

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden Peptide und N-Typ Glycopeptide der V3-Loop des Glycoproteins GP120 aus dem HIV synthetisiert. Zu diesem Zweck sind neue Verfahren für die effiziente Darstellung der Glycosylaminosäurebausteine, die in der Glycopeptidsynthese benötigt werden, entwickelt worden. Der entscheidende Schritt war die direkte Verknüpfung der Aminofunktion des ungeschützten Glycosylamins mit der Seitenkette einer teilweise geschützten Asparaginsäure. Mit Hilfe dieser Reaktion konnte die Ausbeute an N<sub>9</sub>-Chitobiosylaminosäurebaustein **10** auf 79 % bezogen auf den ungeschützten Zucker optimiert werden. Die so optimierten Synthesebedingungen konnten auf das biantennäre Decasaccharid **11** übertragen werden.

Bei der Verknüpfung des Glycosylasparaginbausteins mit der Peptidkette tritt als Nebenreaktion die Aspartimidbildung auf, die den Baustein zerstört. Diese unerwünschte intramolekulare Reaktion konnte durch die Verwendung von TBTU als Aktivator weitgehend unterdrückt werden. Bei einem 1.2-fachem Überschuß an Glycosylasparaginbaustein beträgt die Ausbeute 78 %. Während der Abspaltung der Glycopeptide von der Festphase traten zwei Probleme auf. Zum einen wird in Gegenwart von 1,2-Ethandithiol und Phenol, welche zur Entfernung der Pmc-Schutzgruppe des Arginins notwendig sind, auch der Saccharidteil vom Peptid abgespalten. Durch den Einsatz der Pbf-Schutzgruppe kann auf den Zusatz der Nucleophile verzichtet werden. Zum anderen anomerisiert das Glycopeptid zum Teil in der normalen Abspaltlösung. Verwendet man jedoch nur 2% Wasser und 98% TFA, wird ausschließlich das gewünschte  $\beta$ -verknüpfte Glycopeptid abgespalten, wobei trotzdem die Entfernung aller Schutzgruppen möglich ist. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke ist durch die Oxidation mittels Luftsauerstoff möglich, so daß es unter Standardabspalt- und -aufarbeitungsbedingungen zu intermolekularen Reaktionen der Peptidketten kommt. Bei der Durchführung dieser Schritte in einer Stickstoffatmosphäre mit anschließender Zyklisierung durch Luftsauerstoff in hochverdünnter Lösung kann die Disulfidbrücke gezielt intramolekular geschlossen werden.

Mit Hilfe dieser optimierten Bedingungen konnten acht Peptide und vier Glycopeptide synthetisiert werden. Um beurteilen zu können, welcher Teil der V3-Loop für die Interaktion mit dem Rezeptor auf der T-Zelle relevant ist,

wurde diese in drei Peptide unterteilt, das C-terminale Fragment TRPSNNTRKS **16**, den Mittelteil IHIGPGRAFYATG **17** und den N-Terminus EIIGDIRQAH **18**. Zusätzlich wurden zwei weitere Peptide, die auch das GPGRAF-Motiv beinhalten, RIHIGPGRAF **15** und SNNTRKSIHIGPGRAF **21** synthetisiert. Als Referenzpeptid wurde außerdem die glycosylierbare Sequenz VHLNESV **19** dargestellt. Um den Einfluß der Disulfidbrücke auf die biologische Aktivität und die Konformation zu analysieren, wurde neben der disulfidzyklisierten V3-Loop CTRPSNNTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHC **24** durch den Austausch der Cysteine in Threonine die offenkettige V3-Loop TTRPSNNTRKSIHIGPGRAF-YATGEIIGDIRQAHT **23** dargestellt. Zur Beurteilung der Rolle der Glycosylierung wurden zu den Peptiden **19**, **21** und **2** die entsprechenden Glycopeptide VHLN( $\beta$ -D-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc)ESV **20**, SN( $\beta$ -D-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAF **22**, CTRPSN( $\beta$ -D-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc)-NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHC **25** und CTRPSN(komplex-Typ-Decasaccharid)NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHC **26** synthetisiert.

In T-Zell-Proliferations-Assays, die in der Arbeitsgruppe von Dr. Schreiber durchgeführt wurden, zeigte sich, daß nur die großen Peptide **23** und **24** und das Glycopeptid **25** der V3-Loop einen stimulierenden Einfluß auf das Wachstum von T-Zellen haben, während Bruchstücke der V3-Loop - glycosyliert und unglycosyliert - keinen signifikanten Einfluß auf das T-Zell-Wachstum zeigten. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß es auf der Zelloberfläche einen Rezeptor für V3-Peptide und Glycopeptide gibt, der nur ein erweitertes Epitop auf der vollständigen V3-Loop erkennt. Des Weiteren besitzen die Verbindungen in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 10  $\mu\text{mol/L}$  keinen toxischen Einfluß auf die Zellen.

Nach der Charakterisierung aller Verbindungen erfolgte eine Strukturanalyse der offenkettigen V3-Loop **23**, der zyklisierten V3-Loop **2** und der glycosylierten, zyklisierten V3-Loop **25** mittels 2D-NMR-, Distance-Geometry- und Molekül-Dynamik-Methoden. Aus den mittels 2D-NMR bestimmten Abständen und Winkeln wurden mit dem DG-Programm DYANA jeweils 500 mögliche Strukturen berechnet. Diejenige Struktur, die am besten mit den experimentell bestimmten Werten übereinstimmte, wurde anschließend als Startstruktur für eine 100 ps MD-Simulation in einer Wasserbox benutzt. Aus diesen Berechnungen wird deutlich, daß die offenkettige Verbindung **23** deutlich flexibler ist als die beiden disulfidverbrückten V3-Loops **2** und **25**. Vergleicht man die beiden

zyklischen Verbindungen miteinander, so besitzt die unglycosylierte V3-Loop **2** eine gestrecktere Struktur als die glycosylierte Verbindung **25**. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Glycosylierung der V3-Loop einen stabilisierenden Effekt auf die dreidimensionale Struktur ausübt.

## 9.1 Summary

The synthesis of peptides and glycopeptides of the V3-loop of the gp120 of HIV is described in this thesis. For the synthesis of glycopeptides new syntheses of glycosyl amino acid building blocks were developed. The important optimization step in the newly developed synthesis is the direct formation of the linkage of an unprotected glycosylamin with the sidechain carboxy group of a suitably protected aspartate. Using the new synthetic sequence of the Ng-chitobiosyl-asparagine building block **10** the yield could be optimized to 79 % relative to the unprotected sugar. These conditions could successfully be applied to a complex type decasaccharide **11**

A major problem during the connection of a glycosyl amino acid building block to the growing peptide chain is the formation of an aspartimid that cannot react with the free amino group. The unwanted reaction could be suppressed by the use of TBTU as an activator. With only a 1.2 molar excess of the glycosyl amino acid building block yields of 78% could be reached. The cleavage of the glycopeptide from the solid support led to two problems. The presence of 1,2-ethanedithiol and phenol is necessary to cleave the Pmc protecting group from the arginin. However, this cocktail also cleaves the carbohydrate peptide linkage. Using the Pbf protecting group instead on the arginin did not require the use of the nucleophilic dithiol nor the phenol for deprotection. The other problem was the anomerization of the glycosidic linkage when the water contents of the cleavage and deprotection cocktail was as usual 5%. Using only 2% water with 98% TFA lead to only the desired deprotected b-glycoside. The formation of the disulfide bridge can be achieved by oxidation with air. However, this leads to the unwanted formation of intermolecular oligomerization products during the deprotection step. Conducting these steps in a nitrogen atmosphere and cyclization in an extremely diluted solution led to the wanted intramolecular cyclization.

Using these optimized reaction conditions eight peptides and four glycopeptides were synthesized. To assess the importance of the individual sections of the V3-loop for the interaction with receptors on a T-cell three segments were synthesized. The C-terminal fragment TRPSNNTRKS **16**, the internal segment IHIGPGRAFYATG **17** and the N-terminus EIIGDIRQAH **18** For reference purposes a short peptide outside the V3-loop that is glycosylated

in the normal gp120 was also synthesized VHLNESV **19**. Two additional peptides containing the GPGRAPH motif were synthesized: RIHIGPGRAPH **15** and SNNTRKSIHIGPGRAPH **21**. To study the effect of the cyclization on the biological activity an open chain variant of the V3-loop CTRPSNTRKSIHIGPGRAPHFYATG-EIIGDIRQAHC **2** was prepared that differed by replacing the cysteins with threonins TTRPSNTRKSIHIGPGRAPHFYATG-EIIGDIRQAHT **23**. To analyze the effect of the glycosylation of the peptides **19**, **21** and **2** the glycopeptides VHLN(b-D-GlcNAc-(1-4)-b-D-GlcNAc)ESV **20**, SN(b-D-GlcNAc-(1-4)-b-D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAPH **22**, CTRPSN(b-D-GlcNAc-(1-4)-b-D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAPHFYATG-EIIGDIRQAHC **25**, and CTRPSN(complex-type-decasaccharide)NTRKSIHIGPGRAPHFYATG-EIIGDIRQAHC **26** were synthesized.

T-cell proliferation assays that were performed in the group of Dr. Schreiber showed, that only large peptides and glycopeptides of the V3-loop had a stimulating influence on the growth of the cells. Shorter glycosylated and unglycosylated fragments of the V3-loop had no significant influence on the growth of T-cells. These results demonstrate that T-cells contain a receptor for V3-peptides and glycopeptides that requires extended epitopes of the V3-loop. None of the compounds tested had a toxic effect on the T-cells in a concentration range of 2 to 10  $\mu\text{mol/L}$ .

Following the synthesis and characterization of the compounds the 3D-structures of the open chain V3-loop **23**, the disulfide cyclized V3-loop **2** and the glycosylated, cyclized V3-loop **25** were analyzed by 2D-NMR-, distance geometry and molecular dynamics methods. The distances and dihedral angles from the 2D-NMR analysis were fed into the distance geometry DYANA to yield 500 possible structures. The structure with the best agreement to the experimental data was subsequently used as a starting structure for a 100 ps MD simulation of the peptides/glycopeptides in a water box. It becomes obvious from these calculations that the open chain V3-loop is expectedly significantly more flexible than the other two disulfide closed V3-loops. Comparison between the two cyclical structures shows that the unglycosylated V3-loop adopts a slightly more stretched structure than the glycosylated compound. These results show that the glycosylation exhibits a stabilizing effect on the 3D-structure of the V3-loop.