in Organischer Chemie für Chemiestudenten und Lehramtsstudenten, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
- 08.2004 - 01.2005 Glycopeptidauftragssynthese, GEPEP, Hamburg.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg den 22. Dezember 2005