

SELEKTION UND
CHARAKTERISIERUNG VON
HIV-1 V3-SPEZIFISCHEN
ANTIKÖRPERFRAGMENTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Department Chemie

vorgelegt von

Mirko Lindner

im Januar 2007



Universität Hamburg

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von November 2003 bis November 2006 am Institut für Organische Chemie des Departments Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg durchgeführt. Tag der Disputation: 30. März 2007.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe wirken zu dürfen sowie für die stets motivierende und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Humane Immunschwäche Virus (HIV)	1
1.1.1	AIDS und das HI-Virus	1
1.1.2	Beschreibung des Erregers	2
1.1.3	Wirtszellen des HI-Virus	2
1.1.4	HIV-Lebenszyklus	3
1.1.5	Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	3
1.1.6	Infektionsmechanismus	4
1.1.7	Das HIV-Glycoprotein gp120	5
1.1.8	Die V3-Region des gp120	6
1.1.9	Therapieansätze zur HIV-Bekämpfung	7
1.2	Antikörper und Antikörperfragmente	9
1.2.1	Immunglobuline	9
1.2.2	Therapeutische Antikörper	10
1.2.3	Das Antikörperfragment scFv	11
1.3	Antikörper im Zusammenhang mit HIV-1	12
1.3.1	Antikörper induzierende Epitope von HIV-1	12
1.3.2	V3-Antikörper	14
1.4	Methoden	16
1.4.1	Peptidsynthese	16
1.4.2	Synthese von Glycopeptiden	17
1.4.3	<i>Phage Display</i> Technologie	18
1.4.4	SPR-Bindungsstudien	20
1.4.5	Sättigungstransfer-Differenz (STD) NMR Spektroskopie	23
2.	PROBLEMSTELLUNG	25
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	26
3.1	Peptide und Peptidkonjugate	26
3.1.1	Darstellung der Glycosylaminosäure Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH	26
3.1.2	Peptide und Glycopeptide	27
3.1.3	Biotinylierte Glycopeptide	28
3.1.4	BSA-Peptidkonjugate	29
3.2	Selektion von Antikörperfragmenten	30
3.2.1	Selektionsstrategie I	30
3.2.2	Selektionsstrategie II	34
3.2.3	Selektionsstrategie III	36
3.2.4	Selektionsstrategie IV	36
3.2.5	Selektion mit immobilisiertem gp120	38
3.2.6	Vergleichender ELISA mit scFv P2 und IgG3 447-52D	40
3.3	Sequenzanalyse	42
3.4	Expression der scFv	43
3.5	SPR-Studien	47
3.5.1	SPR-Interaktionsanalyse der scFv mit V3-Peptiden	47
3.5.2	Kinetik der Interaktion von scFv P2 mit dem V3-Glycopeptid <i>p1c</i>	55
3.5.3	SPR-Interaktionsanalyse der scFv D26 mit einem V3-IgYΔC1-Konstrukt	58
3.5.4	SPR-Interaktionsanalyse von scFv und gp120-Isolaten	59
3.5.5	Kinetik der Interaktion von scFv P2 und D26 mit gp120-Isolaten	65

3.5.6	SPR-Interaktionsanalyse mit einem D26 scFv-IgEAC1-Konstrukt.....	67
3.5.7	SPR-Interaktionsanalysen zur Ermittlung der Epitope.....	69
3.5.8	Versuche zu weiteren SPR-Experimenten.....	73
3.6	STD NMR Experimente.....	74
3.6.1	STD NMR mit scFv-präsentierenden Phagen.....	74
3.6.2	STD NMR mit scFv und großen Überschüssen von V3-Peptiden.....	77
3.6.3	STD NMR mit scFv und geringen Überschüssen von V3-Peptiden.....	79
3.6.4	STD NMR mit scFv P2 und geringen Überschüssen von V3-Peptiden.....	84
3.6.5	STD NMR mit scFv D26 und geringen Überschüssen von V3-Peptiden.....	88
3.6.6	STD NMR basierte Epitope.....	89
3.7	Externe HIV-1 Neutralisationsstudien.....	92
3.8	Abschließende Diskussion und Ausblick.....	93
4.	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
5.	SUMMARY.....	100
6.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	102
6.1	Materialien und Chemikalien.....	102
6.1.1	Materialien.....	102
6.1.2	Geräte.....	103
6.1.3	Chemikalien.....	104
6.1.4	Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	104
6.1.5	Oligonukleotide.....	105
6.1.6	scFv-Phagemid Bibliothek.....	105
6.1.7	Antikörper und Antikörperkonjugate.....	105
6.1.8	Proteine und Proteinkonjugate.....	106
6.1.9	Puffer und Lösungen.....	107
6.1.10	Standards.....	108
6.1.11	Zellkulturmedien.....	108
6.2	Darstellung von Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH.....	109
6.3	Peptid- und Glycopeptidsynthese.....	115
6.3.1	Automatisierte Festphasenpeptidsynthese.....	115
6.3.2	Kupplung von Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH.....	115
6.3.3	Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Methylenfluoren-Monitoring.....	116
6.3.4	Biotinylierung der Peptide am Harz.....	116
6.3.5	Deacetylierung der Glycopeptide am Harz.....	116
6.3.6	Abspaltung der Peptide vom Harz.....	116
6.3.7	Produktaufreinigung mittels RP-HPLC.....	117
6.3.8	Darstellung von BSA-Peptid-Konjugaten.....	117
6.3.9	Tabellarische Auflistung von Daten zu den Peptidsynthesen.....	118
6.4	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	124
6.5	NMR Spektroskopie.....	125
6.5.1	Allgemeines zur Probenaufnahme.....	125
6.5.2	Charakterisierung der Peptide.....	125
6.6	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	130
6.6.1	Wachstum von Bakterienzellkulturen.....	130
6.6.2	Selektion von <i>E. coli</i> -Zellen.....	130
6.6.3	Lagerung von Bakterien-Kolonien.....	130
6.6.4	Lagerung von Phagen.....	131
6.6.5	Wachstum und Replikation der <i>Griffin.1</i> Bibliothek.....	131

6.6.6	Infektion von <i>E. coli</i> Zellen mit Helferphagen	131
6.7	Allgemeine proteinchemische Methoden.....	132
6.7.1	Durchführung von ELISA-Varianten	132
6.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	133
6.7.3	Färbung von Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen	134
6.7.4	Western Blot	134
6.7.5	Immunprinting	134
6.8	Selektion von scFv-präsentierenden Phagen	135
6.8.1	Überblick über das methodische Vorgehen	135
6.8.2	Vorselektion in der Vertiefung einer ELISA-Platte	135
6.8.3	Vorselektion im Immunröhrchen.....	136
6.8.4	Vorselektion gegen Streptavidin-Eisenoxidpartikel	136
6.8.5	Selektion in Lösung	136
6.8.6	Selektionen mit kompetitiver Zugabe des Peptids <i>p8</i>	137
6.8.7	Selektionen mit immobilisiertem gp120	137
6.8.8	Vermehrung der eluierten Phagen	137
6.9	Sequenzierung der scFv	138
6.9.1	Plasmid-DNA-Isolierung.....	138
6.9.2	Polymerase-Kettenreaktion zur Sequenzierung der Plasmid-DNA	138
6.9.3	Fällung von DNA	139
6.9.4	Sequenzanalyse.....	139
6.10	Expression von scFv	140
6.10.1	Transformation der Phagemidvektoren von TG1- in HB2151-Zellen.....	140
6.10.2	Expression von scFv (50 mL Kultur)	140
6.10.3	Expression von scFv (3 L Kultur)	140
6.10.4	Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	140
6.10.5	Biotinylierung von scFv	141
6.10.6	Konzentrationsbestimmung der scFv-Lösungen	141
6.11	SPR-Bindungsstudien.....	143
6.11.1	Immobilisierung von Peptiden durch Aminkupplung	143
6.11.2	Immobilisierung von gp120-Isolaten durch Aminkupplung	143
6.11.3	Immobilisierung von Peptiden durch Thiolkupplung.....	144
6.11.4	Aufnahme und Auswertung von Messreihen	144
6.11.5	Kompetitionsexperimente zur Epitopbestimmung am Biacore <i>T100</i>	145
6.12	STD NMR Spektroskopie	146
6.12.1	Phagenpräparation für STD NMR Experimente.....	146
6.12.2	Probenbereitung für STD NMR Experimente mit scFv	146
6.12.3	Aufnahme von STD NMR Spektren	146
6.12.4	Aufnahme von STD-Titrationsreihen.....	147
6.12.5	Auswertung von STD-Titrationsreihen	147
ANHANG	151	
I.	Prozeduren für den Syntheseroboter (ACT MOS 496Ω).....	151
II.	Sequenzausschnitt: pHEN2 Phagemidvektor	153
III.	Sequenzen ausgewählter Klone	154
IV.	STD NMR Pulsprogramme.....	158
V.	Toxikologie und Handhabung der Chemikalien.....	162
LITERATURVERZEICHNIS.....	164	

Abkürzungsverzeichnis

A, Amp	Ampicillin
aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
Ab	Antikörper (<i>Antibody</i>)
ABTS	2,2'-Azino-bis(2-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammonium-Salz
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
att _{sat}	Attenuierung des Proteinvorsättigungspulses
B	Biotin, Biotinyl-Linker
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Fötale Kälberserum Albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCA	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
cf	<i>continuous flow</i> -Verfahren
cfu	<i>colony forming units</i>
Chi	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosaminyl-β-(1-4)- <i>N</i> -acetyl-D-glucosamin
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CRFs	<i>Circulating Recombinant Forms</i>
ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser (0.2 μS·cm ⁻¹)
DC	dendritische Zellen (<i>Dendritic Cells</i>)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
δ _{sat}	chemische Verschiebung der Frequenz für Proteinvorsättigung
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
E1 _{cb}	Eliminierung über die konjugierte Base
EBV	Epstein Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (USA)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FKS	Fötale Kälberserum
G, Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose
gp	Glycoprotein
GPCR	<i>G-Protein Coupled Chemokine Receptor</i>
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
Hel	Hühnereiweiß-Lysozym (<i>Hen egg lysozyme</i>)

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
hmAb	humaner monoklonaler Antikörper (<i>human monoclonal Antibody</i>)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
HSPG	Heparansulfatproteoglycane
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>Immobilized Metalion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
k	1 k entspricht 1024 scans
K, Kan	Kanamycin
ka	Assoziationsrate (für 1:1-Interaktion [$M^{-1}s^{-1}$])
kb	Kilobasenpaare
kd	Dissoziationsrate [s^{-1}]
K_A	thermodynamische Assoziationskonstante [M^{-1}]
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante [M]
K_D^*	K_D aus k_a und dem niedrigsten k_d -Wert bestimmt
LB	<i>Line Broadening</i> Faktor für exponentielle Multiplikation
LTNP	<i>Long Term Non-Progressor</i>
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal Antibody</i>)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
Man	Mannose
MCS	Klonierungsstelle (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MP	Milchpulver
MPBS	PBS, mit Milchpulver versetzt
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molmassengrenze (<i>Molecular Weight Cut Off</i>)
MPER	<i>Membrane-Proximal External Region</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NNRTI	Nicht-Nukleosid/Nukleotid-analoge Hemmer der Reversen Transkriptase
NOESY	<i>Nuclear Overhauser exchange and Enhancement Spectroscopy</i>
NRTI	Nukleosid/Nukleotid-analoge Hemmer der Reversen Transkriptase
ns	<i>number of scans</i> ; Einheit: 1k = 1024 scans
NTA	<i>Nitrilo-Triacetic Acid</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy-)valeriansäure
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphat Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDEA	2-(2-Pyridinyldithio)ethanaminhydrochlorid
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
Pip	Piperidin
PBMC	periphere Lymphozyten (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)

POD	Peroxidase
PS	Polystyrol
Resp.Diff.	Signal der SPR-Messungen [RU] (<i>Response Difference</i>)
RNA	Ribonucleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RU	<i>Resonance Unit</i> (Einheit bei SPR-Messungen)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
sCD4	Fragment des CD4 (<i>solubleCD4</i>), 46 - 55 kD
scFv	einzelkettiges Antikörperfragment (<i>single-chain antibody fragment</i>)
Sia	Sialinsäure (<i>N-Acetylneuraminsäure</i>)
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
ssRNA	<i>single stranded RNA</i> (einzelsträngige RNA)
Strep	Streptomycin
STD	Sättigungstransfer-Differenz (<i>Saturation Transfer Difference</i>)
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-[<i>N-maleimidomethyl</i>]cyclohexan-1-carboxylat
TAE	Tris-Acetat-Puffer mit EDTA
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TOF	<i>Time Of Flight</i>
TPBS	PBS mit 0.1 % (v/v) Tween 20
TPPI	<i>Time Proportional Phase Increment</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
t _{sat}	Rezeptorvorsättigungszeit bei einem STD NMR Experiment
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat 20
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
v/v	Volumen pro Volumen
VH	Variable Region der leichten Kette
VL	Variable Region der schweren Kette
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	x-faches der Gravitation

Aminosäuren

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

1. Einleitung

1.1 Das Humane Immunschwäche Virus (HIV)

1.1.1 AIDS und das HI-Virus

Im Juni 1981 begann mit einer Veröffentlichung des „U.S. Centers for Disease Control and Prevention“ die Dokumentation von AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), eine der verheerendsten Epidemien der Menschheit.¹ Allein im Jahr 2005 starben 3.1 Millionen Menschen an diesem Syndrom, welches durch ein Versagen des Immunsystems charakterisiert ist.² Als Verursacher des Syndroms konnte das Humane Immunschwäche Virus (HIV) identifiziert werden.^{3;4} Im Allgemeinen führt die HIV-Infektion nach mehreren symptomfreien Jahren zum Ausbruch des als AIDS bezeichneten Endstadiums. Zum jetzigen Zeitpunkt leben weltweit etwa 40 Millionen mit dem HI-Virus infizierte Menschen von denen etwa 570000 pro Jahr an dieser Infektion versterben. Im Jahr 2005 haben sich rund fünf Millionen Menschen neu mit HIV infiziert. In den südlich der Sahara gelegenen afrikanischen Staaten ist AIDS bereits die häufigste Todesursache.



Abb. 1.1 Verteilung der etwa 40 Millionen mit HIV infizierten Menschen Ende 2005.²

Man vermutet, dass zwischen 2002 und 2010 ohne eine deutliche Verstärkung der Präventionsbemühungen noch zusätzlich 45 Millionen Menschen mit HIV infiziert werden können, wobei der asiatisch pazifische Raum als besonderes stark betroffene Region angesehen wird.²

Es gibt zwei Arten von HIV, die sich innerhalb dieser Arten in eine Vielzahl von Subtypen einteilen lassen. HIV-1 kommt weltweit vor, HIV-2 dagegen hauptsächlich in

West-Afrika und weist weniger pathogenes Potential auf.^{5,6} Im Laufe der Zeit diversifizierte sich HIV-1 in viele Subtypen mit unterschiedlicher geographischer Prävalenz. Aufgrund von Sequenzanalysen unterteilt man in M- (*main*), N- (*new*) und O- (*outlier*) Obersubtypen, wobei 99% aller HIV-1-Infektionen Subtypen der M-Gruppe zuzuordnen sind (Subtypen A bis K). In Amerika, Europa und Australien dominiert Subtyp B, in Südafrika und Indien Subtyp C, in Thailand Subtyp E und in Zentralafrika koexistieren verschiedene Subtypen mit dem Subtyp A. Zudem ist verstärkt das Auftreten von hybriden Subtypen, den CRFs, zu verzeichnen.⁷ Es ist erwähnenswert, dass selbst innerhalb eines Subtypus die HI-Viren in ihrer Erbinformation um bis zu 10% divergieren können. Aufgrund genetischer Vergleiche mit HIV-2 wird vermutet, dass sich das HIV vom SIV herleitet und vor etwa 50 Jahren in Zentralafrika vom Affen auf den Menschen übergegangen ist.⁸

1.1.2 Beschreibung des Erregers

Das HI-Virus gehört zur Gruppe der Retroviren, da sich seine Erbinformation auf einzelsträngiger RNA (ssRNA) befindet. Darüber hinaus gehört dieses Virus zur Familie der Lentiviren, welche sich durch eine relativ lange Latenzzeit auszeichnen. Die äußere Hülle eines HI-Virions wird durch eine aus der Wirtszelle hervorgegangenen Lipiddoppelschicht gebildet, mit der die viralen Glycoproteine gp41 und gp120 assoziiert sind. Das transmembrane gp41 liegt als Trimer vor und bindet nichtkovalent das ebenfalls trimer vorliegende Glycoprotein gp120. Das aus Einheiten des Proteins p24 aufgebaute Capsid beinhaltet das Genom in Form zweier ssRNA-Kopien zusammen mit der Reversen Transkriptase (RT), der HIV-Protease und der Integrase. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit einer RNaseH-Domäne. Die dimere HIV-1 Protease ist eine Aspartatprotease, welche Zymogene spaltet. Das dritte Enzym, die Integrase, vermag die revers transkribierte ssRNA in Form von cDNA in das Erbgut der Wirtszelle zu integrieren.^{9,10}

1.1.3 Wirtszellen des HI-Virus

Die Wirtszellen dieses Virus sind sogenannte CD4⁺ Lymphozyten, zu welchen im Wesentlichen T-Helfer-Zellen (T_H) und Makrophagen gehören.¹¹ Beide Zelltypen sind von zentraler Bedeutung im Rahmen der Immunabwehr. So stimulieren T_H-Zellen beispielsweise durch Ausschüttung von Interleukinen die Proliferation von B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen.¹² Neben CD4 benötigt das HI-Virus zur erfolgreichen Penetration der Zelle einen weiteren Rezeptor. Aus einer Vielzahl von gefundenen Rezeptoren stellten sich CXCR4 und CCR5 als die *in vivo* wichtigsten HIV-Korezeptoren heraus, wobei mit Progression der Infektion ein Wechsel von R5- zu X4-

tropen HIV-Stämmen auftritt.¹³⁻¹⁶ Diese Korezeptoren gehören zu den Chemokin-Rezeptoren und haben eine sieben-helix transmembran Struktur. Eine alternative Bezeichnung dieser Stämme ist M-trop (Makrophagen) und T-trop (T-Zellen), korrespondierend zu den Korezeptor tragenden Wirtszellen.

1.1.4 HIV-Lebenszyklus

Nach dem Andocken des Virus durch Interaktion mit CD4- und einem Korezeptor, folgt die Membranfusion und das freigesetzte Genom wird durch die viruseigene RT in cDNA umgeschrieben (Abb. 1.2). Die cDNA wird Integrase vermittelt in das Genom der Zelle eingefügt. Die Wirtszelle transkribiert diese DNA in mRNA, welche zu viralen Proteinen translatiert wird.¹⁷ Aus den neu entstandenen Hüllproteinen und viraler RNA entstehen in einem Abschnürungsprozess neue Virionen, wobei von den infizierten CD4⁺ Lymphozyten täglich bis zu 10¹⁰ Virionen produziert werden.^{18;19}

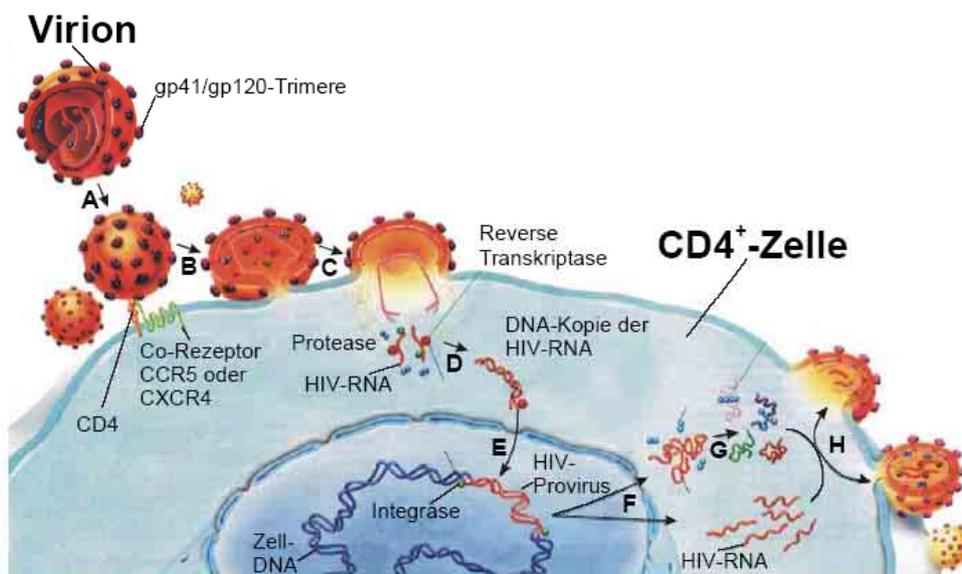


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des HIV-Lebenszyklus; A: Interaktion von gp120 mit CD4 und einem Korezeptor; B: gp41 vermittelte Membranverschmelzung; C: Freisetzung viraler RNA und Enzyme; D: DNA-Kopie; E: Integration viraler Erbinformation ins Genom der Wirtszelle; F: Expression viraler Bestandteile; G und H: Assembly und Knospung neuer Virionen.²⁰

1.1.5 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Im Verlauf einer HIV-Infektion kommt es nach unspezifischen Symptomen innerhalb der ersten Wochen (Akutphase, hoher HIV-Titer) zu einem oftmals Jahre anhaltenden symptomfreien subklinischen Zustand, in dem ein Gleichgewichtszustand zwischen absterbenden und nachgebildeten CD4⁺ Lymphozyten vorliegt.²¹ Die Fehlerrate der HIV-1-Transkriptase ist bedingt durch das Fehlen einer Exonucleasefunktion etwa 10 mal höher als

die anderer Polymerasen. Dadurch kann HIV sowohl dem Immunsystem als auch medikamentösen Eingriffen unter Ausbildung von Fluchtmutanten entgehen. Nach mehreren Jahren kommt es zum Übergang zu AIDS, bei dem der HIV-Titer zunimmt und die Anzahl der CD4⁺ Lymphozyten dramatisch abfällt. Das Immunsystem vermag nun nicht mehr normalerweise harmlose Mikroorganismen zu bekämpfen, wodurch es zu lebensbedrohlichen Sekundärinfektionen kommt. Ein Kriterium für das Eintreten des Vollbildes von AIDS ist, wenn der CD4⁺ Lymphozyten-Titer auf weniger als 200 Zellen/ μ L Blut gegenüber etwa 1000 Zellen/ μ L bei gesunden Menschen abfällt.²²

1.1.6 Infektionsmechanismus

Die Erregerübertragung erfolgt durch Intim- und Blutkontakte. Frauen können HIV auf ihr Kind während der Schwangerschaft oder bei der Geburt übertragen. Nach Übertragung der HI-Viren übernehmen vermutlich unreife dendritische Zellen (DC) den Transport zu den regionären Lymphknoten, in denen dann die Infektion von CD4⁺ T-Lymphozyten stattfindet. Schlüsselprotein ist dabei das C-Typ Lektin DC-SIGN, welches HI-Viren zu assoziieren und stabilisieren vermag. Der molekulare Mechanismus dieser *trans*-Verstärkung ist jedoch noch kaum verstanden.^{23;24} Im Rahmen der initialen Kontaktaufnahme zwischen Virus und mit niedrigen CD4-Rezeptoranzahlen versehenen Makrophagen scheinen auch Syndecane von Bedeutung. Sie gehören zu den Heparansulfatproteoglycanen und sind auf der Oberfläche der Wirtszellen präsent.^{25;26}

Schon seit 1984 ist die Bedeutung der Interaktion des viralen gp120 mit dem Protein CD4 bekannt (Abb. 1.3).¹¹ Sie führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des gp120 und somit zur Präsentation einer Korezeptor-bindenden Domäne, der V3-Region.^{27;28}

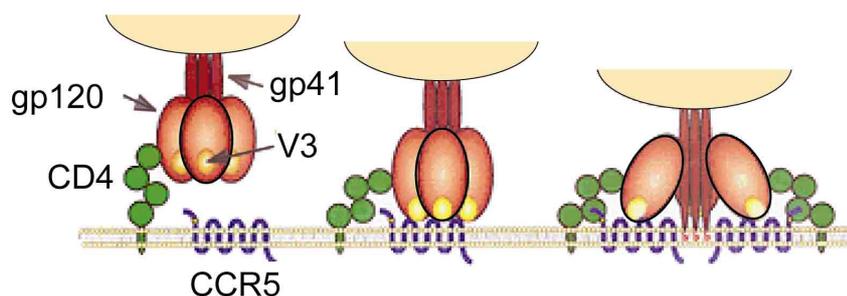


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der viralen Komplexe aus den Glycoproteinen gp120 und gp41 und ihre Interaktion mit den Rezeptoren CD4 und CCR5 humaner Lymphozyten.²⁹

Die Wechselwirkung zwischen gp120 und dem Korezeptor (CCR5, CXCR4) wiederum führt zu einer Destabilisierung des gp120-gp41-Komplexes.^{28;30} Eine dadurch hervorgerufene Änderung der Tertiärstruktur von gp41 führt schließlich zur Einleitung der noch

nicht vollständig aufgeklärten Membranverschmelzung, die vermutlich über eine als „*Trimer of Hairpins*“ bezeichnete Zwischenstufe verläuft.^{31,32} Wie in einem Modellsystem gezeigt wurde, kann die HIV-Infektion von Zellen auch über Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgen.³³

1.1.7 Das HIV-Glycoprotein gp120

Das gp120 des HIV-1 enthält fünf variable Regionen (V1 bis V5), getrennt von fünf konservierten Regionen (C1 bis C5). Seine Tertiärstruktur wird durch neun Disulfidbrücken mitbestimmt. Bemerkenswert ist der hohe Glycosylierungsgrad. Etwa die Hälfte des Molekulargewichtes entfällt auf die Kohlenhydratanteile.^{34,35} Die N-Typ Glycosylierungsstellen des gp120 gehören zu den in Abb. 1.4 dargestellten Typen.

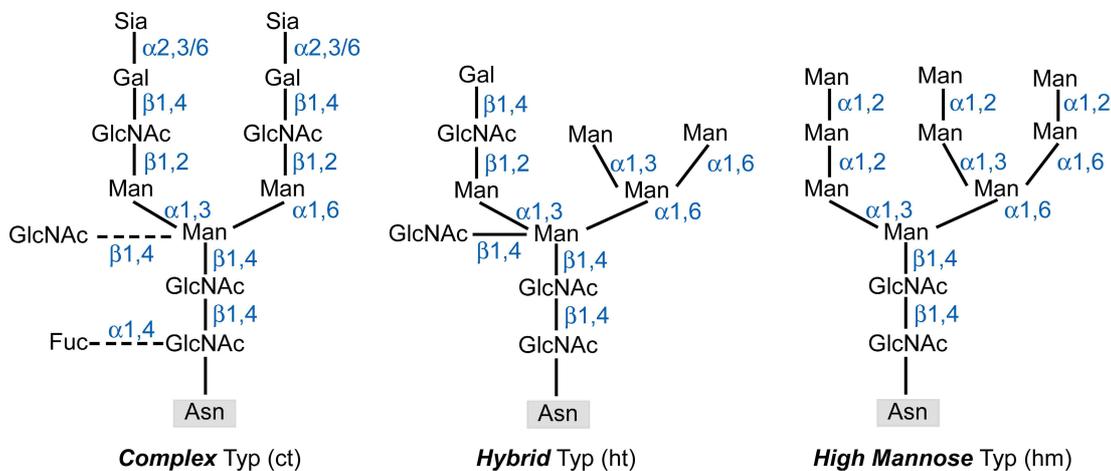


Abb. 1.4 Strukturen von N-Typ Glycosylierungen.³⁶

Die Bedeutung des hohen Glycosylierungsgrades von gp120 liegt nach Wei und Kang in der Fähigkeit des Virus, durch ein dynamisches Kohlenhydratschutzschild einer effektiven Immunantwort zu entgehen.³⁷

Das strukturelle Rückgrat des gp120, welches als *Bridging Sheet* bezeichnet wird, ist ein aus den V1/V2- und C4-Regionen zusammengesetztes antiparalleles β -Faltblatt. Eine Struktur des vollständigen Glycoproteins liegt derzeit nicht vor. Ein detaillierter Einblick in Wechselwirkung von gp120 mit CD4 konnte jedoch erstmals 1998 aus einer Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et. al.* erhalten werden.³⁸ Den Autoren gelang es, einen heterotrimeren Komplex aus einem gp120-Fragment, den V1/V2 Domänen von CD4 und einem F_{ab}-Fragment eines monoklonalen Antikörpers kokristallisieren. Aus der Strukturanalyse ergab sich, dass das von CD4 erkannte Epitop diskontinuierlicher Natur ist. Im Jahr 2005 gelang es Huang *et. al.* einen Komplex aus einem V3-Region beinhaltenden gp120-Fragment, einem Antikörper und einer CD4-Domäne zu kristallisieren.³⁹

1.1.8 Die V3-Region des gp120

Wie von Cocchi *et. al.* im Jahr 1996 gezeigt, ist die V3-Domäne des gp120 essentiell für den HIV-Entry über CCR5 und CXCR4.⁴⁰ Im Einklang mit diesen Studien haben Antikörper, die an die V3- oder an die durch CD4 induzierte Region binden, ein die Infektion inhibierendes Potential.²⁸ Zudem gelang es, innerhalb der V3-Region bedeutsame Positionen für die Korezeptorinteraktion zu ermitteln.⁴¹⁻⁴⁴

Die Konsensussequenz der V3-Region von HIV-1 Subtyp B ist 35 Aminosäuren lang und terminiert durch zwei hochkonservierte Cysteine, durch welche eine zyklische Struktur vorliegt (V3-Loop).^{45;46} Obgleich die V3-Region als variable Region definiert ist, gibt es innerhalb dieser durchaus einige Positionen an denen Aminosäuren hochkonserviert vorkommen (Abb. 1.5).^{45;47-49}

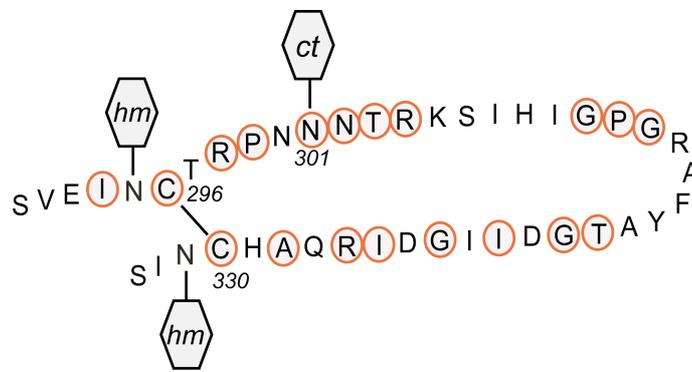


Abb. 1.5 Primärstruktur der V3-Loop des HIV-1 gp120 mit angrenzenden Sequenzbereichen. Die abgebildete Sequenz entspricht dem Konsensus von 17974 veröffentlichten Sequenzen aller Subtypen der Länge von 35 Aminosäuren;⁵⁰ unterlegt sind die Positionen die zu über 94% konserviert sind; hm: „high mannose“ Glycosylierung; ct: „complex“-Typ Glycosylierung.

Die Spitze der V3-Loop beinhaltet das in allen Subtypen hochkonservierte GPG-Motiv, welches bei Subtyp B auf GPGRAF verlängert ist. Es bildet eine Typ-II β -Schleife, welche entscheidend die Tertiärstruktur prägt. Außer den aufgelösten Strukturen des V3-beinhaltenen gp120-Konstrukts von Kwang *et. al.*³⁹ sowie von V3-Antikörperkomplexen^{51;52} liegen keine detaillierten Strukturdaten über die native Konformation der V3-Region vor.

Die V3-Loop ist kationischer Natur, wobei mit zunehmender positiver Ladung von bis zu neun ein Tropismuswechsel von R5 nach X4 zu beobachten ist.⁵³ Die positive Ladung der V3-Loop steht zudem auch im Zusammenhang mit der Interaktion von polyanionischen Verbindungen der Wirtszellen mit den HI-Viren.⁵⁴

Innerhalb der V3-Loop befindet sich vorzugsweise bei R5-tropen Stämmen an Position N301 eine N-Glycosylierung komplexen Typs, welche etwa den gleichen Raum beansprucht, wie der V3-Proteinanteil.⁵⁵ Für diese Glycosylierung an N301 liegen experimentelle Daten vor, die deutlich einen Einfluss auf die Korezeptorinteraktion

aufzeigen.⁵⁶⁻⁵⁹ Eine direkte Beteiligung der *N*-Acetylglucosamine der *core*-Region an der CCR5-Korezeptorwechselwirkung wurde nachgewiesen.^{41;60;61}

1.1.9 Therapieansätze zur HIV-Bekämpfung

Der Übergang von der symptomfreien Phase der HIV-Infektion zu AIDS kann heutzutage durch Therapien deutlich verzögert werden. Seit 1987 werden überwiegend Inhibitoren der beiden viralen Enzyme Reverse Transkriptase (NRTI, NNRTI) und Protease (PI) eingesetzt.^{62;63} Diese Medikamente werden Rahmen einer Kombinationstherapie, die mit HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) abgekürzt wird, verabreicht. Eine vollständige Bekämpfung der Infektion kann jedoch nicht erreicht werden, so dass diese mit teilweise schweren Nebenwirkungen behafteten Medikamente über Jahre hinweg eingenommen werden müssen. Neben der Weiterentwicklung dieser Medikamente bietet gerade der HIV-Infektionsmechanismus Ansatzmöglichkeiten der Inhibition.⁶⁴ Auf der Suche nach Eingriffspunkten für diese als Fusions- und *Entry*-Inhibitoren bezeichnete Wirkstoffklasse bieten sich verschiedene Ziele an.

Das virale Protein gp41 ist durch seine Funktion im Membranverschmelzungsprozess ein wichtiges Angriffsziel. Abgeleitet von der Sequenz des gp41, verhindert das Peptid FUZEON[®] (Efuvirtide, T20) die Membranverschmelzung. FUZEON ist der wichtigste Vertreter seiner Klasse und ist als einziger bereits Bestandteil von HAART-Therapiekonzepten.^{65;66}

Eine antagonistische Blockierung von CXCR4 scheint nicht ohne Risiko zu sein, da eine Deletion des CXCR4-Gens bei Mäusen zu tödlichen Entwicklungsstörungen des Fötus führte.⁶⁷ Es gibt dennoch einige Beispiele nicht toxischer niedermolekularer (AMD3100) und peptidischer (T22, T134) Inhibitoren.⁶⁸⁻⁷⁰ Da ein gewisser Anteil der weißen Bevölkerung keinen funktionalen CCR5-Rezeptor aufweist (Δ 32-Deletion), erscheint eine Blockierung dieses Korezeptors weniger bedenklich.^{71;72} Neben CCR5-spezifischen Antikörpern gibt es niedermolekulare CCR5-Inhibitoren wie zum Beispiel die Verbindung SCH-351125.⁷³ Ein kürzlich entwickelter Inhibitor basiert auf RANTES, einem der natürlichen Liganden von CCR5.⁷⁴

Abgeleitet vom diskontinuierlichen Epitop des gp120 bezüglich CD4 wurden von Meyer *et. al.* peptidomimetische Liganden entwickelt, die derzeit auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht werden.⁷⁵

Aus der Beobachtung heraus, dass kohlenhydratbindende Proteine Deletionen von Glycosylierungsstellen verursachen können, ergibt sich die Hoffnung den Virus auf diese Weise dem Immunsystem zugänglicher zu machen.^{76;77}

In Kapitel 1.3 dieser Arbeit werden Problematiken bei der Suche nach einem breit einsetzbaren Impfstoff erläutert. Diese intensiven, jedoch bislang erfolglosen Bemühungen sind begründet. So haben in Niedrig- und Mittel-Einkommensländern weniger als 4% der HIV-Infizierten die Möglichkeit, die derzeit existierenden teuren Medikamente dauerhaft zu beziehen.

Über die bisher angesprochenen Punkte hinaus stellen sämtliche Prozesse des Lebenszyklus potentielle Ziele und intensiv bearbeitete Forschungsschwerpunkte dar.⁷⁸ Ein einzelnes Medikament wird auf lange Sicht hin nicht in der Lage sein, die HIV-Infektion vollständig zu eliminieren. Je mehr Stadien des viralen Lebenszyklus allerdings effektiv entgegengewirkt werden kann, desto geringer ist die Chance, dass es zur Entstehung und Vermehrung von Fluchtmutanten kommt. Unstrittig ist, dass die zentrale Rolle bei der Epidemiebekämpfung der Prävention zukommen sollte. Entsprechende Bemühungen werden in einigen Ländern jedoch durch infrastrukturelle und gesellschaftspolitische Probleme stark behindert.⁷⁹

1.2 Antikörper und Antikörperfragmente

1.2.1 Immunglobuline

Antikörper (Immunglobuline, Ig) sind Teil des Immunsystems höherer Vertebraten, dessen Aufgabe der Schutz vor Infektionen durch Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze ist. Die Aufgabe der Antikörper liegt im Wesentlichen in der spezifischen Bindung von Antigenen, an die sich dadurch weitere Schritte zur Zerstörung des Pathogenes anschließen können.¹² Es wird geschätzt, dass der Mensch ein Repertoire von mehr als 10^8 Antikörpern verschiedener Spezifitäten ausbildet. Diese Vielfalt wird durch einen modularen Aufbau gewährleistet. Als Beispiel einer von fünf vorkommenden Isotypen mit unterschiedlicher Funktion und Bedeutung, ist in Abb. 1.6 eine schematische Darstellung eines IgG zu sehen. Dieses Immunglobulin kommt in einer verzögerten Phase der Immunantwort mit Konzentrationen von bis zu 12 mg pro Milliliter Serum vor und hat ein Molekulargewicht von etwa 150 kD.

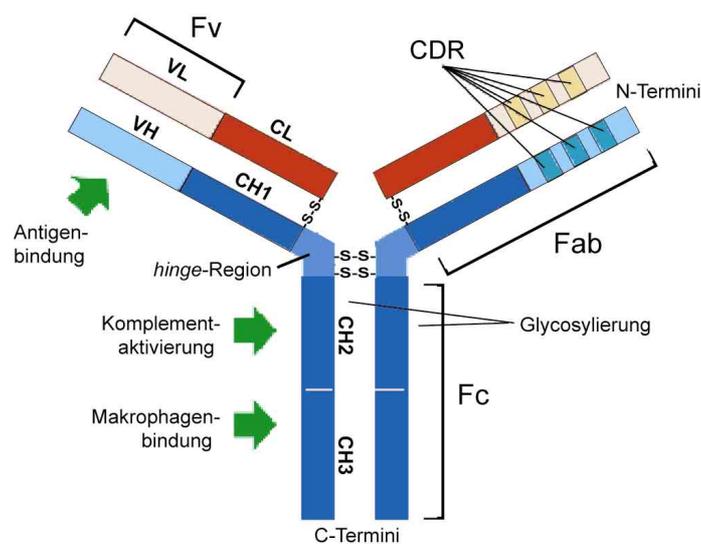


Abb. 1.6 Schematische Darstellung eines IgG mit Nomenklatur und Funktion der Domänen.⁸⁰

Für die Antigenspezifität ist die Fv-Region (*variable fragment*) von Bedeutung. Sie enthält die drei hypervariablen Regionen (*complementary determining regions*, CDR) der schweren und leichten Kette, welche die Kontaktstelle des Antikörpers zum Antigen bilden. Der restliche Teil der variablen Region stabilisiert gerüstartig die räumliche Anordnung der hypervariablen Bereiche durch eine für Antikörper typische β -Faltblattstruktur, die auch als *framework* bezeichnet wird.

1.2.2 Therapeutische Antikörper

Monoklonale Antikörper weisen Spezifität gegen ein singuläres Epitop auf und sind daher von besonderer Bedeutung für die Charakterisierung von Epitopen sowie für eine Vielzahl von Anwendungen in der Therapie und Diagnostik. Im Bereich des therapeutischen Einsatzes spricht man auch von passiver Immunisierung. Seit Dezember 2006 gibt es bereits 18 von der amerikanischen FDA zugelassene monoklonale therapeutische Antikörper, die zum Beispiel erfolgreich im Zusammenhang mit Krebstherapie, Transplantatabstoßung oder Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.⁸¹ Der Wirkmechanismus kann dabei unterschiedlich sein. So kann ein Antikörper als Agens eingesetzt werden, welches selektiv Cytokine oder Toxine bindet und somit Signalkaskaden oder Toxifikationen unterbricht. Konjugiert an ein Radionuklid oder an bioaktive Moleküle kann ortsspezifisch eine Wirkung erzielt werden. Im Sinne der natürlichen Funktion von Antikörpern kann über den Fc-Teil gezielt die Zerstörung von markierten Zellen durch das Immunsystem des Patienten eingeleitet werden. Bezogen auf Viren sind mehrere Wirkmechanismen zu diskutieren. Die Bindung eines Antikörpers an das Virus kann für sich bereits neutralisierend sein oder auch durch Aktivierung des Komplementsystems Lyse und Phagozytose der Viren einleiten. Darüber hinaus spielen antivirale Antikörper auch bei der Interaktion mit viralen Proteinen auf der Oberflächen von bereits infizierten Zellen eine wichtige Rolle (Zell-Lyse und Inhibition der Freisetzung neuer Viruspartikel).⁸²

Humane monoklonale Antikörper (hmAbs) sind prinzipiell durch eine Reihe von Eigenschaften ideale Wirkstoffe. Sie werden als körpereigen erkannt, haben bis zu drei Wochen lange Halbwertszeiten, können endogene Krankheitsbekämpfungsmechanismen komplementieren und weisen hohe Bindungsaffinitäten (nM-fM) verbunden mit hoher Spezifität auf. Die Fortschritte der Molekularbiologie wirkten sich drastisch auf die Selektionsmöglichkeiten sowie die rekombinante Erzeugung nahezu vollständig humaner Antikörper aus.⁸³ Die Verabreichung von Antikörpern kann nur durch regelmäßige Injektion erfolgen. Dieser Umstand, verbunden mit den derzeit noch bis zu hundertfach höheren Herstellungskosten verglichen mit niedermolekularen Wirkstoffen, limitieren den uneingeschränkten Einsatz therapeutischer Antikörper. In diesem Zusammenhang sind jedoch auch die höheren Entwicklungskosten für niedermolekulare Wirkstoffe zu berücksichtigen.⁸⁴

1.2.3 Das Antikörperfragment scFv

Die kleinste von humanen Immunglobulinen abgeleitete antigenbindende Einheit stellt das scFv (*single-chain Fv*) dar. Ein scFv besteht aus der VH und der VL-Domäne eines Antikörpers, welche aus je etwa 109 Aminosäuren aufgebaut sind. Da zwischen den Fv-Regionen der schweren und leichten Kette keine intermolekulare Disulfidbrücke besteht, müssen die VH- und VL-Domänen über einen Peptidlinker stabilisiert werden (Abb. 1.7).

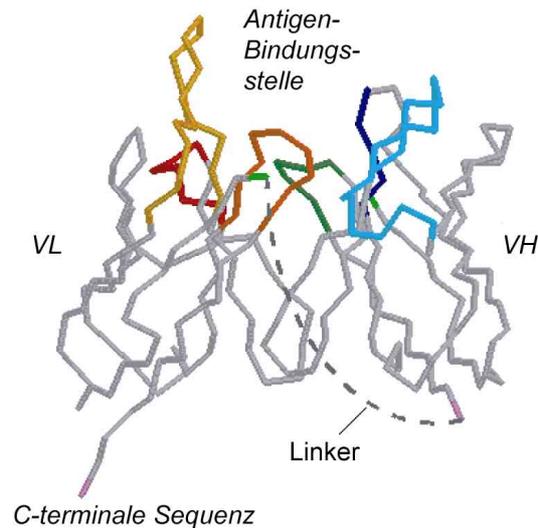


Abb. 1.7 Darstellung des C_{α} -Aminosäurerückgrates eines scFv; VL: Variable Region der leichten Kette; VH: Variable Region der schweren Kette.⁸⁰

Terminale Verlängerungen dienen der Veränderung von biochemischen Eigenschaften des Fusionsproteins. So können scFv beispielsweise über eine His₆-Sequenz für die Isolierung aus periplasmatischen Extrakten verfügen. Durch den Einsatz von scFv anstelle von vollständigen Immunglobulinen vermindert man Nachteile bei der Durchführung von Selektionsverfahren.⁸⁰ Standardverfahren der Molekularbiologie ermöglichen im Anschluss an die Selektion eine Überführung in bivalente, humane Immunglobulinformat der gewünschten Spezifität und Effektorfunktion.

1.3 Antikörper im Zusammenhang mit HIV-1

Eine Reihe unterschiedlichster experimenteller Daten stützen die Hypothese, dass IgG-Antikörper in der Lage sind, eine im Wirt vorkommende Menge an Virenlast zu inaktivieren.⁸⁵ Bis heute werden daher in Bezug auf die HIV-Infektion stetig neue Versuche unternommen, gezielt neutralisierende Antikörper zu induzieren.⁸⁶ Dass die Suche nach breit-neutralisierenden Antikörpern oft erfolglos ist, belegt eine im Jahre 2003 veröffentlichte Zusammenstellung von humanen, monoklonalen HIV-1 neutralisierenden Antikörpern (*HIV Immunology and HIV/SIV Vaccine Database*).⁸⁷ Lediglich fünf von insgesamt 174 aufgelisteten mAbs sind als breit- und stark-neutralisierend eingestuft (**2G12**, **b12**, **447-52D**, **2F5** und **4E10**). Wesentliche Probleme bereitet die Mutationsrate des Virus sowie die dynamisch abschirmende und als wirtseigen erkannte Glycanhülle des gp120. Eine Maskierung des gp120 gegenüber Antikörpern ist zusätzlich durch konformationelle Freiheiten des Proteinanteils geprägt.^{88;89} Die letzte im großen Maßstab durchgeführte klinische Studie der Phase III mit gp120-basierten Vakzinvarianten (AIDSVAX) scheiterte vermutlich an eben diesen Eigenschaften des HI-Virus, ebenso wie auch weitere mit bisher mehr als 50 Kandidaten durchgeführte Vakzinstudien.⁹⁰ Fortwährend gibt es neue Ansätze, geeignete Impfstoffe zu erzeugen.^{37;91;92} Da auf dem Gebiet der HIV-Vakzinforschung derzeit kaum Fortschritte gelingen, befassen sich einige Arbeiten nicht mehr direkt mit der Entwicklung von Vakzinen, sondern verfolgen unter dem Begriff der Retrovakzinologie einen umgekehrten Ansatz. In diesem wird versucht, durch ein breites Neutralisierungspotential charakterisierte Antikörper (z.B. aus Seren infizierter Spender) hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit dem HI-Virus strukturell genau zu analysieren und erst im Anschluss Überlegungen zu beginnen, wie man die Produktion genau solcher Antikörper im Patienten induzieren kann. Erfolge sind jedoch auch mit diesem Ansatz noch nicht erzielt worden. Neben der Induktion gerichteter Immunantworten können neutralisierende mAbs auch rekombinant dargestellt und HIV-infizierten Patienten verabreicht werden. Einige wenige HIV-Antikörper werden derzeit in klinischen Studien der Phase II im Rahmen einer solchen passiven Immunisierung getestet.^{93;94}

1.3.1 Antikörper induzierende Epitope von HIV-1

Die viralen Glycoproteine gp41 und gp120 stellen in Form ihrer oligomeren Komplexe, den sogenannten *Spikes*, auf der Oberfläche der Viren den Hauptangriffspunkt für neutralisierende Antikörper dar.⁹⁵ Die immunodominanten Bereiche dieser viralen Glycoproteine führen jedoch größtenteils zu nicht-neutralisierenden Antikörpern.⁹⁶⁻⁹⁹

Auf Seiten des gp41 haben die dicht an der Membranoberfläche (MPER) bindenden humanen mAbs **2F5** und **4E10** das größte Neutralisierungspotential. Es wird vermutet, dass

beide den Prozess der Virus/Zellfusion behindern.¹⁰⁰ An gp120 bindende Antikörper können, je nach Lokalisation des Epitops, verschiedenen Gruppen zugewiesen werden. Wesentliche Gruppen sind anti-V1, anti-V2, anti-V3, anti-CD4-*binding site* (CD4bs) und anti-CD4-*induced* (CD4i). Die V1-Region des gp120 unterliegt, wie auch die V2-Region, stärkerer Mutation als etwa die V3-Region. Zudem wird eine geringe Immunogenität im Kontext des gp120-Oligomeres vermutet. Lediglich aus transgenen Mäusen konnten bisher Antikörper erhalten werden. Der am besten analysierte anti-V2 Antikörper (**697-D**) hat nur schwach neutralisierendes Potential.^{99;101;102} Als anti-CDbs eingestufte Antikörper inhibieren die Bindung von CD4 an gp120. Aus einer Anzahl von 30 dokumentierten mAbs und 15 Fab-Fragmenten hat sich IgG1 **b12** als inhibierend gegenüber HIV-Primärisolaten (PI) erwiesen.¹⁰³ Auch **b12** weist eine Besonderheit auf, wodurch er sich zusammen mit den wenigen anderen potenten HIV-1 neutralisierenden Antikörpern von regulären, nicht-inhibierenden Antikörpern unterscheidet. Im Falle von **b12** ist diese Besonderheit eine 18 Aminosäure lange CDR-H3-Region welche eine fingerartige Struktur besitzt.¹⁰⁴ Das erst durch Wechselwirkung mit CD4 induzierte Epitop (CDi) wird nur von einer kleinen Gruppe humaner Antikörper erkannt. Fab **X5** und **17b** sind solche Vertreter, wobei **X5** aus einem *Phage Display* Ansatz mit einer Bibliothek eines mit HIV-infizierten Patienten isoliert wurde.¹⁰⁵ In diesem Falle macht die Größe des Antikörpers die Besonderheit aus, da das Neutralisierungspotential mit zunehmender Größe abnimmt (scFv > Fab > IgG).⁹⁶

Neben diesen mit dem Proteinanteil wechselwirkenden Antikörpern stellt der als Fab-Dimer vorliegende **2G12** eine Besonderheit dar. Die Dimerisierung ermöglicht die Erkennung $\alpha 1 \rightarrow 2$ verknüpfter Mannoseeinheiten von Glycanen in einer für gp120 spezifischen räumlichen Anordnung.^{100;106-108} Dieser Antikörper wurde zusammen mit den gp41-bindenden Antikörpern **4E10** und **2F5** bereits in Phase II Studien getestet, wobei besonders **2G12** auch gegenüber Fluchtmutanten inhibitorisches Potential aufwies.^{94;109}

Ein kürzlich isolierter humaner Antikörper (**2909**) erkennt vermutlich ein Epitop von quartärer Natur, da dieser keine Interaktion mit gelösten HIV-Proteinen eingeht.¹¹⁰ Ein neuartiges und ebenso noch nicht aufgeklärtes Epitop weist zudem ein muriner Antikörper (**D19**) auf.¹¹¹ Es ist abzusehen, dass solche quartären Epitope ebenso wie Kohlenhydrat-basierte Epitope in zunehmendem Maße bei HIV-Vakzinkonzepten Beachtung finden werden.^{112;113}

1.3.2 V3-Antikörper

Die Vielzahl an in Datenbanken dokumentierten V3-Antikörpern (anti-V3 mAbs) belegt die hohe Immunogenität der V3-Region. Die meisten dieser Antikörper sind jedoch Isolat-spezifisch, das heißt ohne breit neutralisierende Wirkung. Die Bedeutung der V3-Region in Bezug auf den Virus-Entry liegt in der Interaktion mit dem HIV-Korezeptor, wobei die V3-Loop eine ähnliche Struktur wie die natürlichen Chemokinliganden einnimmt.¹¹⁴ Um diese Struktur und Korezeptorspezifität (CCR5 oder CXCR4) zu gewährleisten, besteht ein Zwang, bestimmte Positionen der V3-Region konserviert zu halten. Dieses trifft vor allem auf das *turn*-induzierende GPGR- oder GPGQ-Motiv an der Spitze der Loop zu. Aus einer großen Anzahl von für die V3-Spitze spezifischen Antikörpern verfügt der ausführlich charakterisierte IgG3 **447-52D** über das breiteste Neutralisierungspotential. Er wurde 1993 von M. Gorny und S. Zolla-Pazner aus mit EBV transformierten peripheren Lymphozyten eines HIV-1 Patienten erhalten.¹¹⁵ Für die Isolierung des Klons wurde ein V3-Peptid der Sequenz YNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIG (V3_{MN}) eingesetzt. Wichtige vergleichende Studien bezüglich des neutralisierenden Potentials wurden im Jahre 2000 von Nyambi *et. al.* und im Jahre 2004 von Binley *et. al.* durchgeführt.^{101;116} **447-52D** vermag 45% von Subtyp B Primärisolaten sowie lediglich 7% anderer Subtypen zu neutralisieren und ist damit der effektivste seiner Klasse. Die Substitution des Subtyp B Motivs von GPGR zu GPGQ geht mit erheblich erniedrigter Bindungsaffinität einher.¹¹⁷ Eine Kristallstrukturanalyse eines Fab-Fragmentes von **447-52D** mit dem V3_{III B}-Peptid (RKSIRIQRGPGRAFVTIG) von Stanfield *et. al.* deckte die Besonderheit dieses V3-Antikörpers unter der großen Zahl von für die V3-Spitze spezifischen Antikörpern auf.⁵² Neben dem Kernepitop GPXR erfolgt die Wechselwirkung mit der N-terminal flankierenden Seite (KRIHI) im Wesentlichen über Peptidrückgratwechselwirkungen und ist somit unbeeinflusst von in diesem Bereich häufig auftretenden Mutationen der Seitenketten.⁵¹ Ein in Jahr 2004 in einer Phase I Studie untersuchter humanisierter Antikörper (**hNM01**) ist ebenfalls auf das GPGRAF-Motiv angewiesen.^{118;119} Das Kernepitop „PGR“ wird dem durch Immunisierung mit V3-Peptiden gewonnenen humanisierten Antikörper **KD-247** zugeschrieben.¹²⁰ Dieser bindet, wie anhand von Oberflächenplasmonenresonanzstudien herausgefunden wurde, im einstelligen nanomolaren Bereich an das V3-Peptid (YNKRKRIHIGPGRAYTTKNC). In passiven Immunisierungsstudien mit Affen und S/HI-Viren sind bereits Erfolge zu vermelden, wobei auch bei diesem Antikörper das Kernepitop nicht verändert vorliegen darf.¹²¹

Antikörper, deren Epitope nicht (QR)GPGR oder (QR)GPGQ beinhalten, sind nur in einer äußerst geringen Anzahl dokumentiert worden. Zu den am intensivsten untersuchten Antikörpern, deren Epitope N-terminal lokalisiert sind gehören **257-2D** (KRIHI), **311-11D**

(KRIHIGP) sowie ein Satz von sechs weiteren.¹²² Die Positionen von K305 bis I307 gehören jedoch zu einem recht variablen Abschnitt der *V3-Loop*, so dass nur bedingt neutralisierende Breiten vorhanden sind. Das Epitop des humanen Antikörpers IgM **MO97/V3** ist, bezogen auf ein nicht glycosyliertes gp120-Konstrukt, mit PNNNTRKSIR angegeben. Eine neutralisierende Wirkung liegt jedoch nicht vor.^{99;123} Auch die murinen Antikörper **IIIB-V3-21** (INCTRP) und **IIIB-V3-26** (SVEINCTRPNNNTRKSI) weisen keine neutralisierenden Eigenschaften auf.^{124;125} Der ebenfalls murine Antikörper **9284** mit dem Epitop NNTKSIRIQRG ist abhängig von der selten vorkommenden QR-Insertion der X4-tropen gp120-IIIB Sequenz.¹²⁶⁻¹²⁸

Der strukturgebende β -turn ist im Vergleich zu vielen anderen V3-Positionen hoch konserviert. Ebenfalls hoch konserviert ist allerdings auch die Region ²⁹⁸RP-NNTR³⁰⁴, ohne dass es zur Bildung von neutralisierenden mAbs kommt. Eine Begründung für die Seltenheit der (QR)GPG-unabhängigen Antikörper lässt sich folgendermaßen formulieren. R5-tropen Stämme weisen neben N- und C-terminal lokalisierten Glycanen innerhalb der *Loop* eine komplexen Typ Glycosylierung auf (N301). Die zum Teil hoch konservierten Positionen werden somit von den flexiblen Oligosaccharidstrukturen maskiert.¹²⁹ Im Einklang damit konnte belegt werden, dass eine fehlende Glycosylierung an N301 den HI-Virus dem Immunsystem zugänglicher macht.¹³⁰ Durch die beiden erwähnten Sachverhalte (Variabilität und Glycosylierung) scheint auch das Scheitern zahlreicher Immunisierungen mit linearen V3-Peptiden mitbegründet zu sein.^{122;131;132} Auch neueste Studien mit immunisierten Nagetieren unter Einsatz einer großen Anzahl von unterschiedlich substituierten linearen V3-Peptiden führten zu lediglich 31% Neutralisierung von HIV-1 Primärisolaten des Subtyps B.¹³³

Auf eine vollständige Nennung aller V3-Antikörper wird im Rahmen dieser Einleitung unter Verweis auf die *HIV Molecular Immunology* Datenbank verzichtet.⁸⁷ Keiner der zur Zeit dokumentierten V3-Antikörper ist bisher potenter als **447-52D** eingestuft worden. Ebenso ist derzeit kein anti-V3 mAb benannt worden, das eine direkte Interaktion mit der an N301 befindlichen Glycosylierung eingeht. Stattdessen ist für die deutliche Mehrheit (> 90%) der dokumentierten V3-Antikörper das konservierte *turn*-bildende (QR)GPG-Motiv essentiell. Im Vergleich zu **2G12** (Glycan), **4E10** und **2F5** (beide gp41) scheinen V3-Antikörper in ihrer Fähigkeit breit und potent HI-Viren zu neutralisieren, unterlegen zu sein.

1.4 Methoden

1.4.1 Peptidsynthese

Den Ansprüchen polyfunktionale Aminosäuren automatisiert zu Peptiden zu verknüpfen, wurde R. B. Merrifield 1984 mit der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) gerecht.¹³⁴ Das Prinzip beruht auf der Fixierung des C-terminalen Endes einer NH₂-geschützten Aminosäure an ein Harz, dem Entfernen der Schutzgruppe und dem Anfügen der nächsten NH₂-geschützten Aminosäure. Die Fixierung an das Harz ermöglicht Waschschriffe zur Entfernung überschüssiger, nicht umgesetzter Reagenzien. Damit keine Deletionspeptide entstehen, können nach jedem Kupplungszyklus freie Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert werden (*capping*). Nach beendeter Peptidsynthese erfolgt die Abspaltung des Peptids vom Harz mit zumeist simultaner Entfernung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen.¹³⁵

Als Schutzgruppe der freien Aminofunktion der zu kuppelnden Aminosäure hat sich Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) bewährt (Abb. 1.8).¹³⁶ Die Gruppe ist bereits unter mild basischen Bedingungen abspaltbar, wobei Piperidin auch als *scavenger* für das entstehende Dibenzofulven dient. Die Ausbeute eines Kupplungszyklus kann zudem UV/Vis-spektroskopisch bestimmt werden.

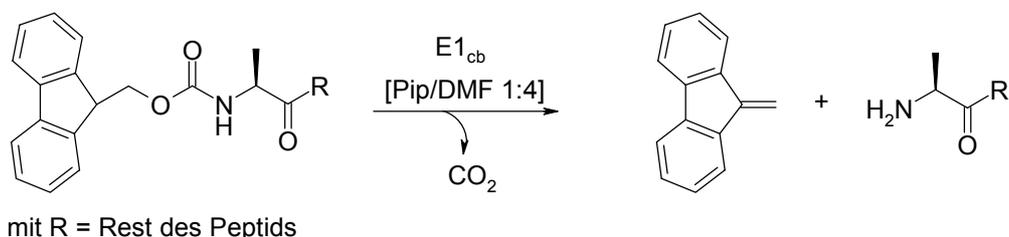


Abb. 1.8 Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt nach dem E1_{cb}-Mechanismus.

Das Carboxylkohlenstoffatom der zu verknüpfenden Aminosäure muss aktiviert werden, da es sonst lediglich zu einer Säure-Base-Reaktion zwischen der Aminogruppe und der Carboxylatgruppe kommen würde. Nach der sogenannten Aktivestermethode wurde im Rahmen dieser Arbeit die Carboxylatgruppe *in situ* mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) über ein reaktives Acyluronium-Derivat zu einem Benzotriazolester umgesetzt (Abb. 1.9).¹³⁷ Treibende Kraft der Reaktion zum Aktivester ist die Entstehung von Tetramethylharnstoff. Durch Zugabe von Diisopropylethylamin (DIPEA) wird der pH-Wert auf 8.5 bis 9.0 gehalten.

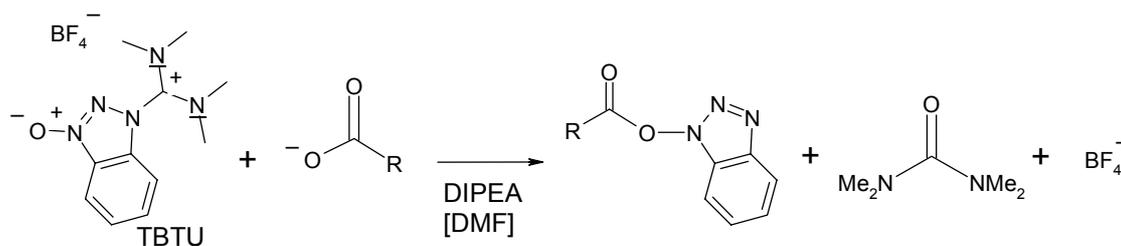


Abb. 1.9 Reaktion der Carboxylatgruppe mit TBTU zu einem Benzotriazolester. Die Umsetzung mit einer Aminofunktion erfolgt vermutlich ausgehend von einer reaktiven Zwischenstufe.

Bei der Peptidsynthese besteht ein exponentieller Zusammenhang der Gesamtausbeute von der durchschnittlichen Ausbeute der Einzelreaktionen. Um eine maximale Ausbeute zu erzielen, beinhaltet jeder Kupplungszyklus daher eine Dreifachkupplung mit jeweils vierfachem Überschuss an Aminosäure.

1.4.2 Synthese von Glycopeptiden

Zur Darstellung von Glycopeptiden gibt es mehrere Möglichkeiten. So ist sowohl der Einsatz der Festphasenpeptidsynthese als auch eines molekularbiologischen Expressionssystems denkbar. Bei letzterer Methode ist die Art, Ausprägung und Homogenität der Glycosylierung stark vom gewählten Wirtssystem abhängig. Bei der Verwendung der Festphasenpeptidsynthese werden entweder die Kohlenhydrate nach abgeschlossener Peptidsynthese selektiv angefügt oder eine entsprechende N-, S- oder T-Glycosylaminosäure ist vorhanden und wird während der Festphasensynthese als Baustein verwendet. Die nötigen N- oder S/T-Glycosylbausteine können rein chemisch oder durch Zuhilfenahme von Enzymen (z.B. Glycosyltransferasen) aus biologischen Vorstufen dargestellt werden, wobei ein solches Vorgehen vor allem bei komplexen Oligosacchariden in Betracht kommt.^{138;139} Eine präparativ verhältnismäßig gut zugängliche Glycosylaminosäure ist das mit Chitobiosylamin verknüpfte Asparagin (Abb. 1.10).

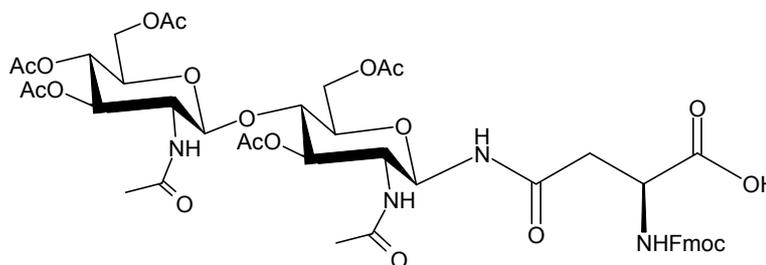


Abb. 1.10 Die N-Glycosylaminosäure Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH:
N²-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N⁴-(3,6-di-O-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-4-O-(3',4',6'-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl))asparagin.¹⁴⁰

Die Hydroxygruppen der Kohlenhydrate sind mit Acetylgruppen geschützt, welche im Anschluss an die Peptidsynthese noch vor der Abspaltung vom Harz entfernt werden können. Der N-Chitobiosylbaustein wird ausgehend von Chitin und Asparaginsäure dargestellt, wobei die Kupplung an die γ -Carboxylgruppe von Aspartat mit Chitobiosylamin erfolgt.¹⁴¹ Bereits solche minimierten Glycostrukturen können in entsprechenden Untersuchungen wichtige Beiträge über den Einfluss der Glycosylierung in Bezug auf biologisch relevante Interaktionen erbringen.

1.4.3 Phage Display Technologie

Zur Isolierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern aus einem Repertoire von Antikörpern stehen neben dem traditionellen Verfahren der Hybridomtechnik¹⁴² unter anderem das Ribosom-Display¹⁴³ und die Methode der *Phage Display* Technologie zur Verfügung.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Das Prinzip letzterer Technologie ist die Übertragung des Selektionsvorganges vom Wirbeltierorganismus ins Reagenzglas unter Zuhilfenahme der gut beherrschten *E. coli*-Genetik. Zentraler Punkt der Technologie ist dabei die physische Kopplung von Gen und Genprodukt in Form eines scFv-präsentierenden filamentösen Phagen, dessen Vektor die genetische Information für das scFv enthält (Abb. 1.11). Das scFv kann als Fusionsprotein mit Phagenhüllbestandteilen präsentiert werden, wobei besonders die Fusion an das pIII-Hüllprotein bewährt ist.

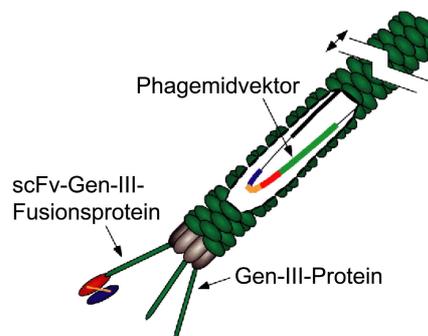


Abb. 1.11 Schematische Darstellung eines scFv-präsentierenden filamentösen Phagen. In diesem Fall liegt ein Phagemidvektor vor, der lediglich das Gen für das scFv-pIII-Fusionsprotein enthält. Alle anderen Phagenkomponenten werden von Helferphagen bereitgestellt.¹⁴⁷

Filamentöse Phagen infizieren ihren Wirt (*E. coli*) durch Wechselwirkung einer Domäne des pIII-Hüllproteins mit dem F-Pilus des Wirtes. Pro Zellzyklus werden unter Beeinträchtigung der Replikationsrate des Wirtes zwischen 100 und 200 Phagenpartikel freigesetzt.

Eine *Phage Display* Selektion beinhaltet die Inkubation der Bibliothek in Form von scFv-präsentierenden Phagen mit dem Antigen, woran sich die Isolierung des Komplexes aus Antigen und bindenden Phagen anschließt. Diese isolierten Phagen können dann genutzt werden, um naive *E. coli* Kulturen zu infizieren, welche somit eine angereicherte Bibliothek in Form von Phagemidvektoren in sich tragen. Üblicherweise werden mehrere Selektionsrunden unter teilweise veränderten Rahmenbedingungen bestritten, bevor aus den infizierten *E. coli* Kulturen einzelne Kolonien zur monoklonalen Analyse herangezogen werden.

Da das scFv-Fragment einen Selektionsnachteil für die entsprechenden Phagenpartikel bedeutet,¹⁴⁸ wurde ein auf Phagemidvektoren basierendes System entwickelt.^{149;150} Diese Vektoren enthalten vom Phagen genom lediglich das Gen des scFv-pIII-Fusionsproteins sowie die Signalsequenz zur Verpackung in Phagenpartikel. Vollständige Phagenpartikel entstehen durch Infektion mit Helferphagen. Die Generierung, Lagerung und Vervielfältigung der Bibliothek kann ohne Expression des Antikörperfragments in *E. coli* vollzogen werden. Neben dieser Phagemidvariante gibt es weitere optimierte Methodiken, zu denen zum Beispiel der Einsatz selektiv infektiöser Phagen gehört.^{151;152}

Ausgangspunkt zur Generierung einer Antikörperbibliothek ist aus B-Lymphozyten-mRNA gewonnene cDNA von idealerweise immunisierten Spendern. Oftmals werden bestimmte CD-Regionen wie etwa die CDR3 durch synthetische Zufallssequenzen ersetzt, um die Komplexität der Bibliothek zu erhöhen. Die gemeinsame Transformation von VH und VL Segmenten führt zur weiteren Diversifizierung und stellt gleichzeitig den entscheidenden Schritt der Bibliotheksgenerierung dar. Eine etablierte Methode ist hierbei die kombinatorische Infektion (*in vivo* Rekombination) unter Einsatz von Plasmidvektoren (VH), Phagenpartikeln (VL) und einer Rekombinase.¹⁵³ Komplexitätsgrenzen sind in Bezug auf den Nachweis von Bibliotheksgrößen größer als 10^{11} Klone und die praktisch einsetzbare Phagenzahl mit heutigen Generierungsmethoden überschritten.⁸⁰

1.4.4 SPR-Bindungsstudien

1.4.4.1 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Das Gesetz der Totalreflexion besagt, dass bei einem Übergang vom optisch dichteren ins dünnere Medium ($n_2 > n_1$) der Einfallswinkel einen bestimmten Grenzwert (α_G) nicht überschreiten kann ($\sin \alpha_G = n_1/n_2$). Bei allen Einfallswinkeln $\alpha > \alpha_G$ tritt Totalreflexion auf und die gesamte Lichtenergie wird gemäß dem Reflexionsgesetz in das optisch dichtere Medium reflektiert. Obgleich dabei kein Nettoenergieverlust stattfindet, entsteht im optisch dünneren Bereich ein sogenanntes evaneszierendes Feld. Ist ein dünner Film eines leitenden Materials auf das optisch dichtere Medium aufgetragen, so kommt es in einem bestimmten Totalreflexionswinkel durch dieses evaneszierende Feld zur Anregung von Oberflächenplasmonen.¹⁵⁴ Diese Resonanz führt zu einer deutlichen Verstärkung des evaneszierenden Feldes (SPR, *surface plasmon resonance*).¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Einhergehend mit dem Auftreten von SPR ist eine Reduktion der Intensität des reflektierten Lichtes in Form eines Dunkelfeldes zu registrieren. Dieser Vorgang wird in der Quantenmechanik durch die Wechselwirkung des Wellenvektors des einfallenden Lichts und der Oberflächenplasmonen beschrieben und findet nur statt, wenn diese in Größe und Richtung gleich sind. Der Wellenvektor des Plasmons ist abhängig sowohl von dem Brechungsindex der dünnen leitenden Schicht (n_{sp}) als auch von dem des optisch dünneren Mediums (n_1). Damit es nach einer Änderung von n_1 wieder zu SPR kommt, muss eine Änderung des Einfallswinkels oder der Wellenlänge des einfallenden Lichts erfolgen.

1.4.4.2 SPR-Sensorchipssystem

Der Firma Biacore (Uppsala, Schweden) gelang es Anfang der neunziger Jahre ein auf der Oberflächenplasmonenresonanz beruhendes Sensorchipssystem auf dem Markt zu etablieren, welches in der Lage ist, Interaktionen einer biospezifischen Oberfläche mit einer in Lösung befindlichen Komponente zu untersuchen.¹⁵⁸ Das optisch dichtere Medium ist bei dem Biacoresystem ein Glaträger, welcher mit einem Goldfilm bedeckt ist. Das optisch dünnere Medium stellt eine Flusszelle dar. Ein Bindungspartner wird auf dem Goldfilm immobilisiert und der andere sich in Lösung befindliche Bindungspartner wird darübergeleitet. Ein Wechselwirkungsereignis zwischen diesen beiden Komponenten führt zu einer Erhöhung des Brechungsindex n_1 . Durch Änderung von n_1 ändert sich der Winkel bei dem SPR auftritt. Die Verschiebung des Intensitätsminimums der Totalreflexion ist also der den Messungen zugrunde liegende Parameter zur Verfolgung von Bindungsereignissen. Eine Änderung des Brechungsindex um $1 \cdot 10^{-3}$ verursacht eine 0.1° -Verschiebung des SPR-Winkels, wobei aktuelle Geräte Änderungen von 0.0001° verfolgen können.

Monochromatisches Licht (760 nm) wird als Bündel auf den Chip gestrahlt, so dass alle Totalreflexionswinkel gleichzeitig abgedeckt sind. Als Signal wird die Veränderung des SPR-Winkels in RU (*Response Unit*) ausgegeben. Da die Injektion der gelösten Komponente jedoch auch ohne spezifisches Bindungsereignis zu einer gewissen Veränderung des RU-Wertes führt, wird parallel zur Messung der Flusszelle stets eine Referenzzelle vermessen, auf der kein Bindungspartner immobilisiert wurde. Erst die Differenz dieser beiden RU-Werte stellt die eigentliche Kurve eines Sensorgramms mit der *Response Difference* (Resp.Diff.) als Ordinatenachse dar (Abb. 1.12).

Die Immobilisierung der Moleküle kann unterschiedlich durchgeführt werden.¹⁵⁹ Eine gebräuchliche Methode stellt die kovalente Fixierung dar. Hierfür ist auf den Goldfilm eine carboxymethylierte Dextranmatrix (CM-Dextran) aufgetragen an dessen Carboxylgruppen Moleküle über freie Aminogruppen kovalent an die Chipoberfläche gebunden werden können. Auf diversen anderen erhältlichen Chipoberflächen können biotinylierte Proteine über Streptavidin und Proteine mit His₆-Sequenz über einen Nickelchelate-Komplex immobilisiert werden. Darüber hinaus ist es möglich, reversibel Lipiddoppelmembranen auf der Oberfläche abzuschneiden, in welche Moleküle eingelagert werden können.

Die in Lösung gebrachte Komponente wird durch die Flusszelle geleitet und der Resp.Diff.-Wert steigt, sofern eine Wechselwirkung stattfindet. Wird anschließend mit Puffer nachgespült kommt es zur allmählichen Dissoziation. Die Wiederherstellung des Ausgangszustandes gelingt oftmals nur durch Injektion einer geeigneten Regenerationslösung (z.B. Detergenz, Säure). Das Sensorgramm ist die Auftragung der RU-Werte von der Injektion bis zur Regeneration gegen die Zeit (Abb. 1.12).

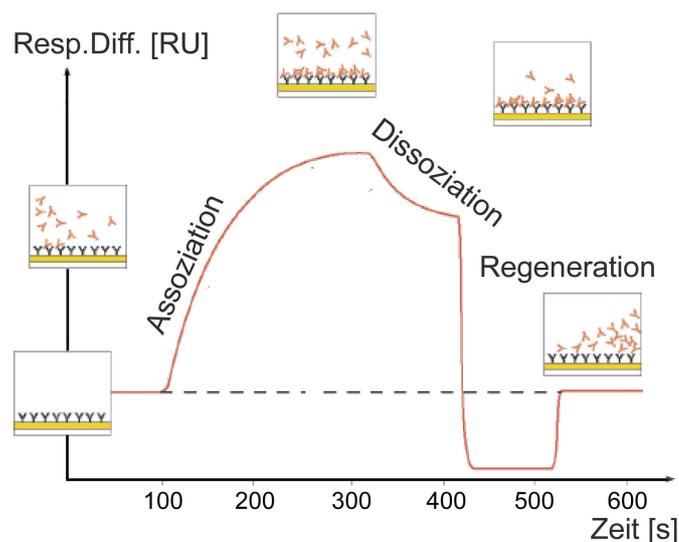


Abb. 1.12 Sensorgramm einer SPR-Messung. Die Analyse des Verlaufs der Assoziation und Dissoziation mit der Zeit erlaubt die Bestimmung von kinetischen Daten (k_a , k_d). Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtswerte ergibt sich die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D .

Aus dem Sensorgramm lassen sich die Geschwindigkeitsrate der Assoziation (k_a) und die der Dissoziation (k_d) bestimmen. Der erreichte Gleichgewichtszustand ermöglicht den quantitativen Vergleich der Bindungseigenschaften gegenüber anderen Bindungspartnern. Die thermodynamische Dissoziationskonstante (K_D) ergibt sich wie folgt aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten:

$$K_D = [A] \cdot [B] / [AB] = k_d / k_a$$

Gleichung 1.1 Die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D [mol/L]:

[A] = Konzentration der immobilisierten Komponente

[B] = Konzentration der in Lösung befindlichen Komponente

[AB] = Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes

Oft stehen einer exakten Bestimmung beider kinetischen Konstanten jedoch Probleme gegenüber. Genannt seien an dieser Stelle die Datenrate des Gerätes, diffusionsbedingte Massentransportlimitierung,¹⁶⁰ Rückbindungseffekte¹⁶¹ und Referenzzellenphänomene.¹⁶² Die thermodynamische Dissoziationskonstante lässt sich jedoch auch durch Aufnahme von Konzentrationsreihen ermitteln (*steady state affinity*). Die Gleichgewichtswerte einer jeden Konzentration werden gegen die Konzentration aufgetragen und der Datenpunktverlauf der folgenden Gleichung angepasst:

$$\text{Resp.Diff.}_{\text{ggw}} = \text{Resp.Diff.}_{\text{max}} \cdot [B] / (K_D + [B])$$

Gleichung 1.2 Affinität im Gleichgewichtszustand:

Resp.Diff.}_{\text{ggw}} [RU]: Gleichgewichtswert der jeweiligen Konzentration von B

Resp.Diff.}_{\text{max}} [RU]: Gleichgewichtswert bei unendlich hoher Konzentration von B

[B]: Konzentration der in Lösung befindlichen Komponente B [mol/L]

K_D : thermodynamische Dissoziationskonstante [mol/L]

Gegenüber anderen etablierten Assays sind einige Vorteile hervorzuheben. SPR-Studien sind durch die verschiedenen Chipoberflächen vielseitig einsetzbar. Biologisch aktive Moleküle können aus nicht aufgereinigten Proben heraus verwendet werden. Die Interaktionspartner können sondenfremd eingesetzt werden. Die Messungen erfolgen in einem fließenden System mit variierbarer Flussrate (2 bis 100 $\mu\text{L}/\text{min}$). Der Probenbedarf ist gegenüber anderen Methoden wie etwa der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) gering. Als Echtzeitmethode lassen sich kinetische Daten aus den Messreihen ableiten. Die neuesten Geräte können konstante Temperaturen gewährleisten, so dass durch die Bestimmung von K_D -Werten in Abhängigkeit von der Temperatur thermodynamische Daten über Enthalpie und Entropie zugänglich sind.

1.4.5 Sättigungstransfer-Differenz (STD) NMR Spektroskopie

Die von Meyer *et. al.* entwickelte Methode der Sättigungstransfer-Differenz (STD) NMR Spektroskopie ist ein Verfahren, bei dem die Interaktion eines in Lösung befindlichen Liganden niedrigen Molekulargewichts (< 7 kD) mit einem ebenfalls gelösten makromolekularen Rezeptor untersucht werden kann. Die erhaltenen Informationen aus STD NMR Experimenten erlauben eine Differenzierung zwischen bindenden und nicht-bindenden Liganden, den Zugang zu thermodynamischen Dissoziationskonstanten und eröffnen ferner die Möglichkeit zu einer detaillierten Epitopformulierung auf Seiten des Liganden bezüglich des Rezeptormoleküls.^{163;164}

Bei der STD NMR Spektroskopie ist die sogenannte Spin-Diffusion von Bedeutung.¹⁶⁵ Abhängig von der Ausprägung einer definierten Tertiärstruktur eines Proteins liegt das Spindiffusionslimit bei etwa 10 kD. Aufgrund von kurzen T_2 -Relaxationszeiten haben diese Moleküle stark verbreiterte Protonensignale dessen gemeinsame Hüllkurve über den regulären ^1H -ppm Bereich hinausreicht. Wird etwa bei -1 ppm selektiv mit einer Kaskade von Gaußpulsen eingestrahlt, so verteilt sich durch Spin-Diffusion die Sättigung gleichmäßig über das gesamte Protein. Die Signale des niedermolekularen Liganden bleiben durch diese selektive Sättigung bei -1 ppm jedoch unbeeinflusst. Tritt der Ligand nun in Interaktion mit dem gesättigten Rezeptorprotein, so erfahren die Protonen mit engem räumlichen Kontakt zum Protein einen Teil dieser Sättigung, was sich in Form von Intensitätsverlust der Signale des Liganden im dissoziierten Zustand detektieren lässt (Abb. 1.13).

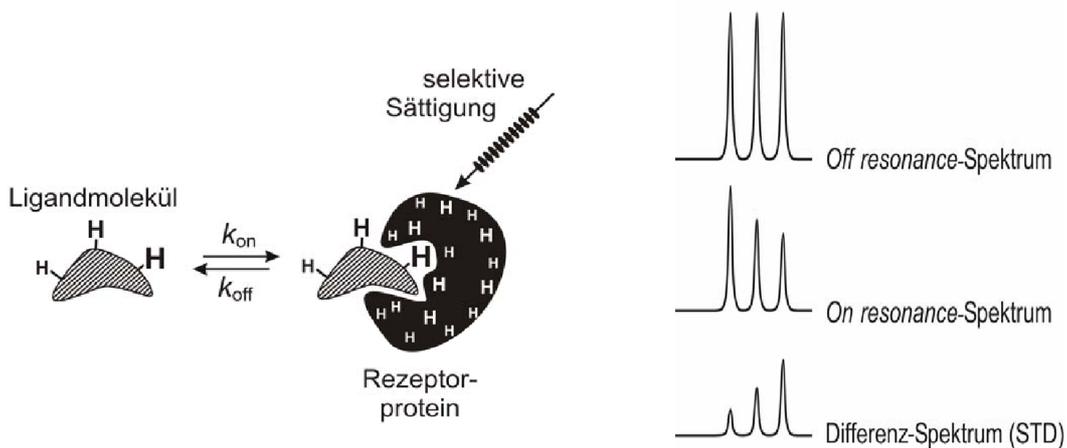


Abb. 1.13 STD NMR Spektroskopie: Nach einer selektiven Sättigung des Rezeptorproteins wird diese auf den gebundenen Liganden übertragen und im dissoziierten Zustand als Signalintensitätsverlust wahrgenommen (On resonance). Ohne Sättigung des Proteins erfolgt kein Sättigungstransfer (Off resonance). Die Differenz der Spektren (STD) beinhaltet Signale von Protonen die im gebundenen Zustand räumlichen Kontakt zum Rezeptor haben. Je enger dieser Kontakt, desto intensiver ist das Signal im Differenzspektrum.

Die Differenz zu einem Spektrum ohne Rezeptor-Vorsättigung führt zu Signalen von bindenden Protonengruppen (STD-Spektrum). Über die Intensität eines jeden Ligandensignals im STD-Spektrum bezüglich des *Off resonance*-Spektrums in Prozent (STD-Prozent) kann auf atomarer Ebene das Epitop formuliert werden. Aus der Abhängigkeit der STD-Prozentwerte von der Ligandkonzentration erfolgt nach Berücksichtigung des Ligandüberschusses über die sogenannten STD-Amplifikationsfaktoren (STD_{Ampl}) die Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstanten.

$$STD_{Ampl.} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \frac{[L]_g}{[P]_g}$$

Gleichung 1.3 Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors:

I_0 = Signalintensität im *Off resonance*-Spektrum; I_{sat} = Signalintensität im *On resonance*-Spektrum; $I_0 - I_{sat}$ = Signalintensität im STD-Spektrum; $[L]_g$ = Gesamtligandkonzentration, $[P]_g$ = Gesamtrezeptorkonzentration.

Bei der Auftragung der Amplifikationsfaktoren ($STD_{Ampl.}$) gegen die Ligandkonzentration ergibt sich im Falle einer spezifischen Bindung ein Verlauf, welcher der folgenden Funktion angepasst werden kann:

$$STD_{Ampl.} = \frac{STD_{Ampl.(max)} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 1.4 Affinität im Gleichgewichtszustand:

$[L]$ = Ligandkonzentration; K_D = thermodynamische Dissoziationskonstante; $STD_{Ampl.(max)}$ = Gleichgewichtswert bei unendlich hoher Ligandkonzentration.

Da nichtbindende niedermolekulare Moleküle keinerlei Sättigung erfahren, zeigen diese im STD-Spektrum keine Signale. Auf dieser Grundlage ist es gelungen, einen bindenden Liganden aus einer Anzahl an nichtbindenden Liganden in der selben Probe zu identifizieren (*screening*).¹⁶³ Der Einsatzbereich von STD NMR Experimenten ist nicht nur durch die Molekulargewichte sondern auch durch die Kinetik der Interaktion limitiert. Tieferegehende Interpretationen von STD NMR Experimenten beinhalten die Berechnung von komplexen Relaxations- und Austauschmatrices.¹⁶⁶ Neueste Weiterentwicklungen beruhen auf der Doppeldifferenzmethode (STDD) bei denen STD-Spektren mit komplexer biologischer Matrix (Zellsysteme) in An- und Abwesenheit von Ligand aufgenommen und subtrahiert werden.¹⁶⁷

2. Problemstellung

Ein entscheidender Schritt bei der Infektion humaner CD4⁺ Lymphozyten mit dem HI-Virus ist die Interaktion der V3-Region des viralen Glycoproteins gp120 mit dem CCR5-Rezeptor auf Makrophagen. Diese Interaktion ist Ziel für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte HIV-Entry Inhibition durch monoklonale V3-spezifische Antikörperfragmente.

Eine deutliche Mehrheit der aus Seren HIV-1 infizierter Patienten isolierten Antikörper bindet an ein hochkonserviertes β -Schleifen-Strukturmotiv der V3-Region, dem ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Motiv (Subtyp B), ohne dabei im gewünschten Ausmaß neutralisierende Eigenschaften aufzuweisen. Andere lineare, proteinogene Epitope unterliegen Mutationen, so dass dort bindende Antikörper ein noch ausgeprägteres Isolat-spezifisches Neutralisierungspotential besitzen. Derzeit gibt es keinen V3-Antikörper, der Bestandteil von passiven Immunisierungskonzepten oder gar Ausgangspunkt einer erfolgreichen Vakzinstrategie ist.

Ein hoch konservierter N-terminaler V3-Abschnitt (²⁹⁸RPXNNTR³⁰⁴) ist vermutlich durch eine komplex Typ Glycosylierung an N301 dem Immunsystem nur schwer zugänglich. Im Fokus dieser Arbeit steht daher ein Ansatz zur Selektion von Antikörperfragmenten mit diesem V3-Strukturausschnitt als Zielstruktur. Das Antigen soll eine minimierte Kohlenhydratstruktur an N301 (GlcNAc(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc) beinhalten, wohingegen das immunodominante GPGRAF-Motiv nicht Bestandteil der Zielstruktur sein soll. Zentrale Forderung für eine angestrebte breite HIV-Neutralisierung ist, dass der V3-Sequenzausschnitt ²⁹⁸RPNNNTR³⁰⁴ auch im Kontext des viralen, glycosylierten gp120 erkannt wird.

Ein etabliertes Verfahren zur Isolierung von spezifischen Antikörpern ist die *Phage Display* Methodik, bei der spezifisch bindende *single-chain* Antikörperfragmente (scFv) aus einer Bibliothek isoliert werden können. Zur Durchführung dieser Arbeit kann eine 10⁹ Klone umfassende Bibliothek von semisynthetischen scFv naiven, humanen Ursprungs eingesetzt werden (*Griffin.1*).

Im Anschluss an die Synthese diverser V3-Zielstrukturen in Kombination mit der Entwicklung und Durchführung geeigneter *Phage Display* Strategien sollen die daraus hervorgegangenen Klone bezüglich ihres Bindungsverhaltens charakterisiert werden. Die Analyse der Kinetik und Affinität der scFv/V3-Glycopeptid- und scFv/gp120-Interaktion kann mit Oberflächenplasmonenresonanzexperimenten durchgeführt werden. Durch Einsatz der STD NMR Spektroskopie können Epitope mit atomarer Auflösung auf Seiten der V3-Glycopeptide bezüglich ausgewählter scFv bestimmt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Peptide und Peptidkonjugate

3.1.1 Darstellung der Glycosylaminosäure Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH

Aus der Anwesenheit einer *N*-Typ Glycosylierung an Position N301 in den im Rahmen dieser Arbeit dargestellten V3-Peptiden ergibt sich die Einzigartigkeit des Selektionsansatzes im Vergleich zu bisher beschriebenen Selektionen mit linearen V3-Peptiden oder nicht glycosylierten gp120-Konstrukten. Anstelle eines komplexen Kohlenhydrats an Position N301 wurde bewusst die minimierte Kohlenhydratstruktur einer Chitobiosyleinheit gewählt. Würde ausschließlich das komplexe Glycan von den Antikörperfragmenten erkannt, bestünde keine Selektivität gegen die V3-Peptidsequenz. Die Chitobioseeinheit, welche lediglich den Kernbereich der Glycosylierung im direkten Umfeld des Proteingerüsts präsentiert, stellt somit eine geeignete Minimalstruktur dar (Abb. 1.4). Eine direkte Interaktion mit den *N*-Acetylglucosaminen der Chitobiose ist in sofern erwünscht, solange noch ein Bezug zu der V3-Peptidsequenz besteht.

Im Folgendem ist eine Syntheseroute für die Glycosylaminosäure Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH kurz wiedergegeben, bei welcher kommerziell preiswert erhältliches Chitin (**a1**) als Edukt eingesetzt wird, (Abb. 3.1).¹⁶⁸

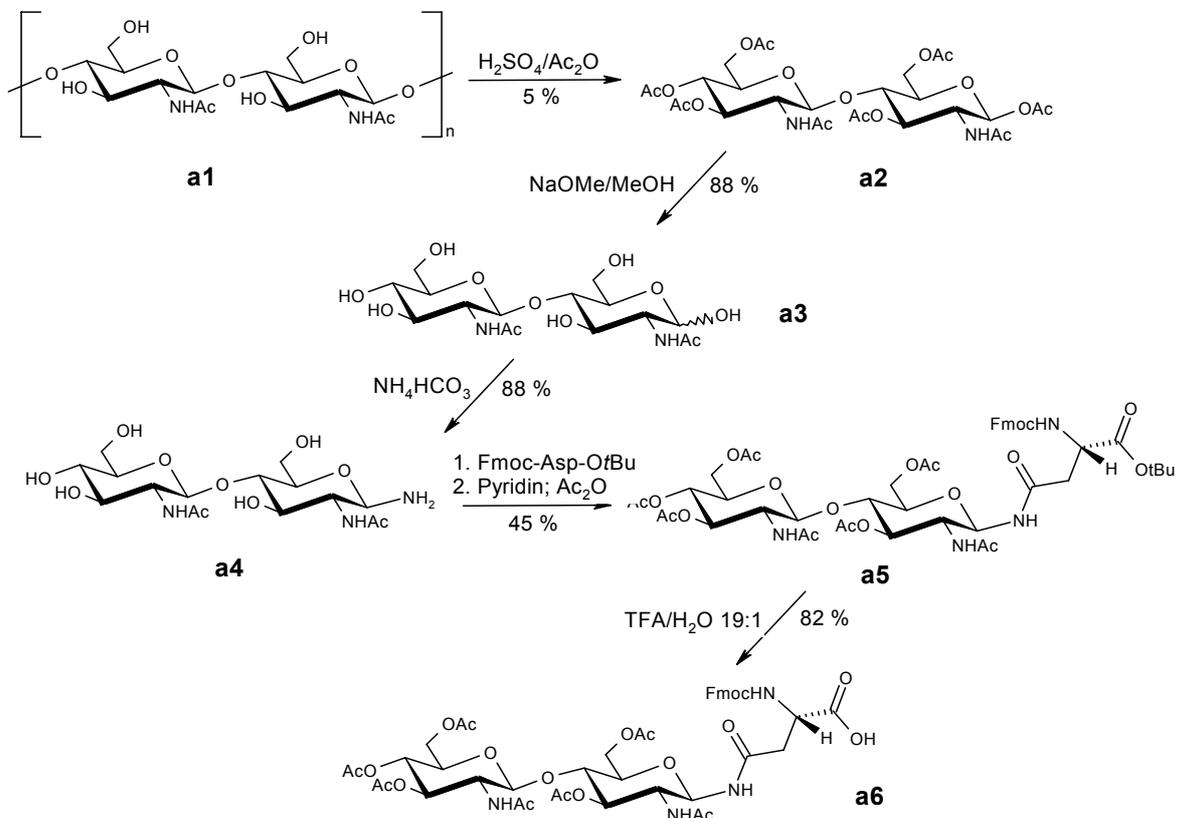


Abb. 3.1 Durchgeführte Reaktionsschritte und erzielte Ausbeuten bei der Darstellung von Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH.

Chitin wird unter Einwirkung von Schwefelsäure in das Dimer Chitobioseoctaacetat (**a2**) überführt. Deacetylierung von **a2** durch Einwirkung von Natriummethanolatlösung ergibt die *O*-deacetylierte Chitobiose (**a3**) als α/β -Anomerengemisch. Die Substitution der Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum durch eine Aminofunktion wird durch Umsetzung mit gesättigter NH_4HCO_3 -Lösung erreicht. Die Verknüpfung des Chitobiosylamins (**a4**) mit Fmoc-Asp-*Ot*Bu zu Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-*Ot*Bu (**a5**) erfolgt unter TBTU-Aktivierung der Seitenkettencarboxylgruppe von Asparaginsäure. Die verbleibenden Hydroxylgruppen der Kohlenhydrateinheit werden *in situ* acetyliert. Durch Zusatz von TFA/H₂O wird im letzten Schritt das *tert*-Butyl entschützte Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH (**a6**) erhalten.¹⁶⁸

3.1.2 Peptide und Glycopeptide

Im Rahmen dieser Arbeit war die Synthese von Peptiden und N-Typ Glycopeptiden eine grundlegende Arbeitsmethode. Die in Tab. 3.1 aufgeführten Peptide und Glycopeptide wurden für die Durchführung von SPR-Bindungsstudien und STD NMR Experimenten benötigt. Sie leiten sich von der Subtyp B V3-Konsensussequenz ab und tragen gegebenenfalls an der Position N301 eine Glycosylierung mit der Chitobiosyleinheit (Chi). Die Peptide **pG** und **pR** dienten im Verlauf der Arbeit als wichtige Referenzen bei Negativkontrollen. Um unerwünschte Redoxreaktionen von Thiolgruppen zu vermeiden, wurde an Position 296 Cystein gegen Serin ausgetauscht.

Tab. 3.1 Synthetisierte Peptide und Glycopeptide; grau unterlegt: Asn(Chi).

Peptid	291	301	309	Verwendung
p1	SVEINSTRPNNNTRKSIHI			STD NMR
p1c	SVEINSTRPNNNTRKSIHI			STD NMR
p2c		STRPNNNTRKSIHI		STD NMR
p3c		INSTRPNNNTRKSI		STD NMR
p4c		RPNNNTRKS		STD NMR
p5c		RPNNNTR		STD NMR
p6c		NNNTR		STD NMR
p7	SVEINSTR			Selektion/SPR
p8			KSIHI	Selektion/SPR
p9	KGGGGGSVEINST			SPR Epitope mapping
p10	KGGGGGTRPNNNTR			SPR Epitope mapping
p11	KGGGGGTRPNNNTR			SPR Epitope mapping
p12		KGGGGGGTRKSIHI		SPR Epitope mapping
pG	KGGGGGG			SPR Epitope mapping
pR	GIENDRTNGVTAKE			Nonsenspeptid

Die Synthese der Peptide erfolgte nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie automatisiert am Syntheseroboter an einem PAL-PEG-PS-Harz mit *N,N*-Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel. Ein Kupplungszyklus beinhaltete drei Kupplungsreaktionen mit vierfachem Überschuss an Aminosäure und je fünf Äquivalenten des Aktivators TBTU und der Base DIPEA. Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte simultan mit der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen im sauren Milieu (TFA/TIPS/H₂O; 95:5:2; v/v). Die Aufreinigung des Rohproduktes wurde mittels HPLC im präparativen Maßstab an einer RP-C₁₈-Phase mit einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril (jeweils 0.1% TFA) vorgenommen. Die Ausbeuten der Peptidsynthesen lagen zwischen 20 und 50% und die der Glycopeptidsynthesen zwischen 5 und 35% bezogen auf die Anzahl freier Aminofunktionen der eingesetzten Harzmenge. Es stellte sich heraus, dass die Belegung der verwendeten Harze nicht den Herstellerangaben entsprachen und somit die insgesamt niedrigen Ausbeuten begründet werden können. Genaue Angaben zu allen Synthesen sind im Kapitel 6.3 dieser Arbeit aufgeführt. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte in der Regel mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie und für im Rahmen von STD NMR-Experimenten relevante Peptide darüber hinaus mit Hilfe der 2D NMR-Spektroskopie.

Glycopeptide wurden unter Verwendung von Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH erhalten, wobei die Kupplungslösung aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Glycosylaminosäure stets manuell angesetzt und nur zweimal auf das Harz gegeben wurde. Die manuelle Zugabe verminderte vor allem Totvolumina und gewährleiste zusätzlich den Einsatz frisch angesetzter Lösungen. Zudem wurden dabei jeweils nur 1.2 Äquivalente dieser mit 1.5 Äquivalenten TBTU und DIPEA eingesetzt. Die Deacetylierung der Chitobiosyleinheit erfolgte nach der Fmoc-Abspaltung der letzten Aminosäure und vor der Abspaltung des Peptids vom Harz mit Methanol/Hydrazinhydrat (5:1).

3.1.3 Biotinylierte Glycopeptide

Die Selektion von scFv-präsentierenden Phagen sollte, wie in Kapitel 3.2 näher beschrieben, in Lösung durchgeführt werden. Dies bedeutete, dass ein gelöstes V3-Glycopeptid als Antigen zu den scFv-präsentierenden Phagen gegeben werden sollte. Der Komplex aus bindenden Phagen und dem V3-Glycopeptid sollte im Anschluss aus der Lösung isoliert werden. Dazu wurden die in Tab. 3.2 aufgezeigten Glycopeptide synthetisiert und N-terminal biotinyliert. Durch die Einführung der Biotinyleinheit konnten die Komplexe aus Phagen und V3-Glycopeptid mit Streptavidin-Eisenoxidpartikeln von nicht bindenden Phagen aus der Lösung heraus separiert werden. Die Kriterien zur Auswahl des jeweiligen Sequenzbereiches dieser vier Peptide sowie die genaue Strukturformel der Biotinyleinheit wird in den Ausführungen zu den Selektionsstrategien näher beschrieben.

Tab. 3.2 Synthetisierte biotinylierte Glycopeptide; grau unterlegt: Asn(Chi).

Peptid		291	301	309	Verwendung
p1cB	Biotin-		SVEINSTRPNNNTRKSIHI		Selektion
p3cB	Biotin-		INSTRPNNNTRKSI		Selektion
p5cB	Biotin-	GGGSGGGGSGGGTRPNNNTR			Selektion
p13cB	Biotin-		RPNNNTR		Selektion

Die Verknüpfung der Biotinyleinheit an den N-Terminus des Peptids wurde noch am Harz nach Abspaltung der letzten Fmoc-Gruppe vorgenommen. Dazu wurde *N*-(+)-Biotinyl-6-aminohexansäure unter TBTU-Aktivierung in *N,N*-Dimethylformamid eingesetzt.

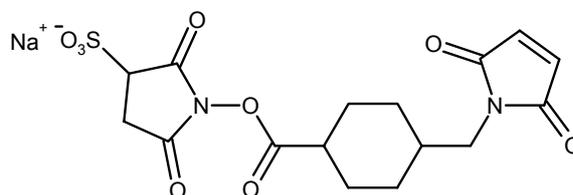
3.1.4 BSA-Peptidkonjugate

Der Verlauf von *Phage Display* Selektionen wird im Allgemeinen mittels eines geeigneten Immunoassays (ELISA) dokumentiert. Da sich die kurzen V3-Peptide nicht wie ein Protein auf der Oberfläche in geeigneter und ausreichender Weise immobilisieren ließen, wurden diese kovalent über die Thiofunktion eines N-terminal eingeführten Cysteins an BSA konjugiert (Tab. 3.3).

 Tab. 3.3 Dargestellte BSA-Peptid-Konjugate; grau unterlegt: Asn(Chi).

Konjugat		291	301	309	Verwendung
BSA-p1		BSA-CVEINSTRPNNNTRKSIHI			ELISA
BSA-p1c		BSA-CVEINSTRPNNNTRKSIHI			ELISA
BSA-p5c	BSA-C	GGGSGGGGSGGGTRPNNNTR			ELISA
BSA-pR	BSA-C	CIENDRTNGVTAKE			ELISA

Die Konjugation an BSA erfolgte durch das Reagenz Sulfo-SMCC (Abb. 3.2). Die durch Sulfo-*N*-Hydroxysuccinimid aktivierte Carboxylgruppe des Linkers wurde dabei zunächst mit den frei zugänglichen Aminogruppen von BSA verknüpft.


 Abb. 3.2 Sulfo-SMCC: Natrium-sulfosuccinimidyl-4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat

Bei Zugabe des Peptids erfolgt ein nukleophiler Angriff der Thiolgruppe an eines der zur Carbonylfunktion β -ständigen Kohlenstoffatome der Maleimidoeinheit. Diese Konjugate stellten sich als sehr geeignet für verschiedenste ELISA-Varianten heraus.¹⁶⁹

3.2 Selektion von Antikörperfragmenten

Die für die Umsetzung der Aufgabenstellung gewählten Selektionsstrategien beruhen alle auf der Selektion gegen V3-Peptide, um eine frei in Lösung befindliche, in ihrer Konformation nicht fixierte V3-Region vorliegen zu haben. *Modelling*-Studien von Huang *et. al.* mit Antikörpern und der V3-Region eines kristallisierten gp120-Konstrukts, konnten die Aussage unterstützen, dass die V3-Region im Kontext des gp120 für Antikörper durchaus gut zugänglich ist.^{39;170} Das im Subtyp B hochkonservierte immundominante GPGRAF-Motiv fehlt bewusst, da, wie in Kapitel 1.3 geschildert, eine Vielzahl an publizierten Antikörpern diese Region erkennen, jedoch nicht zur erfolgreichen Passivierung beitragen. Das Prinzip der *Phage Display* Selektionsstrategie ist in der folgenden Abbildung skizziert (Abb. 3.3).

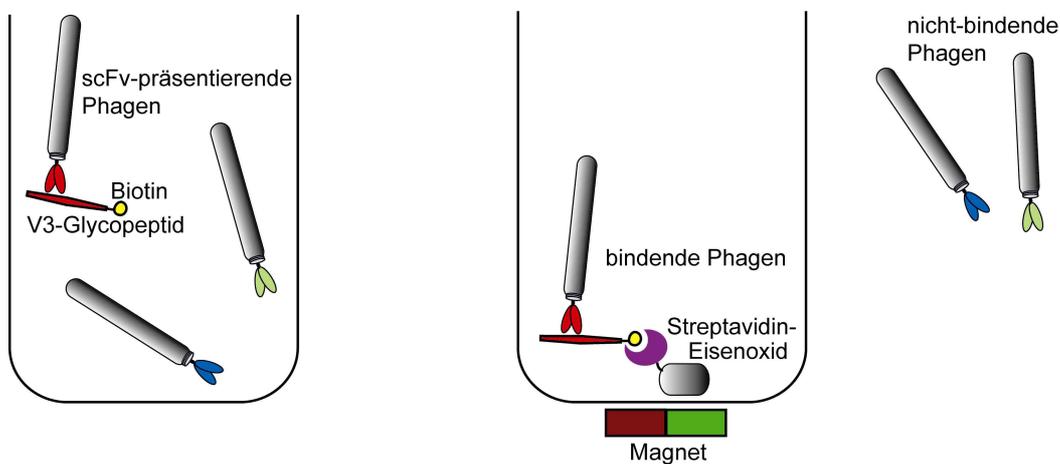


Abb. 3.3 Prinzip der Selektion in Lösung. Links: *scFv-präsentierende Phagen* mit biotinyliertem Antigen (*V3-Glycopeptid*). Spezifische Phagen binden an das sich frei in Lösung befindliche Peptid; Rechts: Nach Zugabe von *Streptavidin-Eisenoxid-Partikeln* werden bindende Phagen durch einen Magneten am Gefäßboden isoliert. Nicht-bindende Phagen werden durch Abnahme des Überstands entfernt.

Die in Form von *scFv-präsentierenden Phagen* eingesetzte Bibliothek *Griffin.1* beinhaltet etwa 10^9 Klone semisynthetischer, humaner Antikörperfragmente (*scFv*).¹⁷¹ Im Sinne dieser Arbeit sollte zunächst geprüft werden, ob bereits aus einer naiven Bibliothek heraus zufriedenstellend affine *scFv* mit neuartigen Epitopen isoliert werden können. Bei erfolgreichem Verlauf könnte die entwickelte Selektionsstrategie auch als Vorlage für ein *Screening* anderer, nicht-naiver Bibliotheken dienen.

3.2.1 Selektionsstrategie I

Die Wahl des Antigens fiel zunächst auf das biotinylierte *V3-Glycopeptid p1cB* (Abb. 3.4). Dieses beinhaltet N-terminal zur *V3-Region* zusätzlich den Sequenzbereich *S291-N295*. Da unerwünschte Nebenreaktionen der Thiolgruppe vermieden werden sollten,

wurde die Substitution C296S eingeführt, wobei Cystein und Serin weitestgehend homolog sind. Die N-terminale Extension der V3-Sequenz sollte dazu dienen, mit größerer Wahrscheinlichkeit bindende scFv isolieren zu können. Außerdem sind eventuell Einflüsse der N-terminalen Verlängerung auf die Konformation oder das Ladungsumfeld vorhanden. In weiteren Selektionsvarianten sollte dann dieser Bereich auf das hochkonservierte NNNTR-Motiv eingegrenzt werden. Das eingesetzte Biotinylreagenz weist als Besonderheit eine Disulfidbindung auf, wodurch die Option gegeben ist, die Elution bindender Phagen selektiv unter reduktiven Bedingungen durchzuführen.

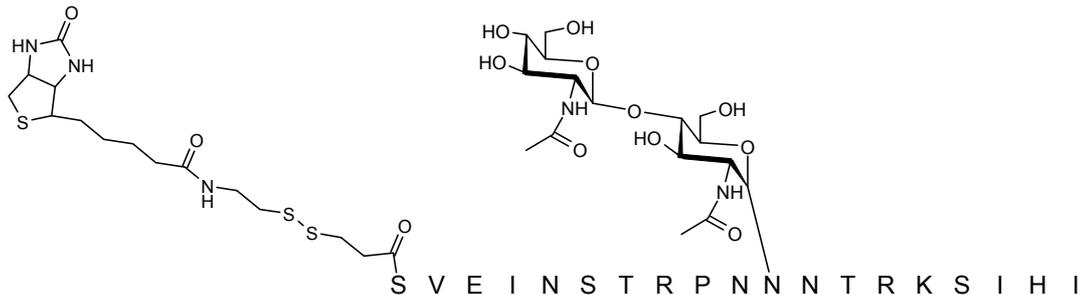


Abb. 3.4 Biotinyliertes V3-Glycopeptid **p1cB** (S291-I309). Die Glycosylierung besteht aus zwei $\beta 1 \rightarrow 4$ verknüpften N-Acetylglucosaminen (Chitobiose, Chi) und ist kovalent mit N^{ϵ} der Seitenkette von N301 verknüpft.

Die scFv-Bibliothek *Griffin.1* wurde mit einem Titer von etwa $5 \cdot 10^{13}$ scFv-präsentierender Phagen pro Milliliter zunächst mit 4% Milchpulver vorinkubiert bevor der Ansatz mit **p1cB** versetzt wurde (Konzentration 300 nM). Die Isolierung des Komplexes aus bindenden Phagen und dem V3-Glycopeptid erfolgte durch Zugabe von Streptavidin-Eisenoxidpartikeln und Einsatz eines Magneten. Mehrfaches Resuspendieren des Pellets in mit Tween20 versetztem Phosphatpuffer sorgte für stringente Bedingungen. Die Elution der bindenden Phagen von den Partikeln wurde durch Zugabe von Triethylamin (0.1 M) bewirkt. Die eluierten Phagen konnten im Anschluss zur Infektion von *E. coli* TG1 Zellen verwendet werden. Dieser ersten Selektionsrunde folgten zwei weitere, die jedoch zusätzlich einen Vorselektionsschritt beinhalteten. Um eine Anreicherung von Phagen mit Spezifität bezüglich Streptavidin oder BSA zu vermeiden, wurden diese Proteine nicht-kovalent auf der Oberfläche eines Polystyrolröhrchens immobilisiert und die Phagen noch vor der eigentlichen Selektion darin inkubiert. Eine weitere Vorselektion wurde analog gegen deaktiviertes Biotinylierungsreagenz vorgenommen.

Der Dokumentation des Verlaufes der Selektionen erfolgte durch ELISA. Bindende Phagen wurden mit anti-M13/HRP-Antikörperkonjugaten detektiert. Eine durch Zugabe von Substrat (ABTS) eingeleitete Farbreaktion ließ sich photometrisch dokumentieren.

Zunächst wurde versucht, die V3-Glycopeptide adsorptiv auf einem ELISA-Gefäßboden zu immobilisieren und damit sowohl poly- als auch monoklonale Phagen zu untersuchen.

Dabei zeigte sich, dass auf diese Weise keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, weshalb davon auszugehen ist, dass die V3-Peptide in ungenügender Menge immobiliserten oder in dieser Form den scFv nicht mehr zugänglich waren.

Ein aussagefähiges ELISA-System lag erst nach der Darstellung von BSA-Peptid-Konjugaten vor. Das in Abb. 3.5 gezeigte Ergebnis eines ELISA demonstriert deutlich die erreichte Selektivität der polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen nach der dritten Selektionsrunde.

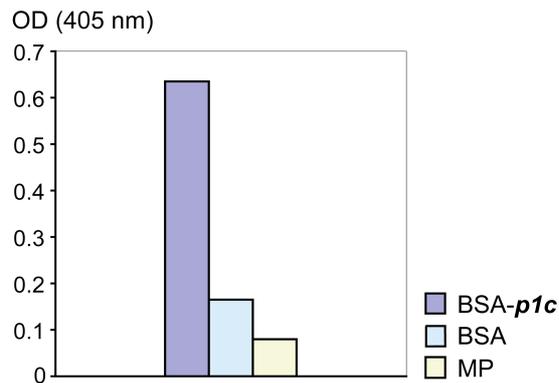


Abb. 3.5 ELISA mit polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen nach der dritten Selektionsrunde. Die polyklonalen Phagen interagieren nicht mit BSA und Milchpulver (MP), jedoch deutlich mit dem BSA-V3-Glycopeptidkonjugat (BSA-*p1c*).

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, liegt keine Interaktion mit BSA vor, womit sich die Glycopeptid-BSA-Konjugate als geeignet zur Selektion spezifischer Phagen erwiesen. Aus dieser stark angereicherten Bibliothek wurde eine Vielzahl von Klonen isoliert, von denen etwa 85% Immunoreaktivität gegenüber dem V3-Glycopeptid *p1c* aufzeigten. Eine Auswahl von vier Klonen wurde durch die Ermittlung der im Anhang dieser Arbeit aufgeführten Sequenzen näher charakterisiert (Abb. 3.6).

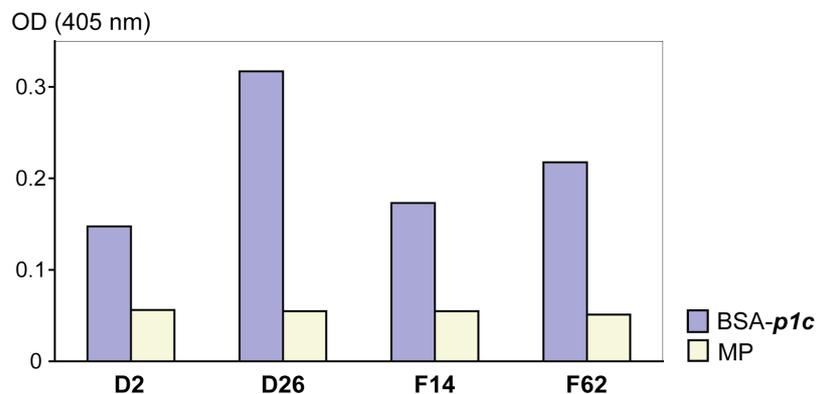


Abb. 3.6 ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen, die nach der dritten Selektionsrunde mit *p1cB* als Antigen isoliert wurden. Für alle Klone wurde Immunoreaktivität bezüglich des V3-Glycopeptidkonjugates registriert. Als Negativkontrolle diente immobilisiertes Milchpulver (MP).

Der Klon **D26** wies sich bei wiederholten ELISA-Analysen stets durch ein besonders hohes Signal aus, was auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt werden kann. Zum einen kann eine im Vergleich zu anderen Klonen höhere Affinität von scFv **D26** vorliegen, zum anderen kann jedoch auch das Expressionslevel von funktionalen scFv-präsentierenden Phagen höher sein als bei anderen Klonen. Auch wenn **D26** daher nicht zwangsweise der immunoreaktivste Klon ist, kann er durch seine hohe Signale im ELISA gut für weitergehende Bindungsstudien verwendet werden.

Von unmittelbarem Interesse bei der Charakterisierung der Klone war die Differenzierung zwischen Peptid und Glycopeptid. Dazu wurde ein entsprechendes BSA-Konjugat mit einem nicht-glycosylierten V3-Peptid dargestellt (**p1**). Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist, liegt für **D26** kein signifikanter Unterschied in der Erkennung der Peptide vor. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde ein Peptid einer Nonsensesequenz (CIENDRTGNVTAKE) synthetisiert und an BSA konjugiert (BSA-**pR**). Da auch hier keine Interaktion mit den **D26** scFv-präsentierenden Phagen vorliegt, kann eine Spezifität sowohl zu BSA als auch zu der SMCC-Linkereinheit ausgeschlossen werden.

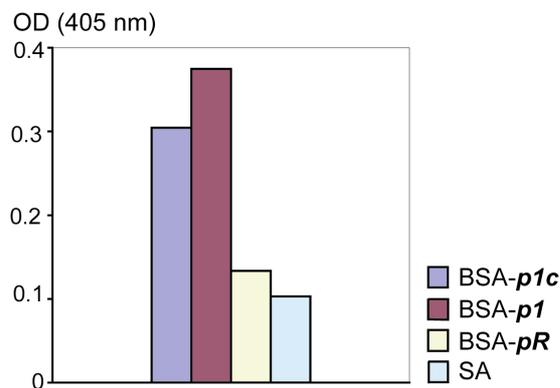


Abb. 3.7 ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen des Klon **D26**. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen V3-Peptid- (**p1**) und V3-Glycopeptid-(**p1c**)-Interaktion auszumachen. Das Nonsensepeptidkonjugat (BSA-**pR**) und Streptavidin (SA) werden nicht erkannt.

Bei der Bewertung der ELISA-Ergebnisse bezüglich der Peptid-Glycopeptid-Differenzierung ist zu bedenken, dass die Qualität der eingesetzten Konjugate nicht näher überprüft wurde. In MALDI-TOF-MS-Spektren der BSA-Peptidkonjugate konnten keine separierte Signale erhalten werden, was neben dem Auflösungsvermögen des Spektrometers, auf die ausgeprägte Mikroheterogenität der Proben zurückzuführen war. Schon die Verknüpfung von BSA mit sulfo-SMCC führt zu einer undefinierten Anzahl von etwa 12 bis 15 mit SMCC derivatisierten Peptidverknüpfungsstellen. Da auch die

Thiolkupplung des Peptids vermutlich nicht einheitlich verlief, kommt es zu einer Vielzahl an unterschiedlich stark derivatisierten BSA-Molekülen.

Zusammenfassend führte die Durchführung der gewählten Selektionsstrategie I erfolgreich zu monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen, die spezifisch mit dem V3-Peptid und dem V3-Glycopeptid wechselwirken. Ebenso wie **D26** zeigte kein anderer der isolierten Klone eine Differenzierung zwischen Peptid und Glycopeptid. Ein die Immunreaktivität verstärkender Effekt durch die Chitobiosyleinheit ist also nicht vorhanden.

3.2.2 Selektionsstrategie II

Der Klon **D26** zeigte als Repräsentant der ersten Selektionsstrategie im ELISA keine Differenzierung zwischen Peptid und Glycopeptid. Es sollte mit einer veränderten Selektionsstrategie versucht werden, eine Verschiebung der Spezifitäten zugunsten der Chitobiosyleinheit zu erreichen. Dazu wurde folgendes V3-Glycopeptid synthetisiert:

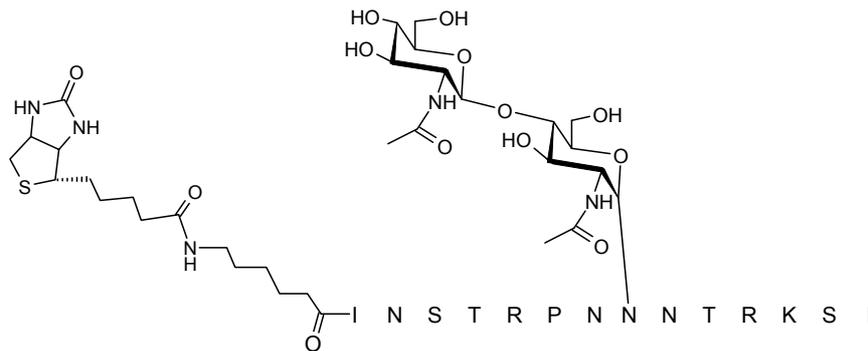


Abb. 3.8 Biotinyliertes V3-Glycopeptid **p3cB** (I294-I307).

Das Peptid **p3cB** ist verglichen mit **p1c** N-terminal um drei Aminosäuren und C-terminal um H308 und I309 verkürzt. Der Bereich um das NN(Chi)NTR-Motiv ist daher stärker eingegrenzt. Da aus der ersten Selektionsstrategie bereits erfolgreich spezifische Klone hervorgingen, dienten die polyklonalen Phagen nach der ersten Selektionsrunde der Selektionsstrategie I als Ausgangspunkt für die zweite Strategie. Es erfolgten der Strategie I analoge Selektionsrunden wobei das Peptid KSIHI (**p8**) kompetitiv zu den Phagen gegeben wurde. Das KSIHI-Motiv ist im Vergleich zu NNNTR nur zu einem sehr geringen Ausmaß konserviert. Somit würden Antikörper, die KSIHI erkennen vermutlich nur sehr isolatspezifisch an gp120 binden und keine breit-neutralisierenden Eigenschaften besitzen. Des Weiteren wurde eine Vorselektion mit Streptavidin-Eisenoxid-Partikeln anstelle von Streptavidin durchgeführt. Das Ergebnis dieser Selektionsstrategie ist mit Abb. 3.9 dokumentiert.

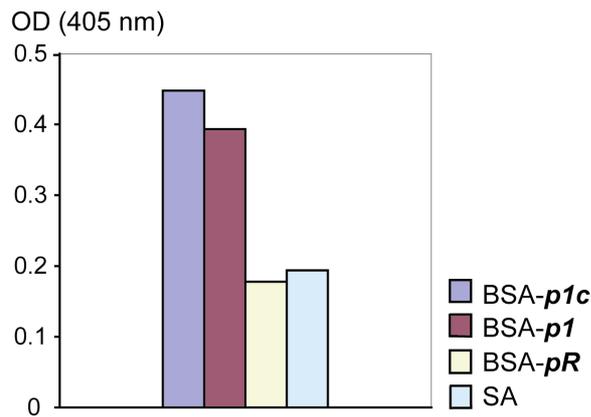


Abb. 3.9 ELISA von polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen nach der dritten Selektionsrunde mit dem Antigen **p3cB**. Auch bei dieser polyklonalen Probe ist die geforderte Selektivität vorhanden. Deutliche Immunreaktivität gegenüber den V3-Peptidkonjugaten BSA-p1c und BSA-p1 im Gegensatz zu dem Nonsenspeptidkonjugat (BSA-pR) und Streptavidin (SA) liegt vor.

Nach drei Selektionsrunden konnten auf polyklonaler und monoklonaler Ebene scFv-präsentierende Phagen mit Affinität zum V3-Peptid und Glycopeptid erhalten werden. Der Versuch, einzelne Klone zu isolieren, scheiterte daran, dass bei der Sequenzanalyse oft fehlende variable Regionen (VH oder VL) festgestellt wurden und von vollständigen scFv das Expressionslevel zu niedrig für einen Nachweis mittels Immunoblot war. Ein eventueller Zusammenhang mit den gewählten Selektionsbedingungen konnte nicht hergestellt werden. Der einzige charakterisierte Klon dieser Selektionsstrategie, dessen Sequenz im Anhang dieser Arbeit aufgeführt ist, ist **L72** (Abb. 3.10).

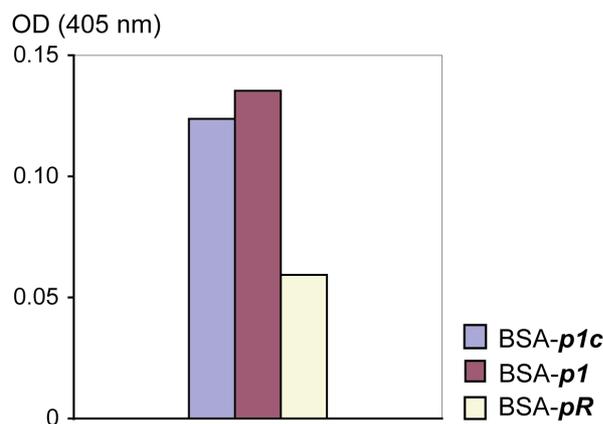


Abb. 3.10 ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen des Klons **L72** nach der dritten Selektionsrunde mit dem Antigen **p3cB**. Die Affinität gegenüber dem V3-Glycopeptid (**p1c**) und dem V3-Peptid (**p1**) ist gleich.

Auch Klon **L72** zeigt im ELISA keine Differenzierung zwischen Peptid und Glycopeptid, so dass diese Selektionsstrategie nicht den gewünschten Effekt zeigte. Zudem wies **L72** im direkten Vergleich mit **D26** stets niedrigere Signale im ELISA auf.

3.2.3 Selektionsstrategie III

Das im Vergleich zu *p1c* deutlich verkürzte, biotinylierte V3-Glycopeptid *p13c* war Zielstruktur der dritten Selektionsstrategie. Bei der Wahl des Biotinlinkers wurde nicht bedacht, ein mit Hexansäure verlängertes Derivat einzusetzen.

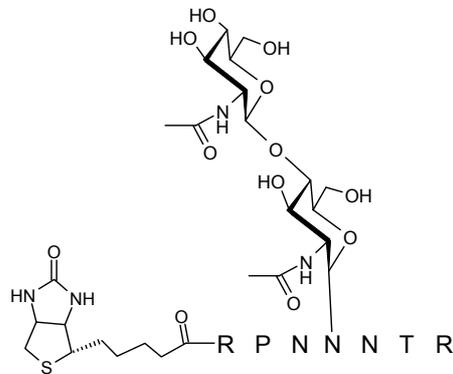


Abb. 3.11 Biotinyliertes V3-Glycopeptid *p13cB* (R298-R304). Biotin wurde in diesem Fall ohne Hexansäurekette direkt an das V3-Glycopeptid konjugiert.

Die Selektionen erfolgten ausgehend von der naiven *Griffin.1*-Bibliothek analog zu den bisher durchgeführten Selektionen. Es konnten jedoch auch nach drei Selektionsrunden keine V3-spezifischen Klone isoliert werden. Als Ursache für den Misserfolg der Selektionen kann sicherlich das Fehlen einer Hexansäureeinheit in Betracht gezogen werden. Im Verlauf der Selektion wird Biotin von Streptavidin gebunden.¹⁷² Daraus kann sich eine sterische Verdrängung von in unmittelbarer Nähe zur Biotineinheit bindenden scFv-präsentierenden Phagen durch das Streptavidin ergeben.¹⁷³

3.2.4 Selektionsstrategie IV

Ein weiterer Selektionsansatz wurde mit dem Glycopeptid *p5cB* verfolgt (Abb. 3.12). Dieses Peptid beinhaltet den V3-Sequenzbereich T297 bis R304 in Verbindung mit einem Glycin/Serin-Linker, welcher einen genügenden Abstand zur Biotineinheit gewährleisten sollte. Obwohl dieser Umstand schon durch die Hexansäureeinheit berücksichtigt wurde, enthält *p5cB* zusätzlich einen Glycin/Serin-Linker.



Abb. 3.12 Biotinyliertes verkürztes V3-Glycopeptid *p5cB* mit Glycin/Serin-Linker; der V3-Sequenzabschnitt ist T297-R304.

Es erfolgten drei Selektionsrunden beginnend mit der naiven *Griffin.1*-Bibliothek mit Vorselektionen gegen Streptavidin-Eisenoxid-Partikel und BSA. Das Ergebnis von drei aufeinanderfolgenden Selektionsrunden ist in Abb. 3.13 zu sehen und belegt, dass auch diese Selektionsstrategie nicht zum Erfolg führte.

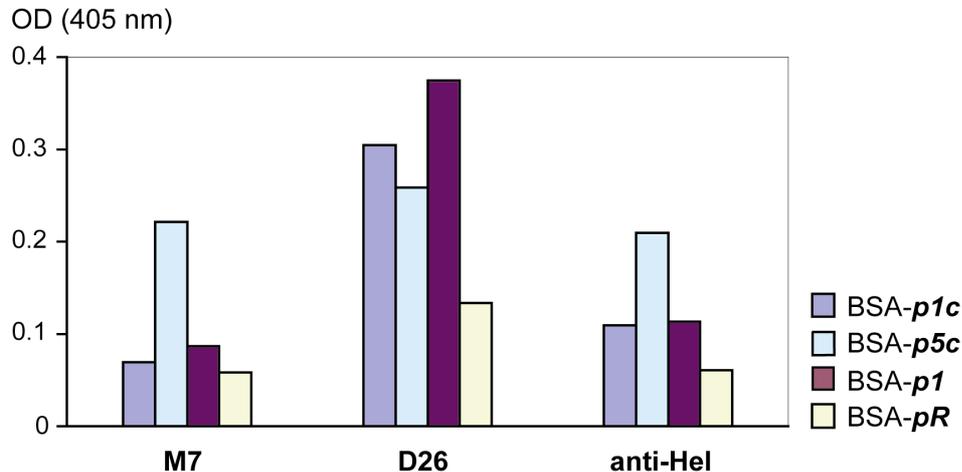


Abb. 3.13 ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen. Klon **M7** entstammt aus der Selektionsstrategie IV wohingegen **D26** aus Strategie I isoliert wurde. Anti-**Hel** ist ein scFv der selektiv an Hühnereiweißlysozym bindet. Alle drei Klone zeigen Affinität zu dem Konjugat **BSA-p5c** ($BSA-CG_3SG_4SGGTRPNN(Chi)NTR$). Darüber hinaus interagiert **M7** mit keinem der V3-Konjugate **BSA-p1c** und **BSA-p1**. Die Bindung an **BSA-p5c** ist daher unspezifisch und vermutlich gegen den Glycin/Serin-Linker gerichtet.

Ein charakteristischer Vertreter von den nach der dritten Selektionsrunde isolierten Klonen ist **M7**. Er bindet im ELISA das BSA-Konjugat mit dem Glycopeptid **p5c** jedoch an keines der anderen Konjugate. Eine Interaktion mit dem Glycopeptid **p1c** sollte eigentlich zusätzlich vorliegen, wenn **M7** tatsächlich spezifisch mit dem glycosylierten V3-Segment interagiert. Dieses Verhalten legt die Vermutung nahe, dass **M7** an den Glycin/Serin-Linker bindet. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die ELISA-Analyse des Klons **D26** und einem gegen Hühnereiweiß-Lysozym gerichtetem Klon (anti-**Hel**). Ein deutliches Signal der scFv-präsentierenden Phagen bezüglich **BSA-p5c** ist auch hier vorhanden. Warum die scFv scheinbar eine Interaktion mit der Glycin/Serin-Kette eingehen, zumal sie selber eine solche Sequenz als Linker beinhalten, ist nicht unmittelbar nachzuvollziehen und wird im Zusammenhang mit durchgeführten SPR-Studien im Rahmen dieser Arbeit noch diskutiert werden.

Es ist hervorzuheben, dass anti-**Hel** nicht die V3-Peptide erkennt. Dieses ist eine weitere Bestätigung der Spezifität der isolierten Klone aus den Selektionsstrategien I und II. Die Synthese eines **p13cB** analogen Peptides mit Hexansäureeinheit wurde nicht durchgeführt, da generelle Zweifel bestanden, ob dieses kurze Peptidfragment in **p13cB** und **p5cB** überhaupt in geeigneter Weise das native Epitop der V3-Region repräsentiert.

3.2.5 Selektion mit immobilisiertem gp120

Die bislang gewählten Selektionsbedingungen führten zu scFv, die ein konformativ freies sowie ein an BSA konjugiertes V3-Glycopeptid binden. Der Beleg über das Vermögen der scFv, auch an natives, glycosyliertes gp120 zu binden, ist jedoch noch zu erbringen. Dazu wurde ein ELISA mit zusammengefassten polyklonalen Phagen der dritten Runde der Selektionsstrategien I und denen der Strategie II mit gp120 als Antigen durchgeführt. Die dabei eingesetzte gp120-Lösung war eine Mischung aus drei rekombinant exprimierten gp120-Isolaten (SF162, IIIB und Bal), die über das NIH AIDS Research and Reference Programm und von der Firma ImmunoDiagnostics (Woburn, USA) bezogen wurden.²⁹ Als Besonderheit wurde sCD4 zusammen mit den Phagen bei 37 °C eingesetzt, um möglicherweise die V3-Region des gp120 konformativ zugänglicher zu machen. Adsorptiv immobilisiertes gp120 wurde zudem für eine Selektion ausgehend von einem *Pool* V3-Glycopeptid-spezifischer Phagen genutzt. Um Klone mit möglichst starker gp120-Affinität zu selektieren, wurde die Anzahl der Waschschriffe im Laufe der drei durchgeführten Selektionsrunden deutlich erhöht. Der Verlauf dieser erfolgreich durchgeführten Selektionen ist in Abb. 3.14 dokumentiert.

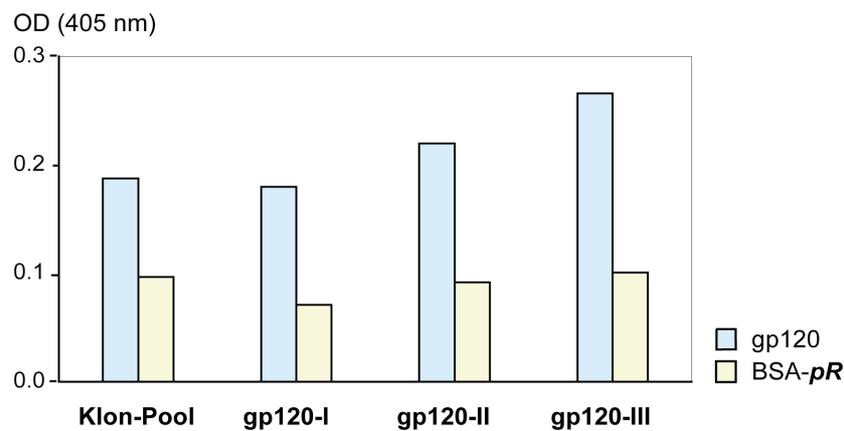


Abb. 3.14 ELISA mit polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen zur Verfolgung des Selektionsverlaufes gegen auf Polystyrol immobilisiertes gp120. Als Negativkontrolle diente ein BSA-Nonsenspeptidkonjugat (BSA-pR). Eine Steigerung der gp120-Affinität ist erkennbar.

Nach der dritten gp120-Selektionsrunde wurden vier Klone isoliert und bezüglich ihrer DNA-Sequenz analysiert, wobei sich herausstellte, dass alle vier Klone identisch waren (Klon **P2**). Die vollständige Sequenz dieses Klons ist im Anhang dieser Arbeit angegeben. Die gewählten stringenten Bedingungen führten somit offensichtlich zu einer ausgeprägten Selektion. Das Ergebnis eines ELISA mit scFv-präsentierenden Phagen des Klons **P2** im Vergleich zu Klon **D26** ist in Abb. 3.15 gezeigt.

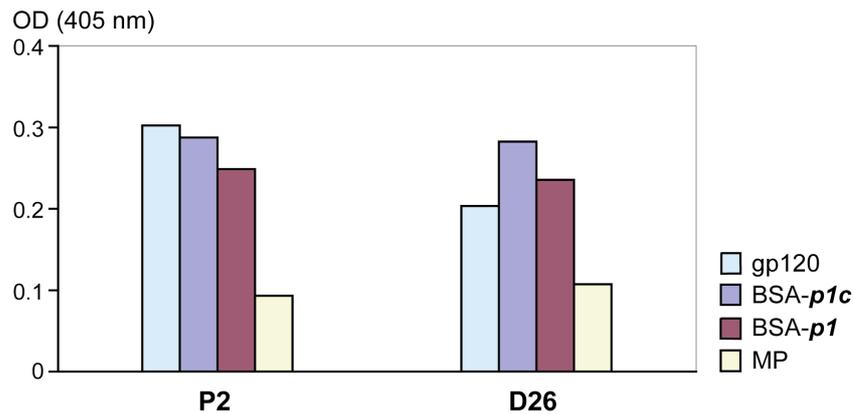


Abb. 3.15 ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen. Der aus der Selektionsrunde „gp120-III“ isolierte Klon **P2** zeigt eine höhere Immunoreaktivität mit gp120 als Klon **D26**. Affinität ist zudem gegenüber dem BSA-V3-Glycopeptid-(**p1c**) und dem **p1**-Peptidkonjugat vorhanden. Als Negativkontrolle diente Milchpulver (MP).

Im ELISA wurde für Klon **P2** gegenüber gp120 stets ein höheres Signal als bei Klon **D26** erhalten. Dennoch ist festzuhalten, dass auch die scFv-präsentierenden Phagen von Klon **D26** Bindung an gp120 zeigen. Ein möglicher Einfluss von sCD4 auf die Interaktion mit den scFv sollte durch einen ELISA mit und ohne Anwesenheit von sCD4 aufgezeigt werden. Wie sich in Abb. 3.16 zeigt, konnte durch Anwesenheit von sCD4 kein Unterschied in der Immunoreaktivität gegenüber gp120 ausgemacht werden. Die scFv von Klon **P2** scheinen also freien Zugang zu der V3-Region des immobilisierten gp120 zu haben.

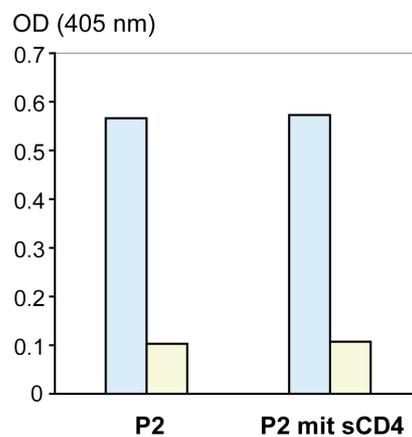


Abb. 3.16 ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen von Klon **P2**; links: ohne sCD4-Inkubation; rechts: mit sCD4-Inkubation. Es liegt keine Abhängigkeit von sCD4 vor. Als Negativkontrolle diente Milchpulver (MP).

Als Ergebnis dieses Selektionsansatzes bleibt festzuhalten, dass mit **P2** erfolgreich ein Klon isoliert werden konnte, dessen scFv-präsentierende Phagen im ELISA an das kurze, flexible V3-Glycopeptid jedoch auch an das vollständig glycosylierte Vollängenprotein gp120 binden.

3.2.6 Vergleichender ELISA mit scFv P2 und IgG3 447-52D

Am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg wurde ein Proteinkonstrukt entwickelt, welches aus einem IgY Δ C1 Antikörperfragment fusioniert an eine erweiterte Subtyp B V3-Loop besteht (V3-IgY Δ C1).¹⁷⁴ N- und C-terminale Glycosylierungsstellen außerhalb der V3-Sequenz wurden durch Mutation entfernt. Abb. 3.17 zeigt eine schematische Abbildung dieses V3-Konstruktes.

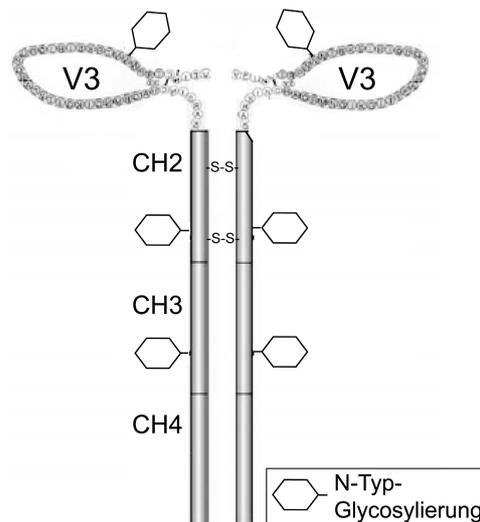


Abb. 3.17 Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus V3-Region und IgY Δ C1.

Im Rahmen dieser Arbeit diente das Konstrukt der Überprüfung, ob die scFv komplette V3-Sequenzen erkennen. In Abb. 3.18 ist das Ergebnis eines ELISA präsentiert, bei dem zu erkennen ist, dass scFv-präsentierende Phagen in der Lage sind das V3-Konstrukt zu binden. Zum Vergleich wurde parallel zu den Phagen des Klons **P2** auch der V3-Antikörper IgG3 **447-52D** auf seine Affinität gegenüber dem V3-Konstrukt untersucht (Abb. 3.18).

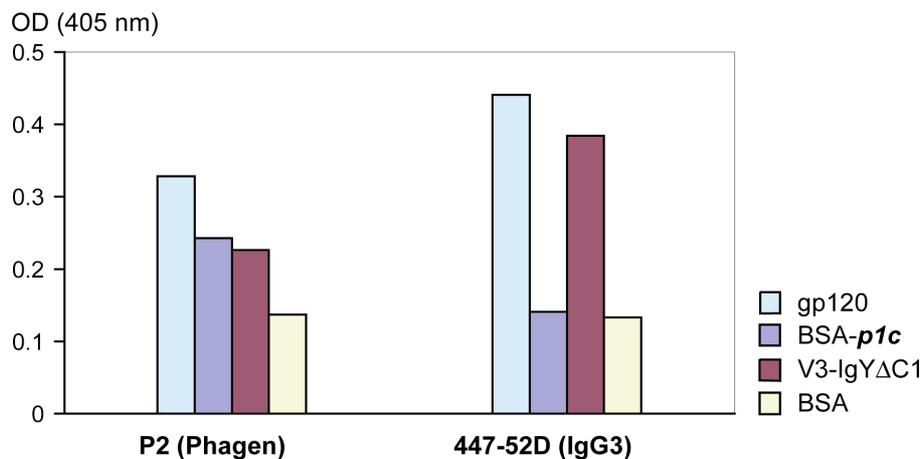


Abb. 3.18 Ergebnis eines ELISA mit scFv-präsentierenden Phagen von Klon **P2** und dem V3-Antikörper **447-52D**.²⁹ ScFv **P2** bindet auch an V3-Vollängensequenzen und weist, wie durch die Bindung an **BSA-p1c** belegt, im Gegensatz zu **447-52D** ein GPGRAF-unabhängiges Epitop auf.

Mit Abb. 3.18 ist deutlich belegt, dass die im Rahmen dieser Arbeit selektierten scFv **P2** ein anderes Epitop aufweisen als der Antikörper **447-52D**. Das V3-Konstrukt beinhaltet das für die Bindung von **447-52D** essentielle GPGRAPH-Motiv, welches nicht durch das BSA-Glycopeptidkonjugat (BSA-*p1c*) präsentiert wird. ScFv-präsentierende Phagen des Klons **D26** konnten ebenfalls positiv auf die Erkennung des V3-Proteinkonstrukts getestet werden. Die Höhe der Signale der ELISA-Studien mit scFv **D26** und **P2** waren im Gegensatz zu den mit **447-52D** erhaltenen stets geringer. Dabei ist zu bedenken, dass die scFv lediglich monovalenter Natur sind und dass die Art der Detektion im ELISA auf verschiedene Weise erfolgte.

Es sei darauf verwiesen, dass dieses IgGY Δ C1-Konstrukt sowohl in Bezug auf das Vorliegen der V3-Region in zyklisierter Form ebenso wie auch in Bezug auf eine vorhandene Glycosylierung innerhalb der V3-Loop nicht untersucht wurde. Da die Expression des Konstruktes in HEK293-Zellen erfolgte, sind beide Kriterien jedoch wahrscheinlich erfüllt.

Wie durch ELISA-Studien mit scFv-präsentierenden Phagen demonstriert, konnten mit **P2** und **D26** erfolgreich scFv aus der *Griffin.1* Bibliothek isoliert werden, welche das V3-Glycopeptid, die komplette V3-Region als auch das virale Glycoprotein gp120 binden und deren Epitope N-terminal des GPGRAPH-Motives lokalisiert sind. Die angereicherten Bibliotheken der verschiedenen Selektionsstrategien sind potentielle Ausgangspunkte für die Isolierung weiterer V3-affiner Klone nach bestimmten Kriterien. Der in dieser Arbeit konzipierte *Phage Display* Selektionsansatz unter Verwendung von gelösten V3-Glycopeptiden und einer naiven semisynthetischen scFv-Bibliothek konnte somit in vollem Maße erfolgreich umgesetzt werden.

3.3 Sequenzanalyse

Einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der selektierten Klone stellt die Ermittlung von DNA-Sequenzen der scFv-Genabschnitte auf den Phagemidvektoren dar. In Tab. 3.4 sind die ermittelten Aminosäuresequenzen der komplementaritätsbestimmenden Regionen von sechs ausgewählten Klonen angegeben.

Tab. 3.4 Ermittelte Aminosäuresequenzen der komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) ausgewählter Klone. Die Zuordnung der Regionen erfolgte nach Kabat et. al.^{175;176} Die vollständigen Sequenzen der scFv sind im Anhang dieser Arbeit wiedergegeben.

	Selektionsstrategie	Kette	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
D2	I	VH3	SYAMH	VISYDGSNKYYADSVKG	VKHKMNKGR
D26	I	VH1	SYAMH	WINAGNGNTKYSQKFQG	GKLHKFERPKH
F14	I	VH3	SYAMS	AISGSGGSTYYADSVKG	TKHKQAKPPRD
F62	I	VH3	SYAMS	AISGSGGSTYYADSVKG	DNAKRKNQS
L72	II	VH1	SYDIN	WMNPNSGNTGYAQKFQG	PIAMRDSW
P2	gp120	VH3	DYGMS	GINWNGGSTGYADSVKG	GKGLGKYKRF

	Selektionsstrategie	Kette	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
D2	I	Vκ1	QASQDISNYLN	DASNLET	QQYDNLHT
D26	I	Vκ1	QASQDISNYLN	DASNLET	QQYDNLRT
F14	I	Vλ3	QGDSLRSYAS	GKNNRPS	NSRDSSGNHMV
F62	I	Vλ3	QGDSLRSYAS	GKNNRPS	NSRDSSGTV
L72	II	Vλ3	QGDSLRSYAS	GKNNRPS	NSRDSSDNHRRV
P2	gp120	Vλ1	TGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPS	QSYDSSXSV

Alle Sequenzen konnten humanen Keimbahnsequenzen zugeordnet werden. Die CDR-H3- und CDR-L3-Regionen der scFv sind semisynthetisch, da diese durch Insertionen von Zufallssequenzen modifiziert worden sind.¹⁷¹ Die Sequenz des Klons **P2** hebt sich durch eine längere CDR-L1 hervor. Außer bei Klon **L72** ist in den CDR-H3 eine hohe Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin zugegen. Die Klone **D2**, **D26**, **F14** und **P2** weisen in dieser Region jeweils drei Lysine und ein Arginin auf.

3.4 Expression der scFv

Bislang wurden lediglich ELISA-Untersuchungen mit scFv-präsentierenden Phagen zur Charakterisierung der Klone präsentiert. Von Bedeutung ist jedoch auch, in wie weit die scFv in der Lage sind, diese Bindungseigenschaften auch in nicht Phagen-assoziiierter Form aufzuzeigen. Daher war es notwendig, scFv ausgewählter Klone in *E. coli* HB2151 Zellen zu exprimieren. HB2151-Zellen gehören zu den Nonsuppressor-Zellen, welche das *amber*-Codon des pHEN2-Phagemidvektors als Stop-Codon erkennen und somit unter IPTG-Induktion scFv in den periplasmatischen Raum der *E. coli* Zelle sekretieren. Nach einem Sucroseaufschluss der äußeren Zellmembran waren die scFv zugänglich und konnten über ihre C-terminale His₆-Sequenz an mit Nickelionen beladener NTA-Agarose aus dem periplasmatischen Extrakt isoliert werden.

Der Nachweis von scFv erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblot. Letzterer beruht auf der Anwesenheit der *myc*-Sequenz am C-Terminus der vom pHEN2-Phagemidvektor abgeleiteten scFv (Abb. 3.19).



Abb. 3.19 Nachweis von isolierten scFv des Klons **D26**: links: Mit Coomassie-Blau angefärbtes 12%iges SDS-PAGE-Gel mit Proteinmarker (reduzierend); rechts: mit anti-myc-AP-Konjugat inkubierter Immunoblot eines solchen Gels mit Proteinmarker. Die Bande der scFv **D26** ist umkreist. Das Molekulargewicht von scFv beträgt etwa 29 kD.

Darüber hinaus wurden die scFv mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer im Positivionenmodus vermessen. Dieses sollte vor allem dazu dienen, durch Vergleich des theoretisch berechneten Molekulargewichts mit dem experimentell bestimmten, zu überprüfen, ob die bestimmte Sequenz eines Klons tatsächlich dem exprimierten Protein entspricht. Ab einer Konzentration von etwa 10 μ M konnten die scFv direkt aus Phosphatpuffer heraus mit α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CCA) als Matrix desorbiert und ionisiert werden. Ein vorhergehendes Entsalzen durch Dialyse oder Einsatz eines entsprechenden Säulenmaterials erwies sich als nicht notwendig. Die Kalibrierung wurde durch externe Vermessung eines Probenstandards im Massenbereich von 12 bis 66 kD

vorgenommen. Das durch MALDI-TOF-MS bestimmte Molekulargewicht wurde mit der theoretisch berechneten Masse (*average*) verglichen, wobei eine gute Übereinstimmung festgestellt werden konnte (Tab. 3.5).¹⁷⁷ In Abb. 3.20 ist ein MALDI-TOF-Spektrum von scFv des Klon **F62** abgebildet (oben).

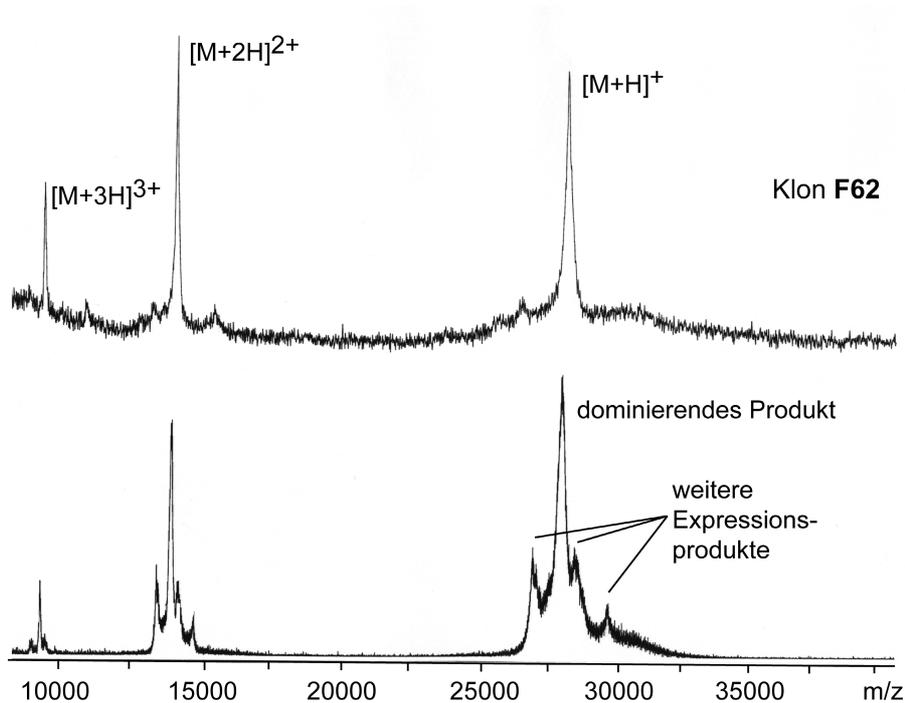


Abb. 3.20 MALDI-TOF-MS Spektren von scFv. *oben*: monoklonale scFv des Klons **F62**. *unten*: dominierender scFv-Klon und nicht charakterisierte Proteine, die eventuell auf Oligoklonalität zurückzuführen sind (*m/z* verschoben). Die Spektren wurden durch eine Premix-Präparation mit CCA und scFv in PBS ($n_{scFv} = 10\text{-}15$ pmol) erhalten.

Bei Betrachtung des unteren Spektrums von Abb. 3.20 wird ersichtlich, dass anstelle einer definierten scFv-Struktur bei einigen Klonen weitere Proteinspezies vorlagen. Die Identität dieser Proteine wurde nicht aufgeklärt. In einigen Proben wurden zusätzlich ebenfalls nicht zugeordnete Signale bei $m/z \sim 15800$ sowie ~ 11050 registriert. Klone mit derartiger Heterogenität wurden für weiterführende Studien nicht verwendet. Es bleibt festzuhalten, dass aus MALDI-TOF-MS-Spektren detailliertere Informationen im Vergleich zu den breiten Proteinbanden einer SDS-Gelelektrophorese erhalten werden konnten.

Das Expressionlevel der Klone erwies sich als niedrig. Die größte Menge scFv wurde bei Expressionsansätzen mit Klon **D26** ($\sim 800 \mu\text{g/L}_{\text{Medium}}$) erreicht. Es wurden keine Optimierungsschritte bezüglich der Temperatur, IPTG-Dosierung, Expressiondauer und Sucroseaufschluss unternommen. Die 3 L-Expressionsansätze wurden zudem in einfachen Glasgefäßen ohne Gewährleistung einer zufriedenstellenden Belüftung und Durchmischung kultiviert.

Durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz war es möglich, aufgrund der Anzahl an Tryosinen, Tryptophanen und Cysteinen den molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm mit statistisch ermittelten Extinktionskoeffizienten dieser Aminosäuren zu berechnen.^{178;179} Die auf diese Weise bestimmten Werte sind in Tab. 3.5 aufgeführt und wurden für die spektroskopische Bestimmung der Konzentration von scFv-Lösungen verwendet.

Tab. 3.5 Mit MALDI-TOF-MS bestimmte molare Massen (MW_{exp}), berechnete Massen MW_{calc} (average) und molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ_{280}).¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Klon	MW_{exp} [Da]	MW_{calc} [Da]	$\Delta MW/MW$	ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]	Expressionslevel [$\mu g/L$ Medium]
D26	28912	28925	$4 \cdot 10^{-4}$	45900	ca. 800
P2	27656	27756	$3 \cdot 10^{-3}$	44500	ca. 250
F62	27302	27608	$1 \cdot 10^{-2}$	40400	ca. 400
D2	28813	28558	$9 \cdot 10^{-3}$	41900	nb
F14	nb	27836	nb	38900	nb
L72	nb	28120	nb	51500	nb

nb: nicht bestimmt

Nachdem Vorliegen und Reinheit der scFv analysiert worden war, standen diese für Bindungsstudien Verfügung. Zunächst sollte gezeigt werden, dass die scFv auch in nicht-phagenassoziiierter Form ELISA Affinität aufweisen. Um die Bindung von scFv detektieren zu können, wurden diese in wässriger Lösung durch Zugabe von mit sulfo-NHS-aktivierter Biotinylnhexansäure an Aminofunktionen biotinyliert. Die Bindung dieser biotinylierten scFv an das V3-Glycopeptidkonjugat (BSA-*p1c*) wurde durch den Einsatz von an Peroxidase konjugiertem Streptavidin nachgewiesen (Abb. 3.21).

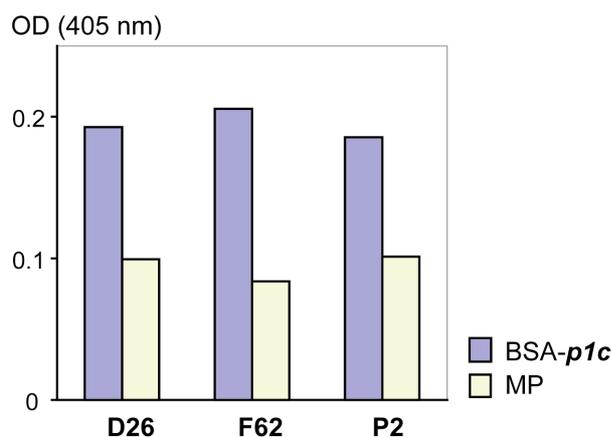


Abb. 3.21 ELISA mit biotinylierten scFv **D26**, **F62** und **P2**. Die scFv binden alle an das BSA-V3-Glycopeptidkonjugat (BSA-*p1c*). Als Negativkontrolle wurde Milchpulver (MP) verwendet.

Die durch ELISA ermittelten Reaktivitäten bezüglich des Konjugates BSA-**p1c** waren bei dieser Art der scFv-Detektion etwa doppelt so hoch wie die bezüglich der Milchpulverkontrollen. Der scFv von Klon **D26** wurde zudem auf die Differenzierung zwischen Peptid und Glycopeptid hin untersucht (Abb. 3.22). Auch das Ergebnis dieses ELISA legt die Vermutung nahe, dass die Chitobiosyleinheit keinen Anteil an der Affinität trägt.

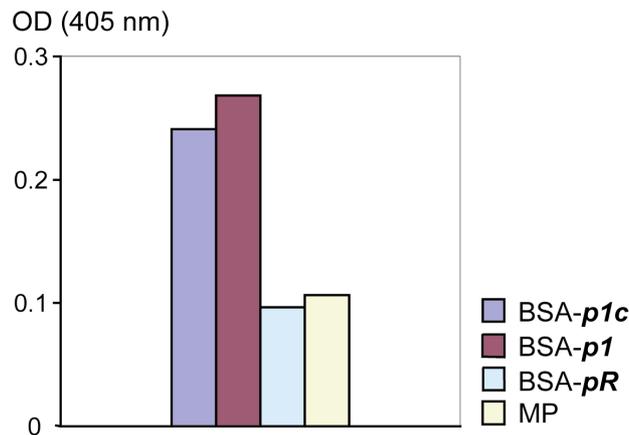


Abb. 3.22 ELISA mit biotinylierten scFv **D26**; Ein nahezu gleiches Bindungsverhalten wie das der scFv-präsentierenden Phagen (Abb. 3.7) ist zu erkennen. Das V3-Glycopeptid (**p1c**) wird im gleichen Ausmaß erkannt wie das V3-Peptid (**p1**). Als Negativkontrolle wurde BSA-Nonsenspeptidkonjugat (**BSA-pR**) und Milchpulver verwendet.

Zusammenfassend gelang die Expression, Aufreinigung und massenspektrometrische Identifikation von scFv sowie der Nachweis von Affinität von **D26**, **F62** und **P2** bezüglich des V3-Glycopeptids in gelöster und nicht-phagenassoziiertes Form.

3.5 SPR-Studien

Die auf Oberflächenplasmonenresonanz beruhende Analyse von Bindungsereignissen leistete im Rahmen dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der selektierten scFv. Durch SPR-Studien ist eine Interaktionsanalyse in einem fließendem System unter Echtzeitverfolgung möglich. Es besteht somit Zugang zu kinetischen Daten und thermodynamischen Bindungskonstanten, wodurch die bisher durch ELISA gewonnenen Erkenntnisse deutlich vertieft werden können. Grundsätzlich boten sich diverse Durchführungsvarianten an, deren Ergebnisse in den folgenden Absätzen präsentiert sind.

3.5.1 SPR-Interaktionsanalyse der scFv mit V3-Peptiden

Als naheliegendste Variante für eine SPR-Studie bot sich die kovalente Immobilisierung des V3-Glycopeptids *p1c* und der Interaktionsanalyse mit scFv-Lösungen an. Dabei gilt die in Abb. 3.23 schematisch dargestellte Aminkupplung als Standardmethode.

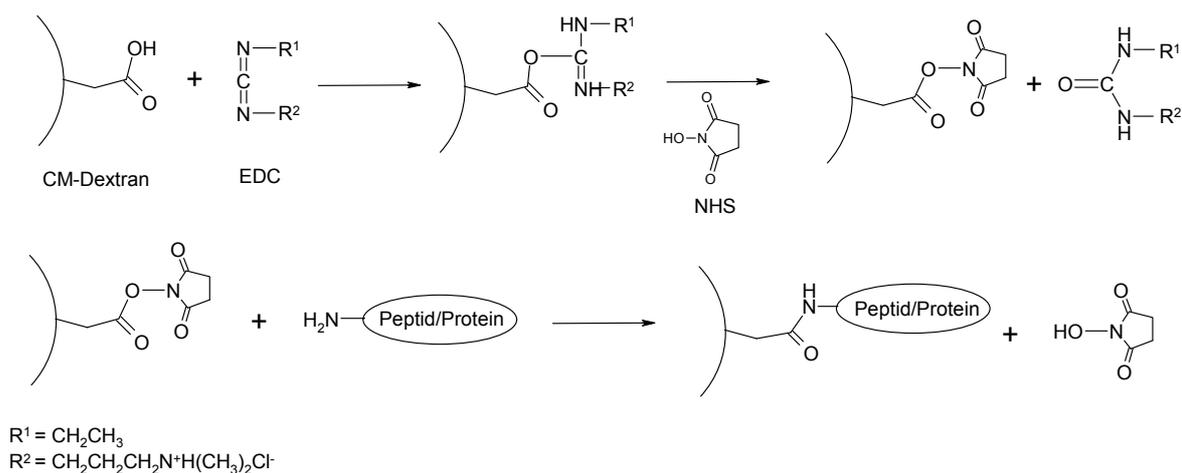


Abb. 3.23 Reaktionsmechanismus der Aminkupplung; CM: carboxymethylierte Dextranschicht. Nicht umgesetzte NHS-aktivierte Carboxylatgruppen werden im Anschluss mit Ethanolamin umgesetzt (capping).

Als reaktive Gruppen zur Immobilisierung von Peptiden dient die Aminofunktion des N-Terminus sowie die Aminogruppe der Seitenkette von Lysin. Innerhalb des V3-Sequenzausschnitts liegt ein solches Lysin (K305). Es ist daher nicht möglich, eine gerichtete Immobilisierung des V3-Peptids *p1c* über die Aminogruppe des N-terminus vorzunehmen. Dennoch wurde zunächst eben dieser Ansatz verfolgt. Auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips wurden an einem Biacore *J*-Instrument etwa 384 fmol (993 RU) des Peptids *p1c* immobilisiert und verschieden konzentrierte Lösungen (0 bis 7 μM) der scFv **D26** und **F14** in PBS hinübergeleitet. Die Referenzzelle wurde aktiviert und mit Ethanolamin geblockt. In Abb. 3.24 sind erhaltene Sensorgramme dieser Studien abgebildet.

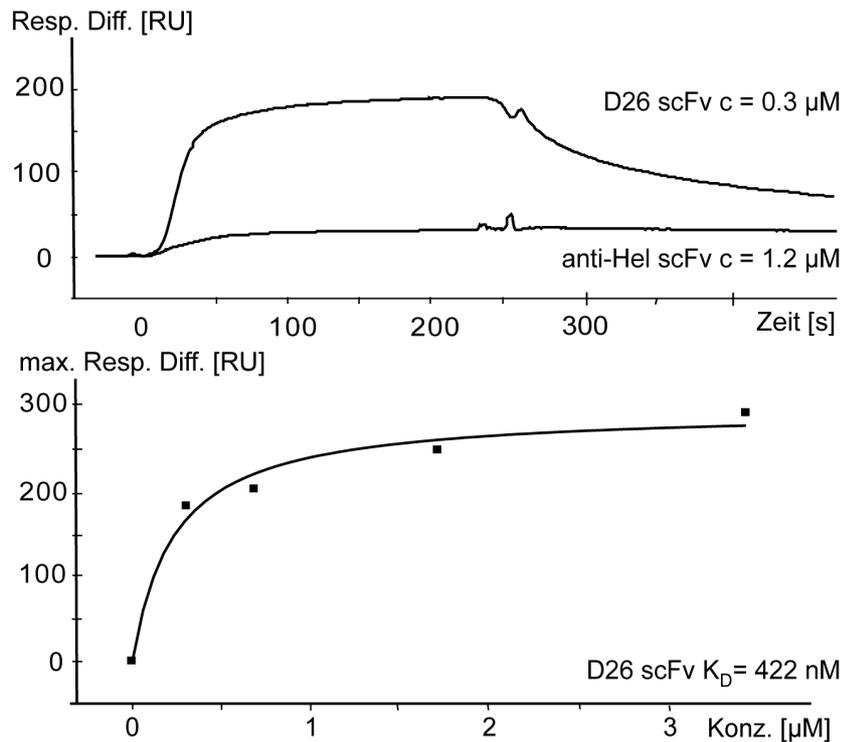


Abb. 3.24 oben: Sensorgramme von SPR-Messungen mit einer Lösung von scFv **D26** gegen über Aminogruppen immobilisiertes V3-Glycopeptid **p1c**. Die Referenzzelle wurde mit Ethanolamin geblockt. Das anti-Hühnereiweisslysozym scFv (anti-**Hel**) zeigt keine spezifische Interaktion mit dem V3-Glycopeptid. unten: Plot der Gleichgewichtswerte der jeweiligen **D26** scFv-Konzentrationen und mathematisch angepasste Affinitätskurve (Gleichung 1.2).

Zur Bestätigung der Spezifität der Interaktion wurde ein gegen Lysozym aus Hühnereiweis gerichteter scFv (anti-**Hel**) ebenfalls über die Oberfläche geleitet. Die scFv anti-**Hel** zeigten keine Interaktion mit dem V3-Glycopeptid, womit diese Negativkontrolle als Bestätigung der Spezifität von scFv **D26** anzusehen ist. Die Gleichgewichtswerte der Sensorgramme wurden gegen die Konzentration aufgetragen und die Anpassung an Gleichung 1.2 ergab die in Tab. 3.1 aufgeführten K_D -Werte.

Tab. 3.6 Ermittelte K_D -Werte der Klone **D26** und **F14** bezüglich des immobilisierten V3-Glycopeptids **p1c** (SVEINSTRPNN(Chi)NTRKSIHI).

Klon	K_D
scFv D26	422 ± 143 nM
scFv F14	1036 ± 115 nM

Die Konzentrationen der Proben wurden zu dem Zeitpunkt der vorliegenden SPR-Studien lediglich über die Intensität von SDS-PAGE-Banden abgeschätzt, wodurch ein relativ großer Fehler möglich ist. Des Weiteren war auf der mit Ethanolamin belegten Referenzzelle eine Signalintensität von 80% des Signales, das auf der V3-

Glycopeptidmesszelle erhalten wurde, zu registrieren. Dieser enorm hohe Signalanteil spricht für einen Hintergrund unspezifischer Interaktionen, welcher die eigentlichen Interaktion mit dem V3-Peptid überlagert. Kinetische Daten ließen sich nicht aus den Kurvenverläufen ableiten, da eine sehr geringe Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ gewählt wurde und bei Resp.Diff.-Werten von bis zu 300 RU mit Limitierungen des Massentransports gerechnet werden musste. Die Anzahl der Datenpunkte hätte besonders im unteren Konzentrationsbereich höher gewählt werden müssen.

Aufgrund der geschilderten Sachverhalte erschien es sinnvoll, weitere SPR-Studien unter veränderten Bedingungen vorzunehmen. Zur Immobilisierung wurde nun das Verfahren der Thiolkupplung gewählt. Dazu wurde zunächst ein V3-Glycopeptid mit einem N-terminalen Cystein synthetisiert (**p1c_{S291C}**). Da im Rahmen der Charakterisierung der scFv die Peptid-Glycopeptiddifferenzierung analysiert werden sollte, wurde zusätzlich auch das nicht glycosylierte V3-Peptid **p1_{S291C}** dargestellt (Abb. 3.25).

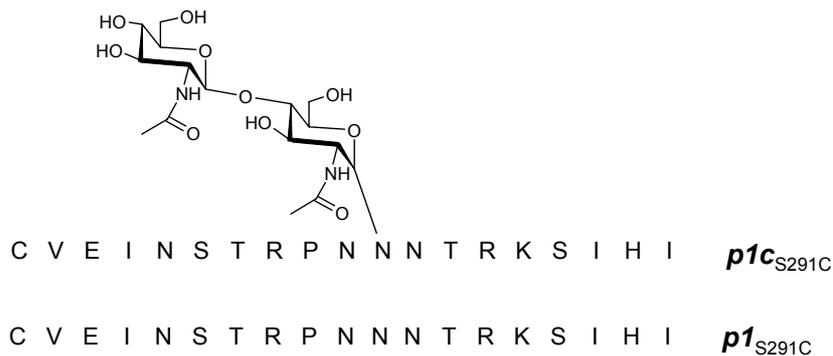


Abb. 3.25 Die V3-Peptide **p1c_{S291C}** und **p1_{S291C}**. N-terminales Serin wurde gegen Cystein substituiert, um über die Thiolgruppe eine gerichtete Immobilisierung auf der Sensorchipoberfläche vornehmen zu können.

Die Immobilisierung der Peptide konnte nun ortsgerichtet über die Thiolfunktion der Cysteine über den N-Terminus des Peptides vorgenommen werden. Dazu wurde auf eine CM5-Chipoberfläche zurückgegriffen, die an einem Biacore *T100* mit 2-(2-Pyridinyldithio)ethanaminhydrochlorid (PDEA) aktiviert wurde (Abb. 3.26). Dazu wurden die Carboxylgruppen zunächst wie in Abb. 3.23 beschrieben mit NHS/EDC aktiviert, bevor PDEA gelöst in Boratpuffer (pH 8.5) über die Sensorchipoberfläche geleitet wurde. Die Umsetzung mit den Peptiden erfolgte mit Acetatpuffer bei pH 4.0, so dass durch Bildung eines Pyridiniumsalzes, das von PDEA abgeleitete Disulfid zu einer guten Abgangsgruppe wurde.

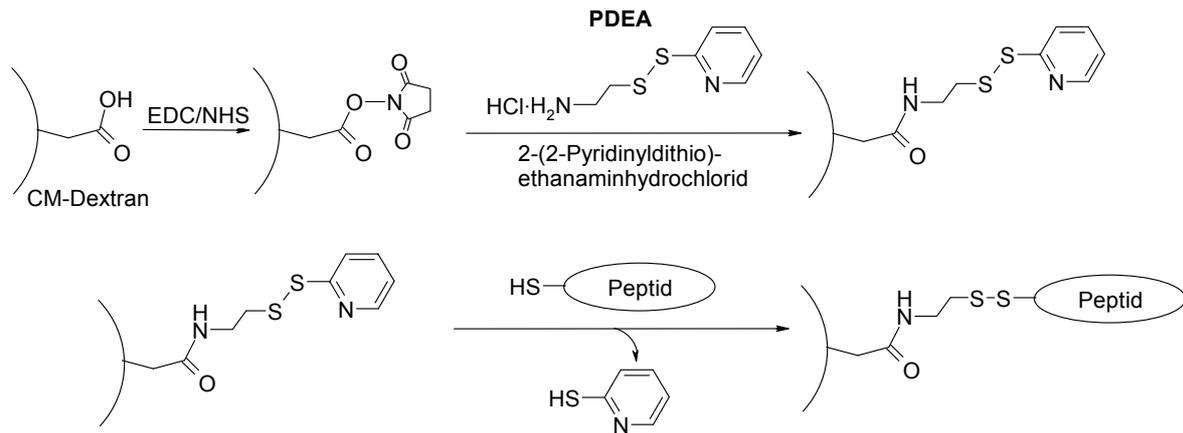


Abb. 3.26 Reaktionsschema der Thiolkupplung zur Immobilisierung der N-terminal mit Cystein versehenen Peptide pIc_{C291S} , pI_{C291S} und pR_{G1C} .

Es gelang, 1990 RU entsprechend 765 fmol des V3-Glycopeptids pIc_{S291C} und 4442 RU (2025 fmol) des V3-Peptids pI_{S291C} zu immobilisieren. Um die Spezifität der Bindung bei diesen Experimenten noch deutlicher zu demonstrieren, wurde das ebenfalls N-terminal mit Cystein versehene Nonsenspeptid pR_{G1C} (CIENDRTNGVTAKE) auf der Oberfläche der Referenzzelle immobilisiert (6400 RU, 4500 fmol). Als weitere Neuerung zur Verminderung der unspezifischen Interaktion mit der Referenzzelle wurde dem PBS-Laufpuffer 0.005% (v/v) des nicht-ionischen Detergenzes Tween20 zugesetzt. Dieses Pufferadditiv unterbindet ausgeprägte hydrophobe Interaktionen und hat dadurch solubilisierenden sowie stabilisierenden Einfluss auf Proteine. Alle Messungen wurden bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt, wodurch Massentransportlimitierungen vermieden werden sollten. In Abb. 3.27 sind die erhaltenen Sensorgramme einer Messung von **P2** scFv-Konzentrationen im Bereich von 40-100 nM gegen das immobilisierte V3-Glycopeptid pIc_{S291C} dargestellt.

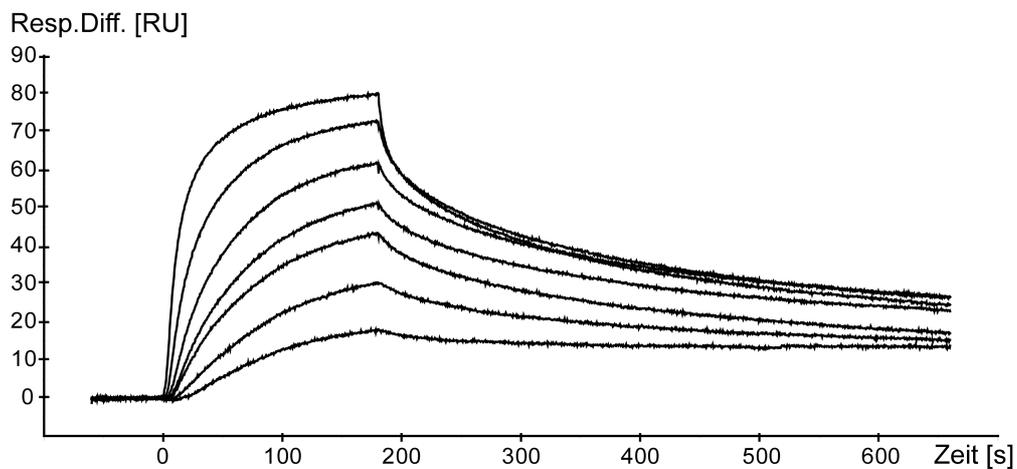


Abb. 3.27 SPR-Interaktionsanalyse von scFv **P2** mit dem immobilisierten V3-Glycopeptid pIc_{S291C} . Die Konzentrationen von scFv **P2** sind in absteigender Reihenfolge: 981, 654, 491, 327, 164, 82 und 41 nM. Auf der Referenzoberfläche wurde das Nonsenspeptid pR_{G1C} (CIENDRTNGVTAKE) immobilisiert.

Zur vollständigen Regeneration der Chipoberfläche erwiesen sich 2-10 s kurze Injektionen von 50 mM HCl-Lösung als geeignet. Die Evaluationssoftware (BIACORE EVALUATION SOFTWARE T100) ermöglicht es, Pufferinjektionen automatisiert von den Sensorgrammen zu subtrahieren, so dass störungsfreie Sensorgramme abgebildet werden können. Die Interaktion mit der Referenzzelle konnte auf etwa 35% bezogen auf die Interaktion mit dem V3-Glycopeptid deutlich gesenkt werden.

Aus der Glycopeptidbelegung von 4442 RU ergibt sich ein theoretischer Maximalwert bei unendlich hoher scFv-Konzentration von etwa 23000 RU. Aus der maximalen experimentell erhaltene Resp.Diff. von lediglich 100 RU ergibt sich eine enorm große Diskrepanz. Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang sicherlich der unbekannte und vermutlich sehr geringe Anteil an V3-Glycopeptiden innerhalb der CM5-Matrix, der für die scFv direkt zugänglich ist. Durch die Prozedur der mehrschrittigen Immobilisierung (NHS/EDC, PDEA und Cystein) ist unklar, ob 4442 RU Immobilisat tatsächlich ausschließlich auf das V3-Glycopeptid allein entfallen. Die Interaktionen, die in diesen Experimenten registriert wurden sind dennoch spezifischer Natur, da auf der Referenzzelle ein Nonsenspeptid vorliegt und die Differenz als Messsignal verfolgt wird (Resp.Diff.).

Die thermodynamische Dissoziationskonstante wurde ermittelt, indem die Resp.Diff.-Werte 5 s vor dem Ende der Probeninjektion gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen und der Verlauf der Datenpunkte der mathematischen Funktion gemäß Gleichung 1.2 angepasst wurde. Dieses wurde zunächst durch Einsatz der Evaluationssoftware vorgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte automatisiert, wobei es gelegentlich zu Problemen mit dem RU-Achsenabschnitt bei einer Konzentration von 0 nM kam ($RU\text{-offset} < 0$). Bei allen Messungen wurden daher die Pufferinjektionen auf ihre RU-Werte überprüft. Da sie alle im Rahmen des Messverfahrens einen Resp.Diff.-Wert von etwa 0 RU aufwiesen, wurde der Datenpunkt von Resp.Diff. = 0 bei einer Konzentration von 0 nM mit in den Datensatz aufgenommen ($RU\text{-offset} = 0$). Die Daten wurden dann mittels der Software ORIGIN 6.1 der Gleichung 1.2 angepasst. Das Ergebnis dieser Anpassung für scFv **P2** ist in Abb. 3.28 abgebildet und entspricht einer thermodynamischen Dissoziationskonstante von 133 ± 14 nM.

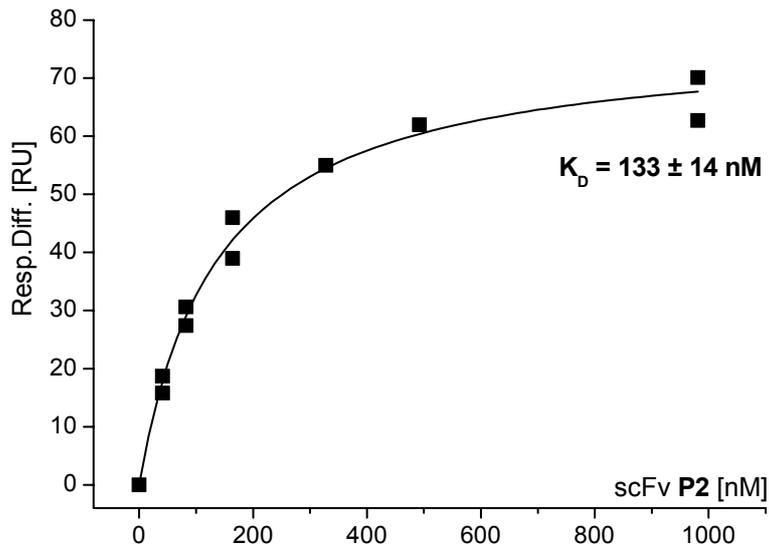


Abb. 3.28 SPR-Affinitätsanalyse von scFv **P2** bezüglich des über Cystein immobilisierten V3-Glycopeptids **pIc_{S291C}**. Aufgetragen sind die Werte 5 s vor beendeter Injektion. Abgebildet ist auch die an Gleichung 1.2 mathematisch angepasste Affinitätskurve.

Die aufgetragenen Datenpunkte in Abb. 3.28 beschreiben den Funktionsverlauf von Beginn bis zur Sättigung in zufriedenstellender Art und Weise. Der Konzentrationsbereich deckt gut den Bereich des Anstiegs der Datenpunkte ab und die Ausführung von Doppelbestimmungen erwies sich als wertvoll. Wie jedoch in Abb. 3.27 zu erkennen ist, wurden die Sensorgramme besonders bei geringen scFv-Konzentrationen nicht bis zum Erreichen des Gleichgewichtswertes der jeweiligen Konzentration aufgenommen. Die Werte von 5 s vor Beendigung der Injektion entsprechen somit nicht exakt den Anforderungen für eine Affinitätsbestimmung (*steady state affinity*) und führen zu einer zu hohen Dissoziationskonstante. Das Ausmaß der zu kurzen Injektionszeiten sollte dadurch abgeschätzt werden, dass die einzelnen Sensorgramme mit der Evaluationssoftware nach einem 1:1-Modell extrapoliert und die sich daraus ergebenden Gleichgewichtswerte nach unendlicher Injektionszeit (RU_{\max}) aufgetragen wurden. Es ergab sich ein K_D -Wert von 90 ± 12 nM, wobei die extrapolierten Kurven nur schlecht den Verlauf der Sensorgramme wiedergaben.

Aus einer Messreihe von scFv **P2** gegenüber dem immobilisierten V3-Peptid (**pI-S291C**) ergab sich ein K_D -Wert von 99 ± 27 nM. Verglichen mit dem Wert von 133 ± 14 nM gegenüber dem V3-Glycopeptid, kann also im Einklang mit ELISA-Studien keine deutliche Differenzierung zwischen Peptid und Glycopeptid festgestellt werden. Dieses bedeutet aber ebenso, dass kein negativer Einfluss der Chitobiosyleinheit auf die Bindung der scFv nachgewiesen wurde. Die selektierten scFv des Klons **P2** scheinen also eine Toleranz gegenüber der Chitobiosyleinheit an Position N301 aufzuweisen.

Klon **D26** wurde als weiterer aus den Selektionen hervorgegangener Klon auf die Affinität gegenüber dem V3-Glycopeptid und dem V3-Peptid untersucht. Die Auftragung der Resp.Diff.-Werte 5 s vor beendeter Injektion gegen die Konzentration ist in Abb. 3.29 abgebildet.

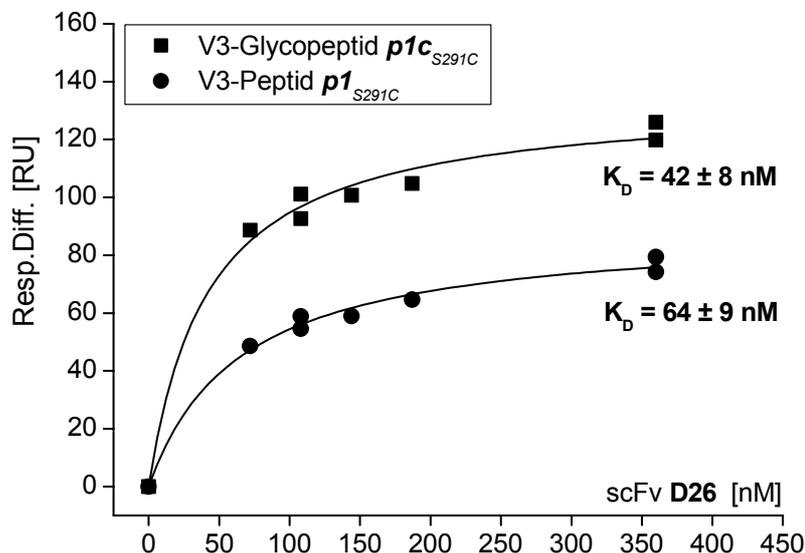


Abb. 3.29 SPR-Affinitätsanalyse von scFv **D26** bezüglich der über Cystein immobilisierten V3-Peptide. Der Kurvenverlauf entspricht der angepassten Funktion gemäß Gleichung 1.2.

Die scFv **D26** weisen höhere Affinität zu den V3-Peptiden als scFv **P2**. Dieses Verhalten ließ sich auch aus zahlreichen ELISA ableiten, bei denen **P2** stets geringere Signalintensitäten bezüglich der BSA-Peptidkonjugate zeigte. Gemäß den SPR-Experimenten scheint **D26** eine leicht höhere Affinität zu dem V3-Glycopeptid gegenüber dem Peptid aufzuweisen. In ELISA-Studien konnte dieser Sachverhalt nicht belegt werden, wobei zu bedenken ist, dass die BSA-Peptidkonjugate keinerlei Standardisierung unterzogen wurden.

Auch Klon **F62** sollte durch SPR-Studien näher auf seine Bindung an die V3-Peptide untersucht werden. Wie festgestellt wurde, weisen die scFv dieses Klons eine signifikant höhere Dissoziationskonstante auf (Abb. 3.30). Die Bestimmung der Werte ist durch die Wahl eines zu kleinen Konzentrationsbereiches mit einem großen Fehler behaftet, durch welchen eine Differenzierung zwischen Peptid- und Glycopeptiderkennung nicht möglich ist. In Tab. 3.7 sind die Ergebnisse der Auswertung aller SPR-Studien mit den V3-Peptiden *p1c*_{S291C} und *p1*_{S291C} und den Nonsenspeptid *pR*_{G1C} zusammengefasst. Die präsentierten Daten belegen eine spezifische Interaktion der selektierten und exprimierten scFv dreier ausgewählter Klone bezüglich der V3-Zielstruktur. Klon **F62** assoziiert deutlich schlechter mit den Peptiden und wurde daher in weitergehenden Studien nicht mehr berücksichtigt.

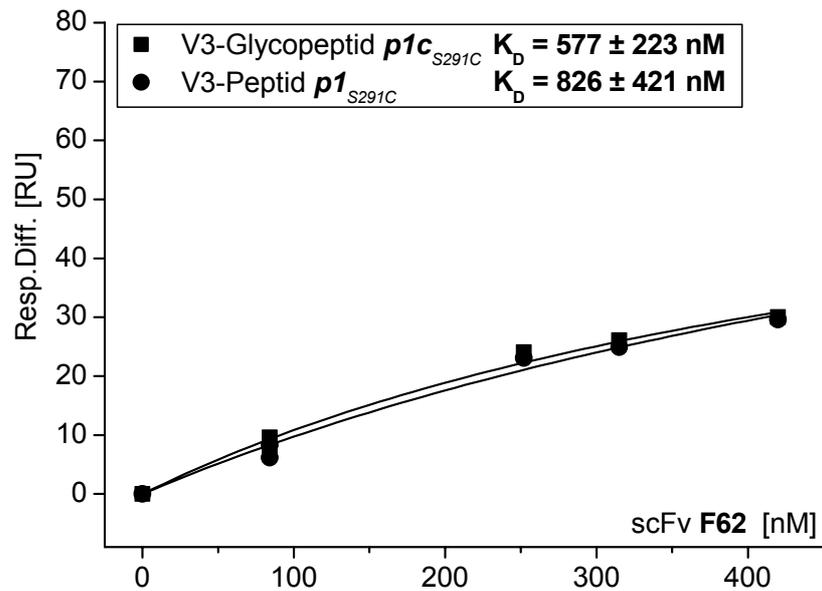


Abb. 3.30 SPR-Affinitätsanalyse von scFv **F62** bezüglich der über Cystein immobilisierten V3-Peptide. Eine deutlich geringere Affinität zu den Peptiden verglichen mit den Klonen **P2** und **D26** ist offensichtlich.

Tab. 3.7 Zusammenfassung der K_D -Werte aus den SPR-Studien mit durch Thiolkupplung immobilisierten V3-Peptiden.

	scFv P2	scFv D26	scFv F62
V3-Glycopeptid $p1c_{S192C}$	133 ± 14 nM	42 ± 8 nM	577 ± 223 nM
V3-Peptid $p1_{S291C}$	99 ± 27 nM	64 ± 9 nM	826 ± 422 nM

Ein deutlicher positiver Effekt der Chitobiosyleinheit auf die Affinität zu den scFv ist bei keinem der Klone vorzufinden, wobei Klon **D26** zumindest eine geringe Affinitätssteigerung aufweist. Bezogen auf alle Klone ist erneut zu betonen, dass keine nachteilige Wirkung auf die Interaktion vorliegt und somit von Toleranz gegenüber der Chitobiosyleinheit gesprochen werden kann.

Auch wenn ein experimenteller Beweis nicht erbracht wurde, ist davon auszugehen, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Klone nicht durch die Selektion mit linearen Peptiden ohne Glycosylierung erhalten worden wären. Die Klone **P2** und **D26** weisen thermodynamische Dissoziationskonstanten von 40 bis 130 nM auf und liegen damit im erwarteten Bereich für monovalente Antikörperkonstrukte einer naiven Bibliothek, wie es die eingesetzte *Griffin.1*-Bibliothek ist.¹⁷¹

3.5.2 Kinetik der Interaktion von scFv P2 mit dem V3-Glycopeptid p1c

Neben der Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante über die Affinität im Gleichgewichtszustand wurde versucht, durch die Bestimmung der *on*- und *off*-Raten ebenfalls den K_D -Wert zu ermitteln.

Ein generelles Problem bei der Beschreibung von Bindungskinetiken von scFv ist dabei die Neigung zur Multimerisierung. Durch Ausbildung von Dimeren und Trimeren vermindern scFv die Exposition hydrophober Oberflächen gegenüber dem Phosphatpuffer. In Studien wurde in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit von der Länge des Glycin/Serin-Linkers nachgewiesen.^{180;181} Obgleich die Länge des Linkers von 14 Aminosäuren für die scFv der *Griffin.1*-Bibliothek eine Dimerisierung ausschließen sollte, ist zumindest eine partielle Dimerisierung nicht unwahrscheinlich.

Zur Untersuchung dieses Verhaltens wurde der Kurvenverlauf eines Sensorgramms von scFv P2 ($c = 164 \text{ nM}$) mit der Evaluationssoftware sowohl an ein 1:1-Modell als auch an ein bivalentes Bindungsmodell angepasst ($[\text{scFv}_2] = 2 \cdot [\text{scFv}]$). Das Ergebnis der Anpassungen mit Illustration der Abweichungen ist in Abb. 3.31 zu sehen. Es ist deutlich, dass weder rein monovalentes noch rein bivalentes Bindungsverhalten vorliegt, die scFv also partiell dimerisiert vorzuliegen scheinen, wie es auch in Literatur für andere scFv beschrieben ist.¹⁸² Der Abbildung ist jedoch auch zu entnehmen, dass sich die Interaktion besser durch das bivalente Bindungsmodell beschreiben lässt.

Das bivalente Bindungsmodell berücksichtigt die Bildung eines Komplexes aus einer dimeren scFv-Einheit und zwei V3-Peptiden ($\text{AB} + \text{B} = \text{AB}_2$), wodurch die entsprechende Assoziationsrate k_{a2} nur in $\text{RU}^{-1}\text{s}^{-1}$ anstelle von $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ angegeben werden kann. Ein direkter Vergleich der ermittelten Werte beider Bindungsmodelle ist dadurch nicht möglich (Tab. 3.8). Für relative Vergleiche können jedoch k_{a1} und der niedrigste der beiden k_d -Werte (k_{d1} , k_{d2}) für die Berechnung eines ungefähren K_D -wertes (K_D^*) berücksichtigt werden. Die ermittelten thermodynamischen Dissoziationskonstanten sprechen dafür, dass die Affinität zu dem V3-Glycopeptid tatsächlich um den Faktor 5 bis 10 stärker ist als in Kapitel 3.5.1 bestimmt ($K_D = 133 \text{ nM}$). Dort wurden Endwerte einer Konzentrationsreihe zur Ermittlung des K_D -wertes herangezogen, die kleiner als die Gleichgewichtswerte der jeweiligen Konzentration waren.

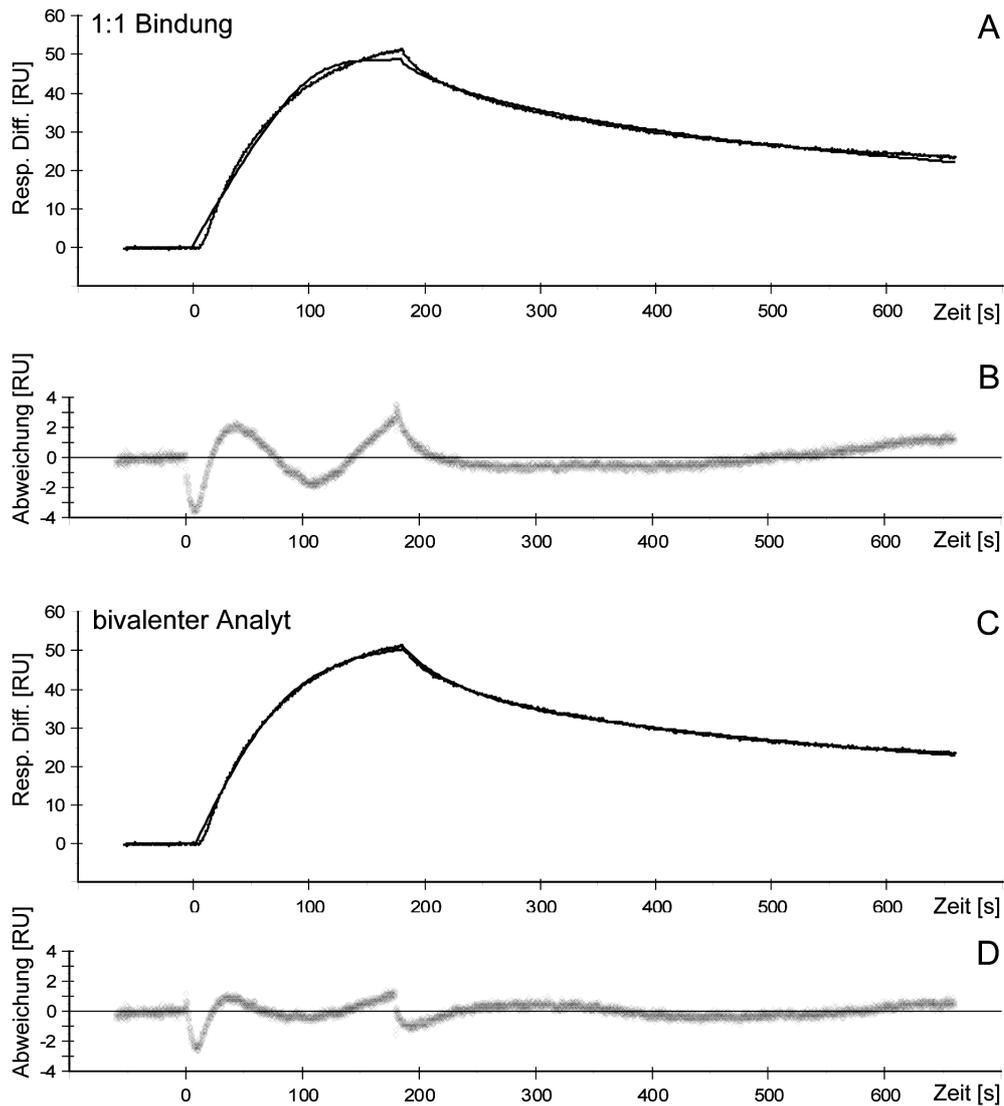


Abb. 3.31 Analyse der Kinetik der Interaktion von scFv **P2** (164 nM) mit dem V3-Glycopeptid. A: Sensorgramm und Anpassung an ein 1:1-Bindungsmodell; B: Abweichungen von der angepassten Funktion; C: Sensorgramm und Anpassung an ein bivalentes Bindungsmodell; D: Abweichungen von der angepassten Funktion. Das Bindungsverhalten wird besser durch die Annahme des Vorliegens von scFv-Dimeren beschrieben.

Tab. 3.8 Vergleichende Analyse der Kinetik der Interaktion von scFv **P2** mit dem immobilisiertem V3-Glycopeptid **p1c**_{S291C}. Die formale Konzentration an monomeren scFv war 164 nM.

	$k_a [M^{-1}s^{-1}]$	$k_d [s^{-1}]$	-	-	χ^2	K_D
1:1-Modell	$6.5 \cdot 10^5$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	-	-	0.907	11 nM
	$k_{a1} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{d1} [s^{-1}]$	$k_{a2} [RU^{-1}s^{-1}]$	$k_{d2} [s^{-1}]$	χ^2	K_D^*
bivalentes Modell	$8.9 \cdot 10^4$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$	$7.3 \cdot 10^{-4}$	0.253	8 nM

Auf eine Größenausschlusschromatographie zur Analyse des Monomer/Dimer-Verhältnisses musste aufgrund der dafür benötigten Stoffmenge verzichtet werden. Durch Einsatz von MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte das Vorliegen von scFv-Dimeren erwartungsgemäß nicht belegt werden. In Kapitel 3.5.4 werden SPR-Studien mit einem definierten Konstrukt bivalenter Natur (scFv-IgE Δ C1) beschrieben, so dass zumindest dort eine genaue kinetische Analyse möglich ist. Kinetikstudien mit scFv des Klons **D26** führten zu sehr vergleichbaren Assoziations- und Dissoziationsraten, wie die vorliegenden Studien mit scFv **P2**.

Da in der Literatur auch für bivalente Antikörper oft ein 1:1-Bindungsmodell zugrundegelegt wird, lässt sich festhalten, dass die Assoziationsrate von scFv **P2** gegenüber immobilisiertem V3-Glycopeptid *plc* $6.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und die Dissoziationsrate $7.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ist, woraus sich eine thermodynamische Dissoziationskonstante von 11 nM ergibt.

3.5.3 SPR-Interaktionsanalyse der scFv D26 mit einem V3-IgY Δ C1-Konstrukt

Das in Abb. 3.17 schematisch dargestellte V3-Konstrukt (V3-IgY Δ C1) konnte bereits erfolgreich für den Bindungsnachweis in einer ELISA-Studie verwendet werden. Im Rahmen von SPR-Experimenten wurde dieses Fusionsprotein auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert (~ 99 fmol), wobei BSA als Referenzprotein gewählt wurde. Zur Überprüfung der Zugänglichkeit des V3-Konstrukts auf der Chipoberfläche wurde auch in diesem Falle der V3-Antikörper **447-52D** eingesetzt. Dieser zeigte eine deutliche Interaktion mit dem V3-Konstrukt. Wie in Abb. 3.32 exemplarisch für eine scFv-Konzentration von 244 nM gezeigt, konnten auch mit scFv des Klons **D26** positive Sensorgrammverläufe erhalten werden.

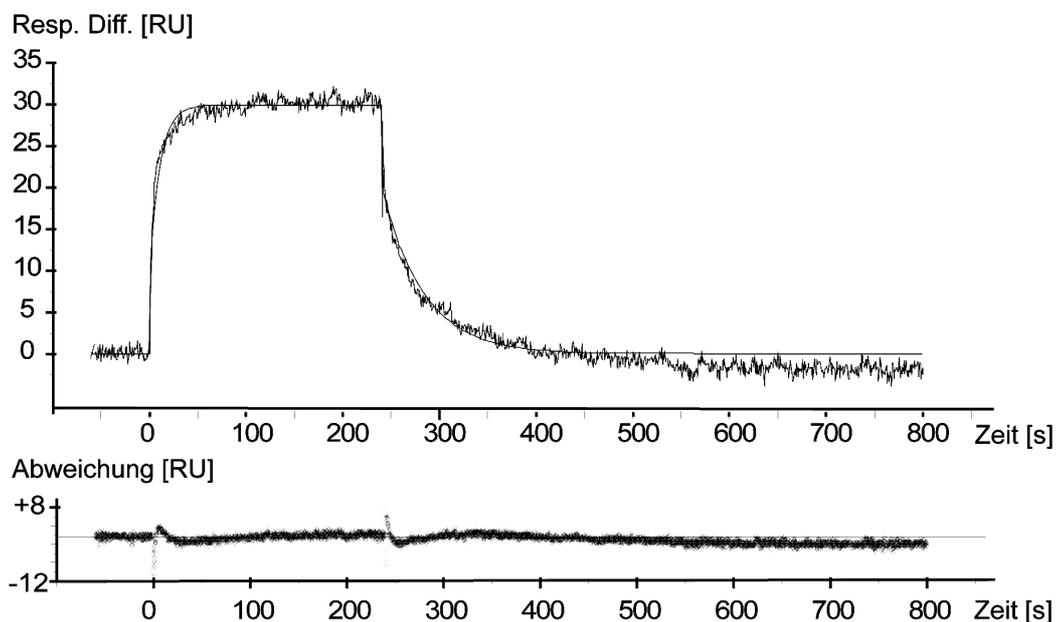


Abb. 3.32 Sensorgramm einer Messung von scFv **D26** (244 nM) gegen immobilisiertes V3-IgY-Konstrukt und die nach einem 1:1-Bindungsmodell angepasste Funktion (oben); Auf der Referenzzelle wurde BSA immobilisiert; unten: Abweichung des Sensorgramms von der mathematischen Anpassung. Die Anpassung ergab eine Assoziationsrate (k_a) von $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und eine Dissoziationsrate (k_d) von $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, entsprechend einem K_D -Wert von 80 nM.

Die Analyse der Kinetik führte zu einem K_D -Wert von 80 nM (1:1-Bindungsmodell), wobei die Anpassung auch in diesem Falle nicht optimal den Verlauf des Sensorgrams wiedergibt. Die Auftragung der Gleichgewichtswerte gegen die jeweiligen Konzentrationen (Abb. 3.33) führte zu einem Datenpunktverlauf, der durch einen K_D -Wert von 148 ± 75 nM beschrieben werden konnte.

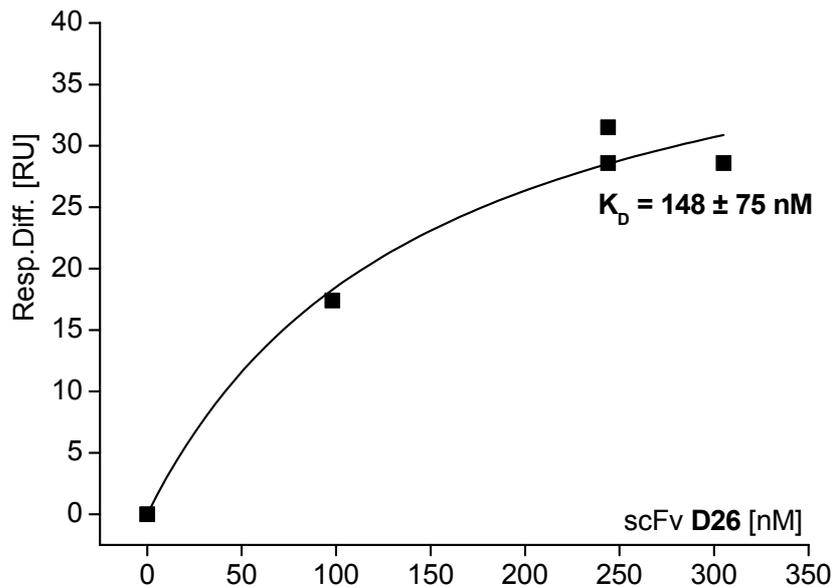


Abb. 3.33 Auftragung der Gleichgewichtswerte von SPR-Messungen mit **D26** scFv gegen immobilisiertes V3-Konstrukt mit angepassten Kurven nach Gleichung 1.2.

Im Zusammenhang mit dieser Untersuchung ist zu betonen, dass die Identität des V3-Konstrukts lediglich durch SDS-Gelelektrophorese belegt wurde. Obgleich die Anzahl der Datenpunkte in Abb. 3.33 ungenügend ist, konnte jedoch sowohl mittels ELISA als auch durch die vorliegende SPR-Studie eindeutig eine Interaktion zwischen scFv **D26** und diesem V3-Konstrukt dokumentiert werden.

3.5.4 SPR-Interaktionsanalyse von scFv und gp120-Isolaten

Im Abschnitt 3.2 des Ergebnis- und Diskussionsteiles dieser Arbeit konnte bereits demonstriert werden, dass die selektierten Klone in der Lage sind, gp120 in ELISA-Studien zu binden und dass es gelang, aus einem Pool bereits selektierter Klone, eine Anreicherung von gp120-affinen Klonen zu erzielen. Ein Klon, der aus der Selektion in Lösung nach Strategie I gegen das V3-Glycopeptid *plc* hervorging, ist **D26**. Der Klon **P2** ging aus den zusätzlichen Selektionsrunden gegen gp120 hervor. Diese beiden sollten nun in SPR-Studien auf ihre Affinität zu gp120-Isolaten näher untersucht werden.

Die Aminosäuresequenz von gp120 ist subtyp- und isolatspezifisch. Das bedeutet, dass innerhalb eines mit einem bestimmten Subtyp infizierten Wirtes aufgrund der Mutationsrate des HI-Virus eine Vielzahl an Viren mit unterschiedlichen gp120-Sequenzen aufzufinden sind. Für die SPR-Studien wurden drei in einer Vielzahl von HIV-Studien ebenfalls eingesetzte Isolate verwendet (SF162, Bal und IIIB).²⁹ Die Analyse einiger publizierter Sequenzen der *HIV Sequence Database*¹⁸³ ergab Sequenzen, die auch im Einklang mit Arbeiten von Korber *et. al.*⁴⁵ waren:

Tab. 3.9 Ermittelte häufigste Sequenzen der HIV-Isolate SF162, Bal und IIB im Vergleich mit der Konsensussequenz aller Subtyp B Isolate (conB). Hervorgehoben sind die Aminosäurepositionen, die von der conB-Sequenz abweichen.

Isolat	Tropismus	V3-Sequenzausschnitte
conB	-	CTRPNNNTRKSIHI—GPGRAF
SF162	R5	CTRPNNNTRKSI T I—GPGRAF
Bal	R5	CTRPNNNTRKSIHI—GPGR A L CTRPNNNTRKSIHI—GPGR A F
IIB	X4	CTRPNNNTRK R I R I Q RGPGRAF CTRPNNNTRK S I R I Q RGPGRAF

Das Isolat SF162 weist anstelle des H308 ein Threonin auf. Die Konsensussequenz des Bal-Isolates entspricht bis auf eine F315L oder F315I Substitution der Subtyp B Konsensussequenz. IIB enthält neben der H308R-Mutation eine seltene QR-Insertion vor dem GPGRAF-Motiv und ist zudem X4-trop. Durch Verwendung dieser drei unterschiedlichen Isolate für Bindungsstudien sollte in ersten Ansätzen das sequenzabhängige Neutralisierungspotential untersucht werden. Die Immobilisierung von gp120 auf einer CM5-Oberfläche erfolgte durch Aminkupplung an einem Biacore *T100* Instrument. Um auf der Oberfläche der Referenzzelle anstelle von Ethanolamin eine aussagekräftige Negativkontrolle zu haben, wurde BSA immobilisiert (Tab. 3.10).

Tab. 3.10 Immobilisierung von BSA und gp120-Isolaten durch Aminkupplung auf einer CM5-Chipoberfläche.

Substanz	Resp.Diff.	immob. Stoffmenge
BSA	7900 RU	120 fmol
gp120-SF162	9800 RU	82 fmol
gp120-Bal	7300 RU	61 fmol
gp120-IIB	9800 RU	82 fmol

Im Folgenden wurden Verdünnungen von scFv der Klone **D26** und **P2** bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ in PBS (0.005% Tween20) über die Flusszellen geleitet. Es wurden für beide Klone positive Kurvenverläufe erhalten, die sich auch in diesem Falle an kein rein mono- oder bivalentes Bindungsverhalten anpassen ließen (Abb. 3.34). Im Vergleich zu den Messungen mit über Thiofunktionen immobilisierten Peptiden (Kapitel 3.5.1) wurden bei Messungen mit immobilisiertem gp120-Isolaten ein plausibler Diskrepanzfaktor zwischen theoretischer Maximalantwort und experimenteller Maximalantwort von 20 bis 40 erhalten

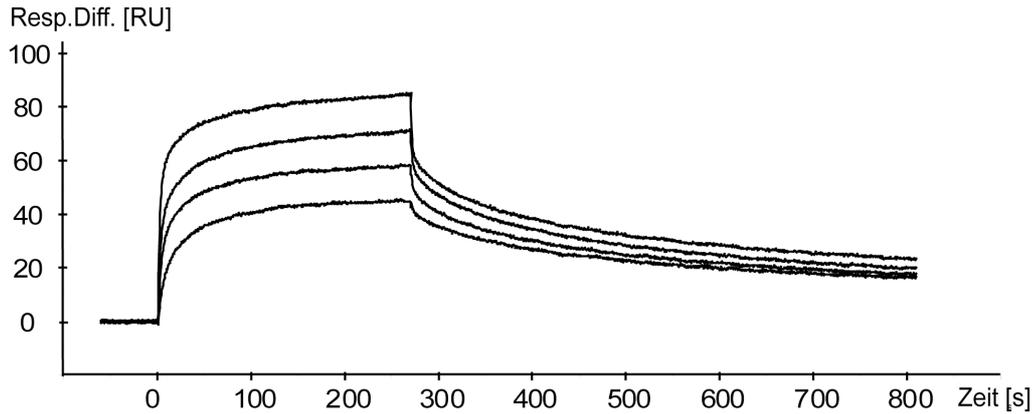


Abb. 3.34 Sensorgramme der Vermessung von scFv des Klons **D26** gegenüber immobilisiertem gp120-BaL in Konzentrationen von 600, 400, 200 und 100 nM. Auf der Referenzzelle wurde BSA immobilisiert.

In Abb. 3.35 sind die Ergebnisse der Auswertung der Gleichgewichtswerte dieser Sensorgramme gezeigt. Die Datenpunkte entsprechen in zufriedenstellender Weise den Kurvenverlauf der angepassten Funktion gemäß Gleichung 1.2, wobei die Vermessung von Konzentrationen unter 100 nM sicher sinnvoll gewesen wäre. Es ergeben sich thermodynamische Dissoziationskonstanten von etwa 100 nM, wobei keine eindeutige Isolat-Differenzierung vorliegt. Die Signalintensität bezüglich IIIB ist trotz sehr ähnlicher immobilisierter Stoffmenge wie SF162 deutlich höher. Dieses lässt einen Rückschluss auf die Unreinheit oder den Alterungszustand der SF162-Charge zu. Möglich ist auch, dass SF162 anders orientiert als IIIB und BaL auf der Oberfläche vorliegt, woraus eine schlechtere Zugänglichkeit der V3-Region resultiert.

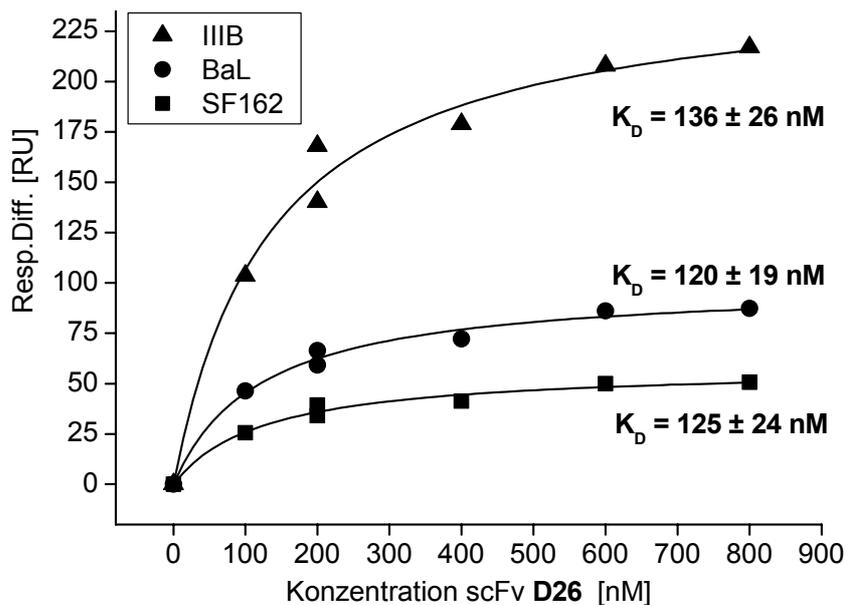


Abb. 3.35 SPR-Affinitätsanalyse von scFv **D26** bezüglich der gp120-Isolate IIIB, BaL und SF162. Auf der Oberfläche der Referenzzelle wurde BSA immobilisiert. Abgebildet sind auch die an Gleichung 1.2 angepassten Kurvenverläufe.

Auch mit scFv **P2** wurden Messreihen aufgenommen und ausgewertet. Wie in Abb. 3.36 zu sehen ist, wurden hier deutlich geringere Resp.Diff.-Werte erhalten, obgleich in vorhergehenden manuellen Injektionen bei gleicher Konzentration ähnlich hohe RU-Werte, wie bei Messungen mit scFv **D26** erhalten wurden.

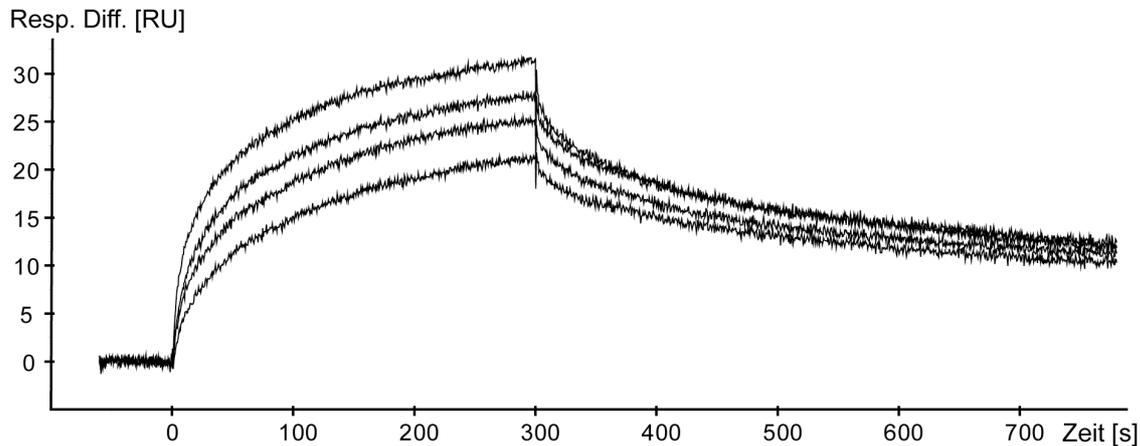


Abb. 3.36 Sensorgramme von Messungen mit **P2** scFv-Konzentrationen (335, 193, 129 und 103 nM) gegen immobilisiertes gp120-Bal.

Dieses beruht darauf, dass der Sensorchip zwischen den beiden Konzentrationsreihen der Klone aus dem Gerät entfernt werden musste. Vor dem Wiedereinführen des Sensorchips muss dieser mit destilliertem Wasser gespült und anschließend im Luftstrom vollständig getrocknet werden. Vermutlich ging bei diesem Schritt mehr als zwei Drittel der Aktivität von gp120 verloren. Ein zweiter Austausch des Sensorchips hinterließ keinerlei aktives gp120 auf der Oberfläche. Im Gegensatz dazu konnten die mit V3-Peptid belegten Chipoberflächen trotz mehrfachen Wechsels ohne nennenswerten Aktivitätsverlust mehrfach für Messungen verwendet werden.

Die Auswertung der Sensorgramme bezüglich der Affinität von scFv **P2** zu den gp120-Isolaten ist in Abb. 3.37 zu sehen. Die erhaltenen Werte entsprechen Dissoziationskonstanten zwischen 40 und 130 nM, wobei auch scFv **P2** das gp120-IIIB Isolat mit der S306R- und H308R-Substitution sowie der QR-Insertion geringfügig schlechter bindet. Weitere Datenpunkte im Konzentrationsbereich unter 100 nM hätten zu einer exakteren Affinitätsbestimmung geführt. Dennoch bestätigt sich das Ergebnis der ELISA-Studien, dass der aus den gp120-Selektionen entstammende Klon **P2** höhere Affinität zu gp120 zeigt, als der lediglich mit dem V3-Glycopeptid selektierte Klon **D26**.

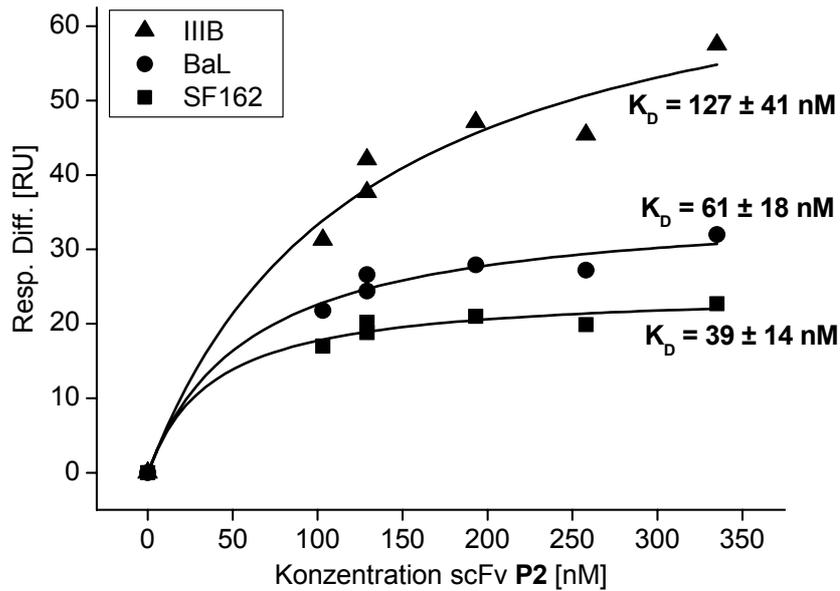


Abb. 3.37 SPR-Affinitätsanalyse von scFv **P2** bezüglich der gp120-Isolate III B, BaL und SF162. Die Interaktion zwischen scFv **P2** und gp120-III B ist signifikant schwächer im Vergleich zu den anderen gp120-Isolaten.

Die Spezifität der Interaktion wurde bislang durch BSA als Referenzprotein belegt. Ein weiterer Versuch wurde unternommen, indem auch der anti-Hühnereiweiß scFv anti-**Hel** vermessen wurde. Wie in Abb. 3.38 zu sehen ist, wurde auch bei hoher scFv-Konzentration keine Bindung an die gp120-Isolate beobachtet.

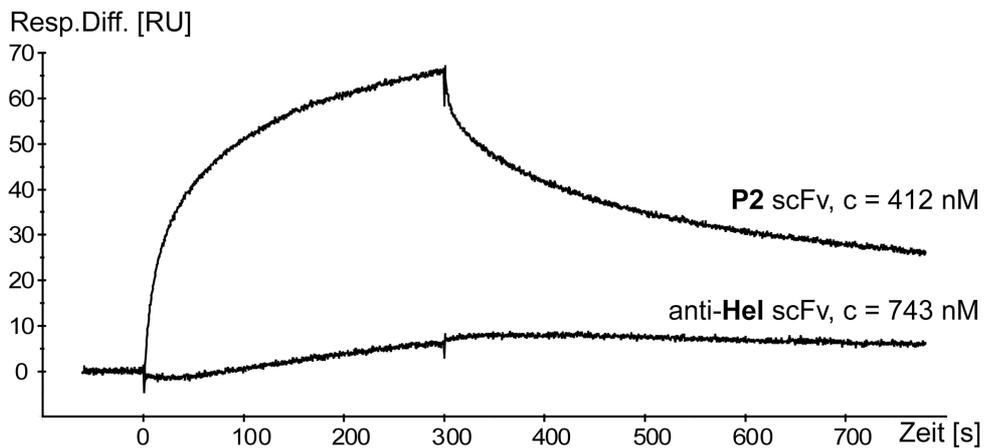


Abb. 3.38 SPR-Interaktionsanalyse von scFv **P2** und scFv anti-**Hel** bezüglich gp120-III B. Auch bei deutlich höherer Konzentration tritt keine Interaktion von anti-**Hel** mit gp120 auf. Auf der Oberfläche der Referenzzelle wurde BSA immobilisiert. Die Spezifität der Interaktion der selektierten anti-V3 scFv konnte belegt werden.

Mit Abschluss dieses Experimentes konnte bestätigt werden, dass die scFv **D26** und **P2** spezifisch mit verschiedenen gp120-Isolaten interagieren (Tab. 3.11). Die thermodynamischen Dissoziationskonstanten, welche durch Aufnahme von Konzentrations-reihen

bestimmt wurden, liegen im Bereich von 40 bis 140 nM (Tab. 3.11). Bemerkenswert ist, dass die Klone **D26** und **P2** einer Selektionsstrategie mit V3-Peptiden in Lösung entstammen und ein solches Verhalten daher nicht vorrausgesetzt werden konnte.

Tab. 3.11 Zusammengefasste K_D -Werte der SPR-Studien mit immobilisierten gp120-Isolaten.

	<i>scFv P2</i>	<i>scFv D26</i>
gp120-SF162	39 ± 14 nM	125 ± 24 nM
gp120-Bal	61 ± 18 nM	120 ± 19 nM
gp120-IIIB	127 ± 41 nM	136 ± 26 nM

3.5.5 Kinetik der Interaktion von scFv P2 und D26 mit gp120-Isolaten

Die Analyse der Kinetik der Interaktion von scFv P2 und D26 mit gp120-Isolaten, war wie auch schon bei SPR-Studien, mit den V3-Peptiden weder nach einem monovalenten noch nach einem bivalenten Bindungsmodell exakt möglich. Die folgende Tabelle fasst die Daten der Kinetikanalyse zusammen (Tab. 3.12). Auch in diesem Falle, wiesen die durch Kinetik bestimmten thermodynamischen Dissoziationskonstanten niedrigere Werte auf, als die durch Gleichgewichtswerte bestimmten K_D -Werte.

Tab. 3.12 Durch SPR-Studien ermittelte kinetische Daten der Interaktion von scFv **P2** (oben) und von scFv **D26** (unten) mit den gp120-Isolaten SF162, Bal und IIIB. Aufgeführt sind die Werte aus der K_D -Bestimmung über die Gleichgewichtswerte (aff) sowie die Werte der Kinetikanalyse eines einzigen Sensorgrams (scFv_{mono} **P2**: 52 nM; scFv_{mono} **D26**: 100 nM) nach dem entsprechenden Kinetikmodell. Die mit (*) gekennzeichneten K_D -Werte (K_D^*) ergeben sich aus ka_1 und der jeweils niedrigsten Dissoziationsrate (kd_1 oder kd_2).

P2		$ka_1 [M^{-1}s^{-1}]$	$kd_1 [s^{-1}]$	$ka_2 [RU^{-1}s^{-1}]$	$kd_2 [s^{-1}]$	χ^2	$K_D [nM]$
SF162	aff	-	-	-	-	-	39 ± 14
	1:1	$2.0 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	-	-	0.190	4.8
	biv	$1.3 \cdot 10^5$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$4.1 \cdot 10^{-4}$	$5.7 \cdot 10^{-4}$	0.077	4.4^*
Bal	aff	-	-	-	-	-	61 ± 18
	1:1	$2.8 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	-	-	0.362	5.3
	biv	$1.0 \cdot 10^5$	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$	$6.3 \cdot 10^{-4}$	0.112	6.3^*
IIIB	aff	-	-	-	-	-	127 ± 41
	1:1	$4.3 \cdot 10^5$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	-	-	0.853	5.8
	biv	$8.4 \cdot 10^4$	$1.4 \cdot 10^{-2}$	$8.8 \cdot 10^{-5}$	$6.8 \cdot 10^{-4}$	0.152	8.1^*

D26		$ka_1 [M^{-1}s^{-1}]$	$kd_1 [s^{-1}]$	$ka_2 [RU^{-1}s^{-1}]$	$kd_2 [s^{-1}]$	χ^2	$K_D [nM]$
SF162	aff	-	-	-	-	-	125 ± 24
	1:1	$5.8 \cdot 10^5$	$2.4 \cdot 10^{-3}$	-	-	0.639	4.1
	biv	$3.5 \cdot 10^5$	$6.2 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$3.0 \cdot 10^{-2}$	0.206	17.7^*
Bal	aff	-	-	-	-	-	120 ± 19
	1:1	$3.7 \cdot 10^5$	$1.9 \cdot 10^{-2}$	-	-	1.870	5.3
	biv	$2.6 \cdot 10^5$	$5.6 \cdot 10^{-3}$	$5.5 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$	0.587	21.5^*
IIIB	aff	-	-	-	-	-	136 ± 26
	1:1	$4.3 \cdot 10^5$	$3.2 \cdot 10^{-3}$	-	-	9.910	7.4
	biv	$1.4 \cdot 10^5$	$2.9 \cdot 10^{-2}$	$5.7 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	1.500	7.9^*

Für scFv **D26** wurden bezüglich SF162 und Bal mit bivalentem Bindungsmodell auffällig hohe kd_2 -Werte registriert, die zu einer starken Abweichung der K_D -Werte von denen des 1:1-Bindungsmodelles führen. Für alle anderen Messungen (auch **P2**) entsprechen sich die nach 1:1- oder bivalenten Bindungsmodell ermittelten K_D -Werte.

Für den als am potentesten eingestuften anti-V3 mAb IgG3 **447-52D** sind von vanCott *et. al.* ebenfalls SPR-Studien mit immobilisiertem gp120 (IIIB und MN) durchgeführt worden.

Die dort nach einem 1:1-Modell ausgewerteten Kinetiken ergaben Wertepaare von $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (MN) und $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (IIIB), so dass scFv **D26** und **P2** im Bereich der Dissoziationsraten bivalenten Antikörpern unterlegen sind. Der durch die Analyse der Kinetik bestimmte K_D -Wert von **447-52D** ist etwa 1 nM bezüglich MN und 7 nM bezüglich IIIB. SPR-Experimente zur Affinität im Gleichgewichtszustand wurden mit **447-52D** nicht durchgeführt.¹²⁷

Im Zusammenhang mit anderen Antikörpern, wies ein monovalentes scFv-Konstrukt in SPR-Studien einen achtfach höheren K_D -Wert im Gegensatz zu dem entsprechenden IgG auf.¹⁸⁴ Eine weitere Studie lässt auf eine mehr als zwanzigfach stärkere Affinität beim Übergang von scFv- in IgG-Formate schliessen.¹⁸² Für die scFv **P2** und **D26** kann daher im Vergleich zu IgG3 **447-52D** unter Berücksichtigung der großen Unterschiede in der Immunglobulinstruktur, von einer ähnlich starken Affinität gesprochen werden.

3.5.6 SPR-Interaktionsanalyse mit einem D26 scFv-IgE Δ C1-Konstrukt

Für die Durchführung weiterer SPR-Studien stand ein scFv-IgE Δ C1-Konstrukt des Klons **D26** zur Verfügung, welches analog zu dem in Abb. 3.17 schematisch dargestelltem V3-IgY Δ C1-Konstrukt aufgebaut ist.¹⁷⁴ Dieses bivalente Konstrukt (scFv**D26**-IgE Δ C1) wurde aus Überständen von HEK293-Zellen isoliert, durch Immunoblot identifiziert und die Konzentration mittels SDS-PAGE durch Vergleich mit einer BSA-Konzentrationsreihe auf etwa 20 nM bestimmt. Es wurden nun SPR-Studien mit immobilisiertem V3-Glycopeptid (**pIc**) und gp120 durchgeführt. Die jeweilige Referenzierung erfolgte mit dem Nonsenseptid (**pR**) und BSA. Um zunächst den Zustand der dafür wiederverwendeten Sensorchips zu überprüfen, wurde zugleich auch scFv **D26** in einer Konzentration von 144 nM vermessen. Es konnten für beide Antigene Sensorgramme erhalten werden, die vergleichbar mit früheren Studien waren. Für scFv**D26**-IgE Δ C1 konnte gegenüber beiden Antigenen eindeutig Affinität nachgewiesen werden (Abb. 3.1).

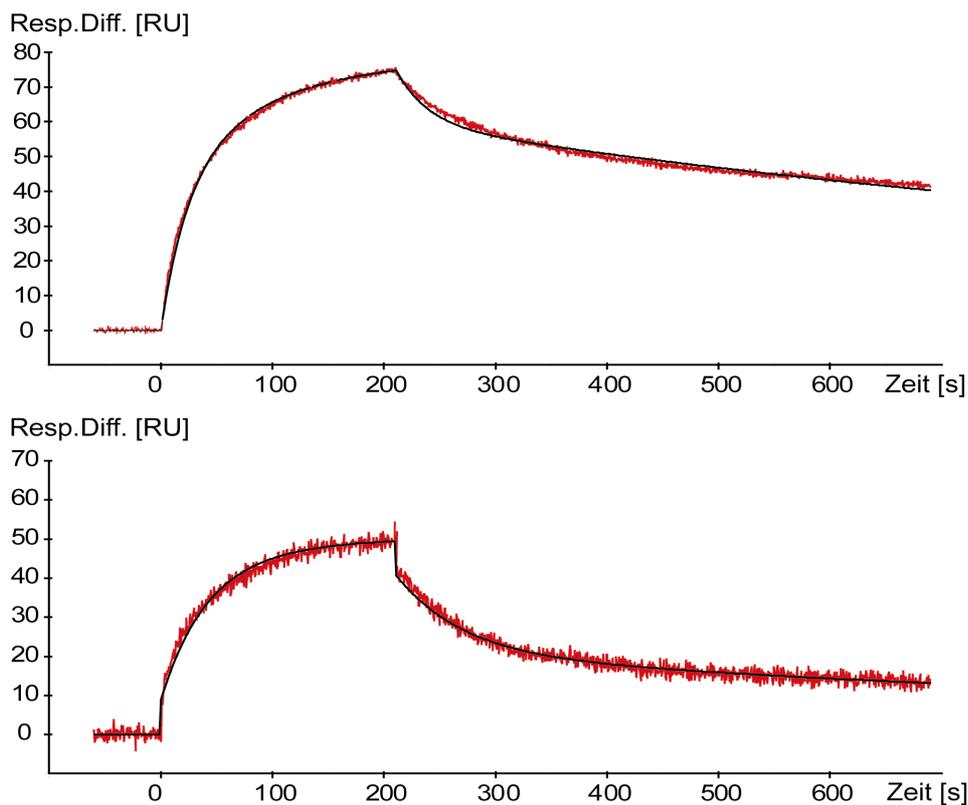


Abb. 3.39 SPR-Interaktionsanalyse mit dem scFv-IgE Δ C1-Konstrukt einer Konzentration von etwa 20 nM. oben: Sensorgram gegenüber dem immobilisiertem V3-Glycopeptid **pIc**. unten: Das Sensorgramm gegenüber immobilisiertem gp120-IIIb ist stark verrauscht und weist Sprünge bei 0 und 210 s auf. Ebenfalls abgebildet sind die Kurvenverläufe der mathematischen Anpassungen einem bivalenten Bindungsmodell.

Bei Betrachtung der in Tab. 3.13 zusammengefassten Auswertung der Kinetikdaten fällt ein besonders deutlicher Unterschied bezüglich der Interaktion mit gp120-Bal auf. Eine sehr hohe Assoziationsrate (ka_1) erhöht die Affinität des Konstruktes scFvD26-IgEΔC1 im Vergleich zu scFv D26.

Tab. 3.13 Zusammenfassung der nach einem bivalenten Bindungsmodell ausgewerteten kinetischen Daten von der SPR-Interaktionsanalyse mit scFv D26 und dem Konstrukt scFvD26-IgEΔC1 gegenüber dem V3-Glycopeptid p1c (oben) und gp120-IIIB (unten).

V3-Glycopeptid	$ka_1 [M^{-1}s^{-1}]$	$kd_1 [s^{-1}]$	$ka_2 [RU^{-1}s^{-1}]$	$kd_2 [s^{-1}]$	χ^2	K_D^*
scFv (144 nM)	$2.9 \cdot 10^5$	$6.0 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$4.3 \cdot 10^{-4}$	1.02	1.5 nM
IgEΔC1 (~20 nM)	$3.1 \cdot 10^5$	$2.7 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$5.7 \cdot 10^{-4}$	1.04	1.8 nM
gp120-Bal	ka_1	kd_1	ka_2	kd_2	χ^2	K_D^*
scFv (144 nM)	$1.3 \cdot 10^5$	$4.3 \cdot 10^{-2}$	$3.6 \cdot 10^{-5}$	$8.7 \cdot 10^{-4}$	1.52	6.7 nM
IgEΔC1 (~20 nM)	$2.6 \cdot 10^6$	$1.4 \cdot 10^{-2}$	$6.5 \cdot 10^{-5}$	$6.4 \cdot 10^{-4}$	1.84	0.3 nM

Die bezüglich gp120 erhaltenen Sensorgramme haben jedoch eine sehr breite Basislinie und weisen Sprünge an Anfang und Ende der Injektion auf. Bezüglich des V3-Glycopeptides liegt bei Betrachtung der K_D^* -Werte eine leicht erhöhte Avidität des IgE-Konstruktes gegenüber den scFv vor. Abschließende Aussagen über den Effekt der Transformation in ein bivalentes Format können durch die vorliegenden Daten nicht gemacht werden. Aufgrund nicht ausreichender Stoffmenge konnte keine Konzentrationsreihe zur Ermittlung des K_D -Wertes aus den Gleichgewichtswerten aufgenommen werden.

3.5.7 SPR-Interaktionsanalysen zur Ermittlung der Epitope

Nachdem mit SPR-Studien bereits eine spezifische Bindung von **D26** scFv und **P2** scFv an das V3-Glycopeptid **p1c** sowie an gp120-Isolate belegt werden konnte, sollte nun die SPR-Methode für eine Epitopanalyse genutzt werden.

Hierzu sollte die V3-Peptidsequenz formal in kleine Segmente zerlegt werden, um herauszufinden welcher dieser Peptidabschnitte mit den scFv interagiert. Die Immobilisierung der scFv erwies sich wie unter 3.5.8 näher ausgeführt als nicht praktikabel, weshalb kurze V3-Peptide auf der Oberfläche eines CM5-Chips immobilisiert werden sollten. Da die Immobilisierung von kurzen Peptiden einer Länge von etwa fünf Aminosäuren jedoch problematisch in Bezug auf die strukturelle Verfügbarkeit im immobilisiertem Zustand ist, wurden folgende Peptide synthetisiert:

Tab. 3.14 Für SPR-basiertes Epitop Mapping dargestellte Peptide; grau unterlegt Asn(Chi).

Peptid	Peptidsequenz	Resp.Diff.	immob. Stoffmenge
p9	KGGGGGGSVEINST	383 RU	291 fmol
p10	KGGGGGTRPNNTR	515 RU	288 fmol
p12	KGGGGGTRKSIHI	723 RU	546 fmol
p9	KGGGGGGSVEINST	383 RU	291 fmol

Diese Peptide besitzen N-terminal ein Lysin, welches zur ortsgerichteten Immobilisierung mittels Aminkupplung beitragen soll. Damit ein ausreichender Abstand der V3-Peptide von der Dextranmatix gewährleistet ist, wurde eine Polyglycinkette eingefügt. Die V3-Sequenz wird bei diesem Ansatz zunächst in drei Segmente mit geringer Überlappung zerlegt, wodurch einerseits entscheidende Epitopabschnitte zertrennt wurden, dafür aber andererseits der Syntheseaufwand für diese Studien gering gehalten wurde.

In den am Biacore *J* durchgeführten Studien konnten zwar positive Sensorgramme bezüglich der Peptide erhalten werden, dieses jedoch bezüglich aller drei Peptide im gleichem Ausmaß. Der Verlauf der Kurven war zudem durch ein vollständiges Abfallen der Resp.Diff.-Werte unmittelbar mit dem Beginn der Dissoziationsphase geprägt. Die Affinitätsanalyse über die Gleichgewichtswerte ergab die in Tab. 3.15 zusammengetragenen Ergebnisse.

Tab. 3.15 Ermittelte K_D -Werte von **D26** scFv bezüglich der immobilisierten Peptide. Auf der Oberfläche der Referenzzelle wurde mit Ethanolamin immobilisiert. grau unterlegt: Asn(Chi).

Peptid	Peptidsequenz	K_D
p9	KGGGGGGSVEINST	1.2 ± 0.5 μM
p10	KGGGGGTRPNNTR	1.0 ± 0.4 μM
p12	KGGGGGTRKSIHI	2.6 ± 0.7 μM

Die ermittelten thermodynamischen Dissoziationskonstanten liegen im niedrigen μM -Bereich. Da alle drei Peptide vergleichbare Affinitäten aufweisen, kann aus diesen SPR-Studien entweder das Vorliegen eines diskontinuierlichen Epitopes oder eine Wechselwirkung der scFv mit dem Polyglycinlinker angenommen werden. In Bezug auf die Ergebnisse der Selektionsstrategie IV, ist die Richtigkeit der zweiten Annahme naheliegender. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass epitopbildende Segmente durch die getroffene Auswahl zerlegt wurden.

Mit der Annahme, dass die Interaktion mit den V3-Peptidsequenzen von unspezifischen Wechselwirkungen mit der Polyglycinkette überdeckt wird, ergab sich die Notwendigkeit diesen Effekt durch eine mit Polyglycin bedeckte Referenzzelle zu relativieren. Dazu wurde das Peptid **pG** mit der Sequenz KG_6 synthetisiert und die in Tab. 3.16 aufgeführten Stoffmengen auf der Oberfläche eines CM5-Chips immobilisiert (Biacore *T100*).

Tab. 3.16 Peptide für SPR-basiertes Epitope Mapping; grau unterlegt Asn(Chi).

Peptid	Peptidsequenz	Resp.Diff.	immob. Stoffmenge
pG	KGGGGGG	371 RU	760 fmol
p9	KGGGGGGSVEINST	364 RU	299 fmol
p10	KGGGGGTRPNNNTR	595 RU	332 fmol
p12	KGGGGGTRKSIHI	871 RU	658 fmol

Die Vermessung von scFv-Konzentrationen mit PBS (0.005% Tween20) als Laufpuffer bei einer Flussrate von $30 \mu\text{L}/\text{min}$ führte zu negativen Sensorgrammen, so dass die Wechselwirkung mit der Referenzzelle (KG_6) stärker ist als mit den vermeintlich epitoptragenden V3-Peptidausschnitten. Die Werte 5 s vor Ende der Injektion wurden gegen die scFv-Konzentrationen von Klon **P2** aufgetragen und der Plot einer Affinitätskurve angepasst (Abb. 3.40). Die sich ergebenden K_D -Werte waren $2 \pm 1 \mu\text{M}$ (**p9**), $10 \pm 37 \mu\text{M}$ (**p12**) sowie ein linearer Verlauf (**p10**). Wie auch bei Selektionsvariante IV und bei vorhergehenden SPR-Studien stellte sich der Einsatz eines Polyglycinlinker als problematisch heraus. Konstante Subdomänen der scFv scheinen mit der Polyglycinkette zu assoziieren.

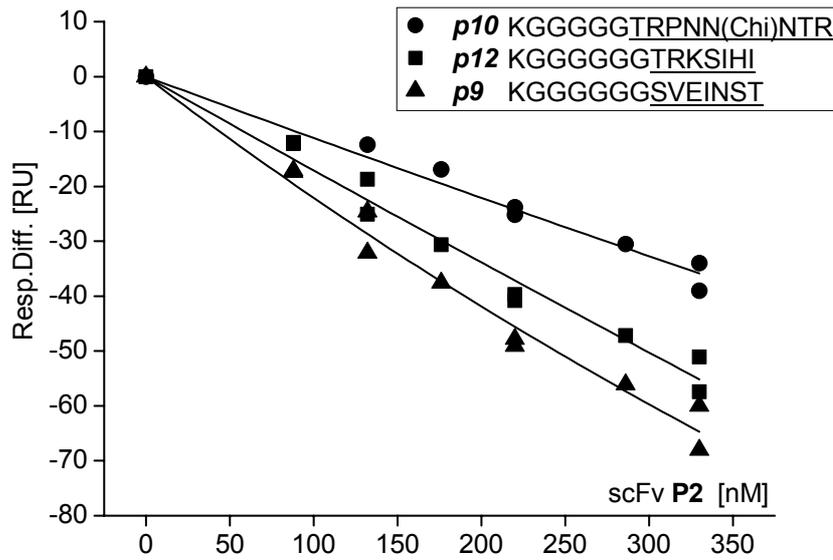


Abb. 3.40 Auftragung der minimalen Resp.Diff.-Werte gegen die scFv-Konzentration von **P2**. Ein negativer und nahezu linearer Verlauf über den Konzentrationsbereich liegt bezüglich aller drei Peptide vor.

Für einen alternativen Versuch, das Epitop einzugrenzen, wurden die in Abb. 3.41 aufgeführten V3-Peptide für Konkurrenzexperimente dargestellt. Diese verkürzten V3-Peptide sollten zusammen mit den scFv über die Flusszelle mit dem immobilisiertem V3-Glycoepitid (**p1c**_{S192C}) geleitet werden.

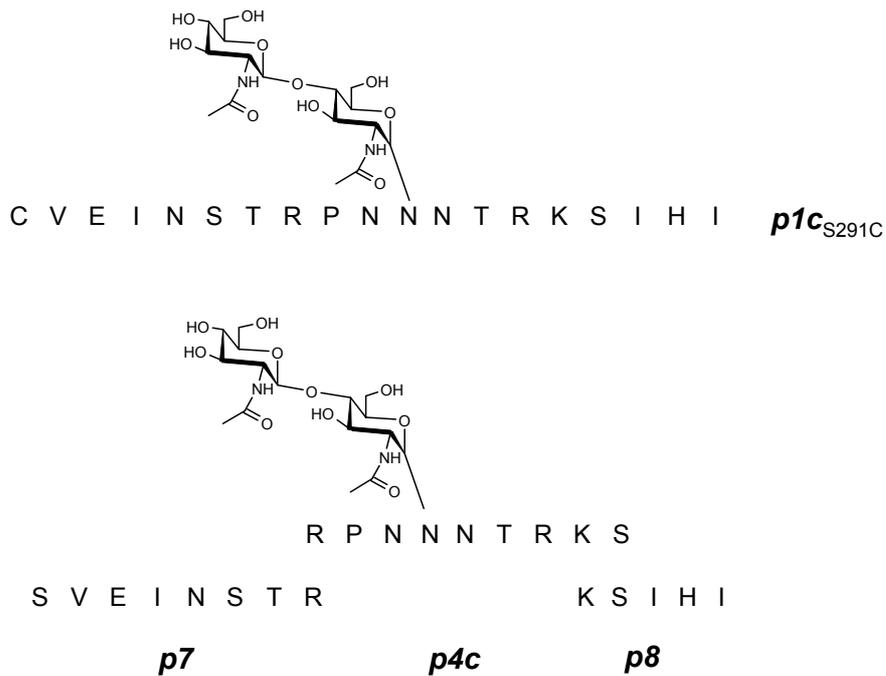


Abb. 3.41 Für SPR-Konkurrenzexperimente dargestellte Peptide.

Die Bindung der kurzen Peptide an die scFv in Lösung sollte die Affinität an das Volllängenpeptid auf der Sensorchipoberfläche einschränken. Im Rahmen einer Biacore T100-Methode (*affinity in solution*) erfolgte die Messung der drei Peptide in zwei verschiedenen inhibitorischen Konzentrationen ($\sim 0.1 \mu\text{M}$ und $\sim 1.25 \mu\text{M}$) mit jeweils konstanter **P2** scFv-Konzentration ($c = 32 \text{ nM}$). Durch die Aufnahme einer Konzentrationreihe mit verschiedenen scFv-Konzentrationen (0 bis 62 nM) konnte zu einem Resp.Diff.-Wert der Inhibitionsexperimente stets eine Konzentration an noch frei vorliegenden scFv berechnet werden. Aus einer mathematischen Anpassung der Daten konnte jeweils eine Dissoziationskonstante der kurzen V3-Peptide mit den scFv **P2** unter kompetitiven Bedingungen zum immobilisiertem V3-Volllängenpeptid **p1c**_{S291C} ermittelt werden (Abb. 3.42).

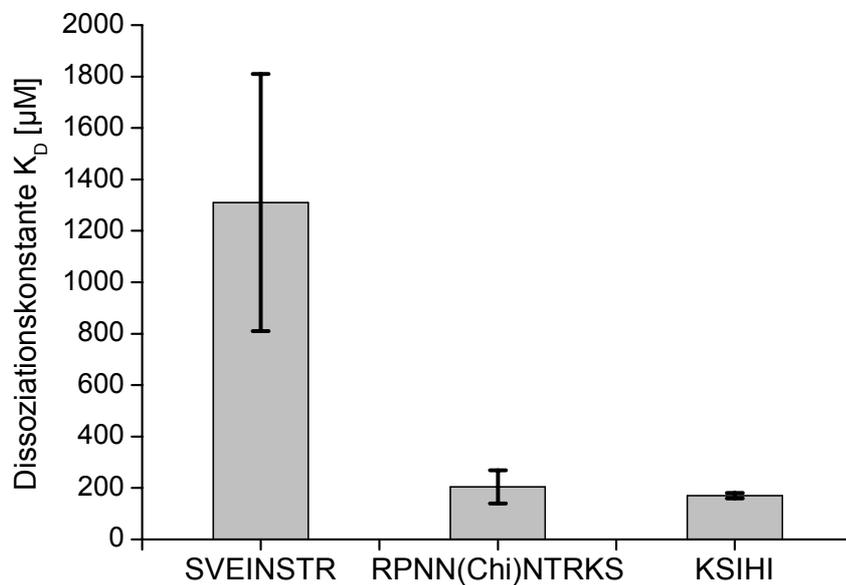


Abb. 3.42 Thermodynamische Dissoziationskonstanten der gelösten Peptide **p7**, **p4c** und **p8** bezüglich des scFv **P2** bei kompetitorischer Anwesenheit von immobilisiertem V3-Glycopeptid **p1c**. Das Peptid SVEINSTR hat deutlich weniger inhibitorisches Potential und enthält keine zum Epitop beitragende Gruppen.

Trotz des hohen Fehlers für den Wert der Messungen mit **p7** sowie einer geringen Anzahl an Datenpunkten kann anhand dieser Ergebnisse formuliert werden, dass der N-terminale Peptidausschnitt SVEINSTR (**p7**) keinen Beitrag zum Epitop von Klon **P2** leistet ($K_D = 1.3 \text{ mM}$). Es steht somit fest, dass für scFv **P2** das Epitop auf dem Abschnitt ²⁹⁸RPNN(Chi)NTRKSIHI³⁰⁹ lokalisiert ist. Die Dissoziationskonstanten für die beiden Fragmente **p4c** und **p8** sind $204 \mu\text{M}$ und $170 \mu\text{M}$. Diese geringen Affinitäten lassen vermuten, dass die gewählten Peptidabschnitte das Epitop vermutlich nur in konjugierter Form vollständig wiedergeben.

3.5.8 Versuche zu weiteren SPR-Experimenten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den oben geschilderten Studien, weitere Versuche unternommen, die Wechselwirkung der scFv mit V3-Peptiden und gp120-Isolaten durch SPR-Experimente zu charakterisieren.

Von grundlegendem Interesse erschien es, scFv auf der Oberfläche eines Sensorchips zu immobilisieren. Affinitäten bezüglich der Peptide und gp120-Isolate können dann mit den Daten von gelösten scFv verglichen werden. Die Immobilisierung von scFv über freie Aminofunktionen ist in der Literatur beschrieben.¹⁸⁵ Auch im Rahmen dieser Arbeit gelang es, scFv über Aminkupplung zu immobilisieren (~3000 RU, ~100 fmol). Es konnten jedoch keine Sensorgramme mit dem V3-Glycopeptid *p1c* erhalten werden, die auf eine spezifische Interaktion mit den scFv (**D26**) hindeuteten. Zur Diskussion stehen im wesentlichen drei mögliche Ursachen. Aus der His₆-Aufreinigung der scFv könnten noch Reste von Imidazol bei der Aminkupplung gestört haben, da auf eine doppelte Dialyse in PBS nach der Aufreinigung verzichtet wurde. Die zweite Ursache könnte auf die in Tab. 3.4 angegebenen Sequenzen der scFv zurückzuführen sein. Die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) beinhalten viele Lysine als potentielle Kupplungspartner an die Oberfläche. Bei Immobilisierung kann es daher sein, dass die Antigenbindungsstelle degeneriert vorliegt. Als dritter Punkt ist die Sensitivität des für diese Studien benutzten Biacore *J* Instruments zu berücksichtigen. Das V3-Peptid ist, verglichen mit Proteinen, ein niedermolekularer Ligand. Daher kann die Belegung der Sensorchipoberfläche mit scFv verbunden mit einer eventuell niedrigen prozentualen Bindungsaktivität der scFv zu Bindungsereignissen mit Resp.Diff.-Werten im Bereich der Basislinienbreite führen. Der Ansatz, ortsgerecht über die His₆-Sequenz auf der Oberfläche eines NTA-Sensorchips zu immobilisieren, gelang nicht, wobei keine weitergehenden Optimierungsschritte unternommen wurden.

Eine quantitativ zufriedenstellende Immobilisierung von BSA-Peptidkonjugaten konnte nicht erreicht werden. Dieses hängt damit zusammen, dass frei zugängliche Aminogruppen von BSA bereits im Vorfeld zur Konjugation mit den Peptiden genutzt wurden.

Die scFv-präsentierenden Phagen konnten ebenfalls nicht erfolgreich immobilisiert werden und eigneten sich auch nicht in gelöster Form für eine Interaktionsanalyse mit immobilisiertem gp120-Isolaten, obgleich auch SPR-Selektionssysteme mit Phagen beschrieben sind.^{186;187} Eventuell wirkten sich noch vorhandene Reste des zur Isolierung der Phagen verwendeten Polyethylenglycols in diesem Fall negativ auf das Experiment aus.

3.6 STD NMR Experimente

Die Verwendung der STD NMR Spektroskopie zur Interaktionsanalyse der scFv mit V3-Glycopeptiden bietet neben ELISA- und SPR-Studien eine weitere Möglichkeit, die Interaktion zu charakterisieren. Darüber hinaus befinden sich bei STD NMR Untersuchungen beide Wechselwirkungspartner in Lösung, womit eine dem natürlichen System nahe Situation gegeben ist. Neben der thermodynamischen Dissoziationskonstanten besteht der Zugang zur einer detaillierten Epitopbeschreibung auf atomarer Ebene.

3.6.1 STD NMR mit scFv-präsentierenden Phagen

Die Effizienz der für ein STD NMR Experiment notwendigen Sättigung des Rezeptorproteins korreliert, neben strukturellen Eigenschaften, Einstrahlfrequenz, Pulsleistung und dem Sättigungsintervall im Wesentlichen mit dem Molekulargewicht des Rezeptorproteins. Je deutlicher das Spindiffusionslimit überschritten ist und je ausgeprägter die 3D-Struktur des Proteins, umso effizienter ist die Sättigung, woraus letztlich die Sensitivität des STD-Experiments erhöht wird. Daher erscheint es *per se* attraktiver, scFv-präsentierende Phagen anstelle von den lediglich 29 kD großen scFv als Rezeptoren für ein STD-Experiment einzusetzen. Ferner sind scFv-präsentierende Phagen schon während des Selektionsprozesses sehr leicht präparativ zugänglich. Gelänge es, mit scFv-präsentierenden Phagen über STD NMR ein Epitop auf atomarer Ebene zu formulieren, so könnte der Verlauf einer Selektion schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt detailliert und mit geringem experimentellen Aufwand bewertet werden. Bei einer Anreicherung auf 10^{14} Phagen/mL ist mit nur etwa 0.1 nmol Rezeptor in einer Probe von 600 μ L zu rechnen. Ein zur Verfügung stehendes 700 MHz-Spektrometer mit Cryo-Probenkopf sollte für die Aufnahme von STD-Spektren mit derart geringen Rezeptorkonzentrationen jedoch ausreichen. Ein solcher Ansatz ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht in der Literatur beschrieben.

Den vorangegangenen Überlegungen folgend wurden daher scFv-präsentierende Phagen diverser Klone aus einer 50 mL Kultur isoliert, aufkonzentriert und in D₂O-PBS überführt. In ¹H-NMR-Spektren dieser Proben wurden breite Hüllkurven und stets ein deutliches Signal von Polyethylenglycol erhalten. Ein entsprechender ELISA sicherte das Vorhandensein von V3-Glycopeptid spezifischen Phagen in der Probe ab. In Abb. 3.43 ist das Ergebnis eines STD NMR Experiments mit **D26** scFv-präsentierenden Phagen und dem V3-Glycopeptid *p1c* dokumentiert.

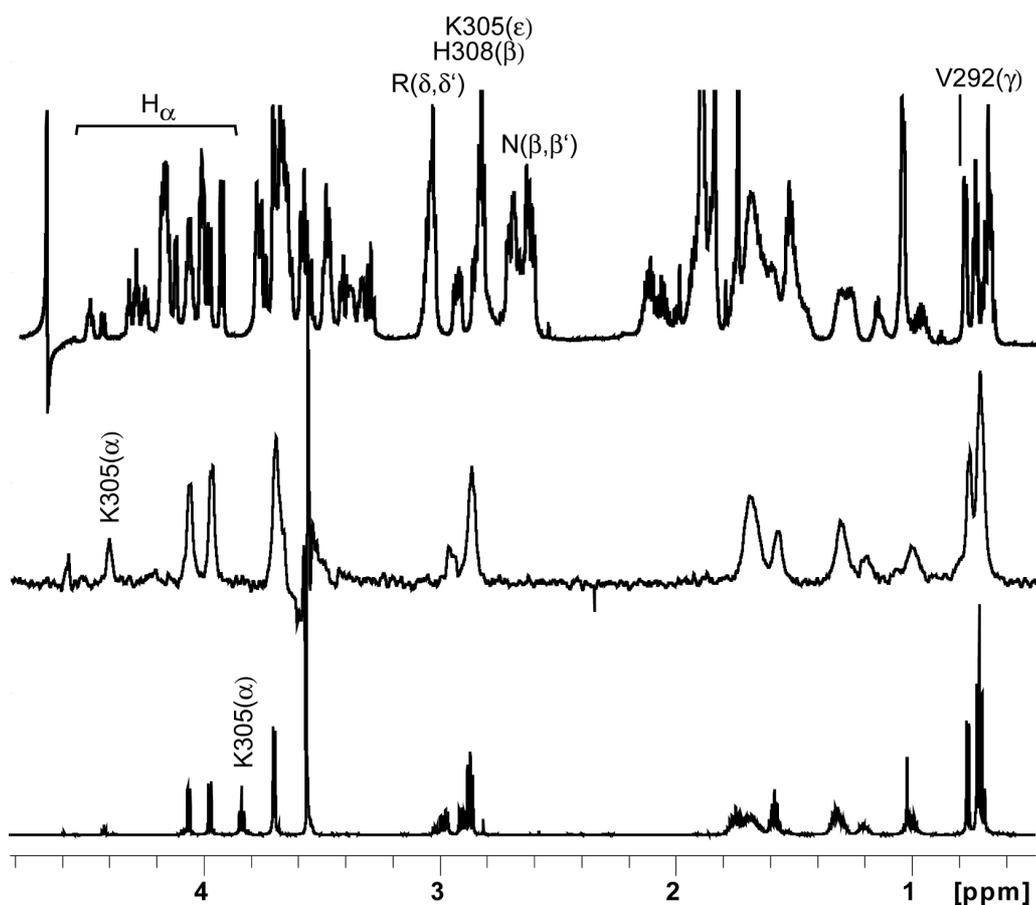


Abb. 3.43 *oben*: ^1H -NMR des V3-Glycopeptids **p1c**; *mitte*: STD-Spektrum einer Probe mit Klon **D26** scFv-präsentierenden Phagen und dem V3-Glycopeptid **p1c** ($387\ \mu\text{M}$) ($\delta_{\text{sat}} = -0.5\ \text{ppm}$, $\text{att}_{\text{sat}} = 40\ \text{dB}$, $t_{\text{sat}} = 2\ \text{s}$, $n_s = 2k$, $T = 305\ \text{K}$); *unten*: ^1H -NMR des Pentapeptids KSIHI. Nur einige definierte Ligandensignale erscheinen im STD-Spektrum. Diese können deutlich dem Sequenzabschnitt KSIHI zugeordnet werden.

Die Abb. 3.43 zeigt ein ^1H -NMR Spektrum des Glycopeptids **p1c** mit Unterdrückung des Wassersignals. Für die spätere Diskussion sind einige Signale zugeordnet. Das mittlere Spektrum ist das Ergebnis eines STD-Experiments mit scFv-präsentierenden Phagen des Klons **D26** mit dem Glycopeptid **p1c** in einer Konzentration von $387\ \mu\text{M}$, bei dem deutlich ein relativer STD-Effekt von 3 bis 7% festgestellt werden kann. Beim Vergleich der beiden Spektren fällt auf, dass nur ganz bestimmte Signale im STD-Spektrum vorhanden sind. Dieses wird besonders im Bereich der α -Protonen sowie im Bereich um 3 ppm deutlich. Ebenfalls bemerkenswert ist der STD-Filtereffekt auch zwischen 0 und 1 ppm, wo im STD-Spektrum δ - und γ -Protonensignale der Isoleucine vorhanden sind, jedoch keinerlei Signalintensität der V292 γ -Protonen. Die Signalintensitäten der Protonen des Isoleucin sind daher nicht auf partielle Sättigung durch Proteinvorsättigung bei $-0.5\ \text{ppm}$ zurückzuführen. Aus der Zuordnung der STD-Signale zu den Resonanzen des V3-Glycopeptids wurde ersichtlich, dass alle dem Motiv $^{305}\text{KSIHI}^{309}$ entstammen. Dieses wird unmittelbar durch Vergleich mit dem ^1H -NMR Spektrum des synthetisierten Pentapeptids KSIHI deutlich, in

dem nur einige Signale wie zum Beispiel K305 α eine andere chemische Verschiebung aufweisen (Abb. 3.43, unten). Die Ergebnisse dieses STD-Experimentes legten die Vermutung nahe, dass scFv **D26** spezifisch mit dem KSIHI-Motiv des V3-Glycopeptids interagiert. Um diese Vermutung zu bekräftigen, wurden ausgehend von einer 30 mL Kultur polyklonale Phagen isoliert, welche die scFv der naiven *Griffin.1*-Bibliothek präsentierten. Diese polyklonalen Phagen wurden zusammen mit dem V3-Glycopeptid **p2c** in einem STD-Experiment vermessen. Das Ergebnis dieses Experimentes zusammen mit einem STD-Spektrum analog präparierter Phagen von Klon **D26** ist in Abb. 3.44 zu sehen.

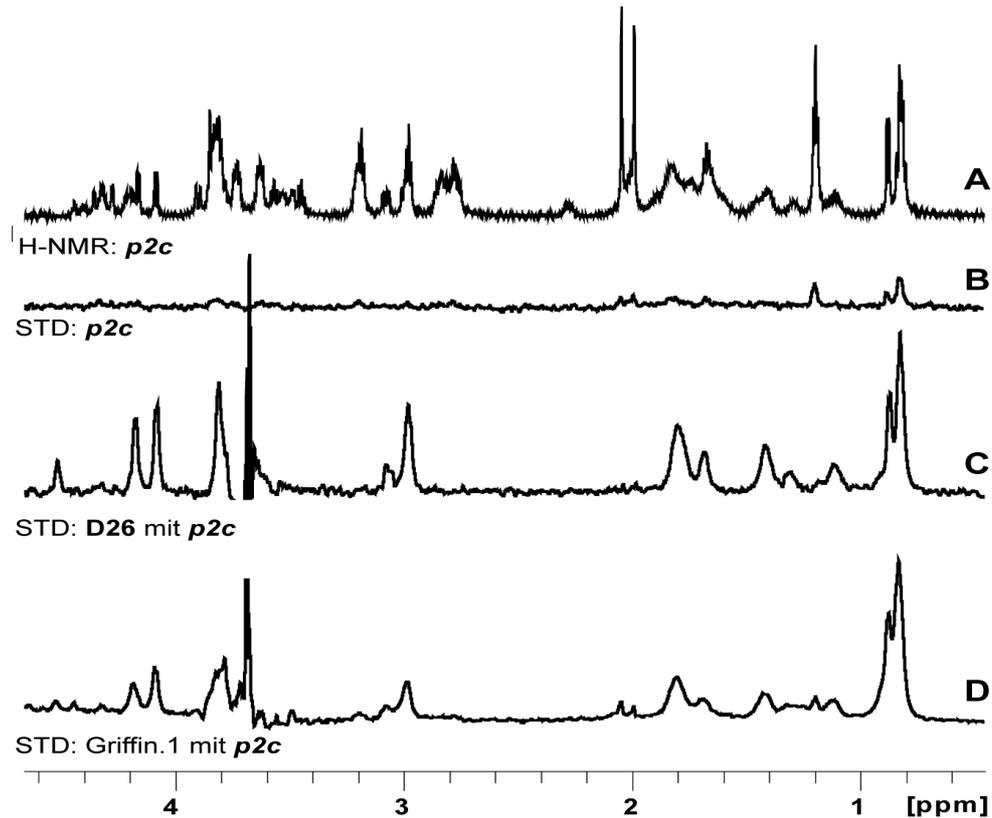


Abb. 3.44 A: ¹H-NMR Spektrum des V3-Glycopeptids **p2c** und dazugehöriges STD-Artefakt-Spektrum von **p2c** (636 μ M) ohne Phagen (B); C: STD-Spektrum von **D26** scFv-präsentierenden Phagen mit dem Glycopeptid **p2c** (424 μ M); D: STD-Spektrum von scFv-präsentierenden Phagen, welche die gesamte Bibliothek repräsentieren mit dem Glycopeptid **p2c** (424 μ M). Die Negativkontrolle mit Phagen der gesamten Bibliothek führt zu einem nahezu identischen STD-Spektrum.

Die STD-Experimente führten sowohl mit monoklonalen **D26** scFv-präsentierenden Phagen als auch mit den polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen der naiven Bibliothek zu nahezu gleichen Ergebnissen. Erneut dominieren deutlich Signale des KSIHI-Motives. Ein analog aufgenommenes STD-Spektrum des Glycopeptids **p2c** ohne Phagen verdeutlicht, dass es sich nicht um Effekte durch partielle Peptidsättigung handelt. Die vergleichende Quantifizierung der STD-Prozentwerte ist nicht zulässig, da die Gesamtzahl an Phagen je nach Präparation der Probe stark differieren kann. Auch das Verhältnis von scFv-

präsentierenden Phagen zu Helferphagen ist eine klon- und induktionsabhängige, nicht reproduzierbare Größe. Daher konnte die Affinität dieser Interaktion aufgrund dieser unbekannt, variablen Rezeptorkonzentration nicht durch STD-Titrationsexperimente quantifiziert werden.

Basierend auf den bisher präsentierten Daten findet eine selektive Interaktion von Phagenhüllproteinen oder von Domänen der scFv mit dem KSIHI-Peptidabschnitt der V3-Glycopeptide statt. Da nahezu identische STD-Spektren auch bei Verwendung von Phagen der gesamten Bibliothek erhalten werden, ist dieses keine Interaktion, die auf den spezifischen Eigenschaften des Klons **D26** beruht. Experimente mit monoklonalen Phagen anderer Klone führten zu gleichen Ergebnissen. ScFv-präsentierende Phagen können daher im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Bestimmung von Epitopen eingesetzt werden. Systematische Untersuchungen etwa bezüglich der absoluten STD-Effekte sind aufgrund von Inhomogenitäten der Proben untereinander nicht durchführbar.

Weitere Bemühungen, die Wechselwirkung von Liganden mit phagenassoziierten Rezeptoren mit STD NMR zu charakterisieren, können für andere Selektionssysteme dennoch lohnend sein. An dieser Stelle sei explizit auf eine mögliche Eignung für die Charakterisierung von Bindungsereignissen zwischen Peptiden mit von Phagen präsentierten Peptiden hingewiesen (Peptid/Peptid-Wechselwirkung).

3.6.2 STD NMR mit scFv und großen Überschüssen von V3-Peptiden

Da beliebige, der *Griffin.1*-Bibliothek entstammende scFv-präsentierende Phagen mit dem KSIHI-Motiv des V3-Glycopeptids interagieren, war zu klären, ob diese Wechselwirkung von den makroskopischen Phagenpartikeln oder von der verhältnismäßig kleinen scFv-Einheit herrührt. In vorangehenden Experimenten konnte eine Sättigung der scFv von etwa 15% erreicht werden, womit prinzipiell die Grundlage für erfolgreiche STD NMR Experimente gegeben ist. So wurde ein STD-Experiment mit scFv des Klons **P2** (2 nmol) und dem Glycopeptid *p2c* durchgeführt. In der Probe lag somit ein etwa 70facher Überschuss an Ligand vor. Das Ergebnis dieses STD-Experiments ist in Abb. 3.45 zu sehen. Das STD-Spektrum ist bei erster Betrachtung anhand der Selektivität der beiden Isoleucin- α -Protonen bei 4.1 ppm sowie K305 ϵ bei 3.0 ppm deutlich mit den STD-Spektren von scFv-präsentierenden Phagen aus Abb. 3.44 in Deckung zu bringen. Erneut dominieren STD-Signale des KSIHI-Motivs, woraus gefolgert werden kann, dass scFv der *Griffin.1*-Bibliothek allgemein bei großen Peptidüberschüssen mit dem KSIHI-Motiv der V3-Glycopeptide interagieren.

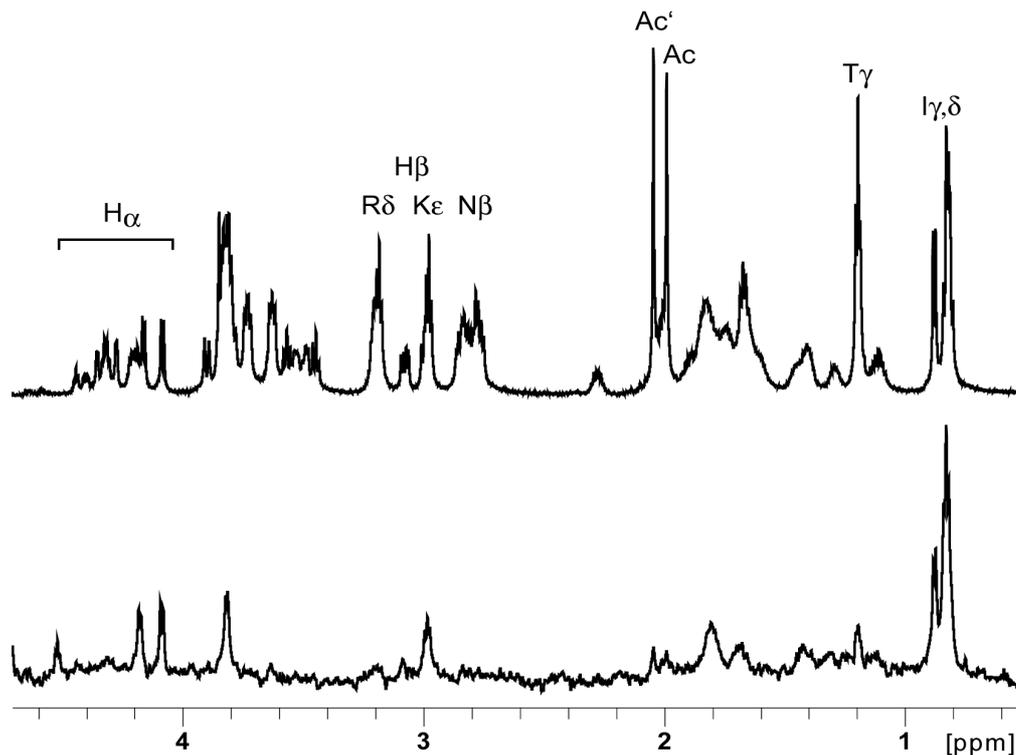


Abb. 3.45 *oben:* ^1H -NMR Spektrum des V3-Glycopeptids **p2c** (STRPNN(Chi)NTRKSIHI); *unten:* STD-Spektrum einer Probe mit 2 nmol scFv **P2** und 68fachen Überschuss Glycopeptid **p4c** (678 μM) ($\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 2$ s, $n_s = 2$ k, $T = 305$ K); besonders die Selektivität im Bereich der α -Protonen spricht für weitestgehende Übereinstimmung mit den STD-Spektren von scFv-präsentierenden Phagen der Abb. 3.44.

Da bei Messungen mit scFv die Stoffmenge an Rezeptor in der Probe bekannt ist, konnte in diesem Falle die Affinität bezüglich KSIHI durch die Aufnahme von STD-Titrationsexperimenten quantifiziert werden. Dazu wurde ein Peptidkonzentrationsbereich von 100 bis 700 μM vermessen. Für einige gut separierte Signale wurden die Veränderung der STD-Prozentwerte mit zunehmender Konzentration verfolgt. In Abb. 3.46 ist der Verlauf der STD-Amplifikationsfaktoren mit der Peptidkonzentration des K305 ϵ -Protonensignals gezeigt. Auch der Verlauf der erhaltenen Datenpunkte anderer Protonensignale stellte sich als aufschlussreich dar. Es wurde ersichtlich, dass im Bereich der bisher isoliert betrachteten hohen Peptidkonzentrationen eine lineare Abhängigkeit der STD-Amplifikationsfaktoren vorhanden ist. Dieses ist ein Charakteristikum von sehr schwachen oder gänzlich unspezifischen Bindungsereignissen. Somit würde das aus den bisher abgebildeten STD-Spektren abgeleitete Epitop KSIHI vermutlich keine Relevanz bei der Diskussion des Epitops der V3-Peptide gegenüber der scFv-Antigenbindungsstelle haben. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass bei der Durchführung einer *Phage Display* Selektion, aufgrund der vielen Wasch- und Separationsschritte, scFv mit derart schwacher Affinität anzureichern und mittels ELISA detektierbar sind.

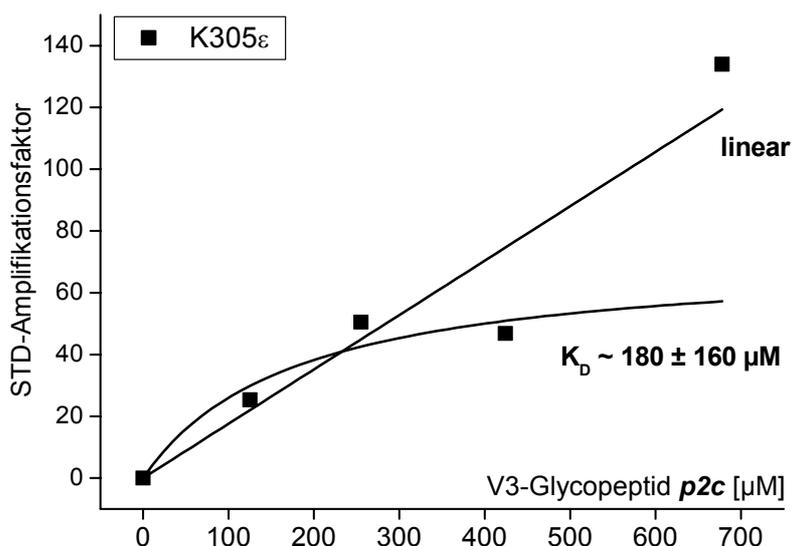


Abb. 3.46 Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die V3-Glycopeptidkonzentration einer Titrationsreihe mit hohen Überschüssen des Glycopeptids **p2c** bezüglich scFv **P2** (2 nmol). Die Einbeziehung aller fünf Datenpunkte führt zu einem linearen Verlauf. Unter Vernachlässigung des letzten Datenpunktes lässt sich aus einer mathematischen Anpassung an Gleichung 1.4 ein K_D -Wert abschätzen.

Betrachtet man den Verlauf der ersten vier Datenpunkte, so lässt sich jedoch vermuten, dass innerhalb dieses Konzentrationsbereiches eine spezifische Interaktion mit einer Dissoziationskonstante von unter 200 μM vorliegt. Aus den mittels SPR-Studien ermittelten K_D -Werten bezüglich der V3-Peptide von etwa 100 nM wird zudem deutlich, dass bislang stets zu hohe Peptidüberschüsse für STD-Experimente mit Phagen und scFv eingesetzt wurden. Es stellte sich die Aufgabe, die aus Abb. 3.46 abgeleiteten Vermutungen über das Vorliegen von scFv-spezifischen Interaktionen bei geringen Peptidüberschüssen durch Aufnahme von STD-Konzentrationsreihen mit deutlich niedrigeren Peptidkonzentrationen zu verifizieren.

3.6.3 STD NMR mit scFv und geringen Überschüssen von V3-Peptiden

Entsprechend den aus Abb. 3.46 hervorgegangenen Überlegungen, wurden STD-Titrationsreihen mit scFv **P2** und V3-Glycopeptidkonzentrationen bis 70 μM aufgenommen. Obwohl die Messungen eines jeden Titrationspunktes mit einer Scanzahl von 6 bis 9 k durchgeführt wurden, konnten STD-Spektren nur mit sehr geringem Signal/Rausch-Verhältnis erhalten werden. Die geringen absoluten STD-Intensitäten sind auf die niedrigen k_d -Werte um $7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Tab. 3.8) und den daraus resultierenden langen Rezeptorverweilzeiten von etwa 100 s zurückzuführen. Die Sensitivität der Experimente wird zusätzlich durch die geringe Ligandenkonzentration und eine Rezeptorsättigung von nur 15% beeinflusst. Probleme gab es im Besonderen bei der Ermittlung von STD-Prozentwerten der Chitobiosylprotonen. Generell beschränkte sich daher die Analyse der

STD-Effekte auf Signalhöhen (STD-Prozentwerte) anstelle von Integralen. In Abb. 3.47 ist stellvertretend für das Erscheinungsbild der erhaltenen STD-Spektren ein Ausschnitt eines STD-Spektrums von Klon **P2** (1.1 nmol) mit dem V3-Glycopeptid **p4c** einer Konzentration von 66 μM (13.2 nmol) gezeigt.

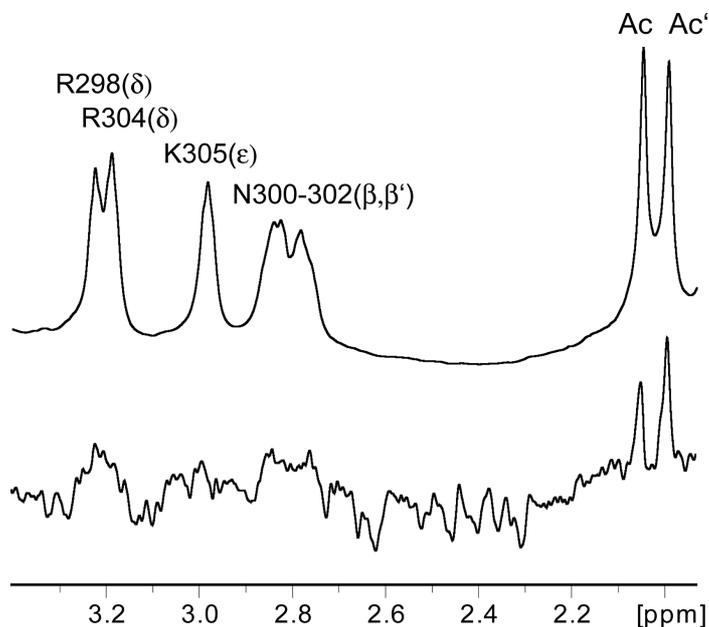


Abb. 3.47 oben: Ausschnitt eines off-resonance-Spektrums von 1.1 nmol **P2** scFv und zwölfmaligen Überschuss des V3-Glycopeptids **p4c** (RPNN(Chi)NTRKS) (66 μM ; D_2O -PBS, $t_{\text{sat}} = 3$ s, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $T = 305\text{K}$, $n_s = 7$ k); unten: Ausschnitt eines STD-Spektrums dieser Probe. Eine Bestimmung der STD-Prozentwerte gelang trotz sehr geringer Intensität der Signale.

Wie im Abschnitt 3.6.4 ausführlich präsentiert konnten durch Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration Verläufe erhalten werden, die das Vorliegen einer spezifischen Bindung zwischen V3-Glycopeptiden und scFv belegen. Ferner konnten für Protonengruppen von sehr ähnlicher chemischer Verschiebung markante Unterschiede der K_D -Werte ausgemacht werden, was ebenfalls als Charakteristikum einer spezifischen Bindung anzusehen ist.

Da die Höhe der ermittelten K_D -Werte (~ 2 μM) deutlich höher lagen als die Ergebnisse aus SPR-Studien (~ 100 nM), wurden STD-Experimente zur Untersuchung des Artefaktanteils durchgeführt. Die Bezeichnung „STD-Artefakte“ gilt STD-Signalen bei analoger Aufnahme von STD-Experimenten mit Proben in denen der Ligand, jedoch kein Rezeptor zugegen ist. Die Ursache für das Auftreten von STD-Signalen ohne Rezeptoranwesenheit ist eine partielle Sättigung von Ligandresonanzen durch die Vorsättigung bei -0.5 ppm. Dieser Effekt kann durch Ligandaggregation mit zunehmender Konzentration deutlich verstärkt werden. Auch die Bestimmung der STD-Artefakte im Konzentrationsbereich unter 70 μM unterlag aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses Fehlern bei der Bestimmung der Werte. Die Abb. 3.48 verdeutlicht die

Problematik der Artefaktberücksichtigung anhand ausgewählter Protonengruppen. Es sind zum Teil große STD-Artefaktanteile vorhanden.

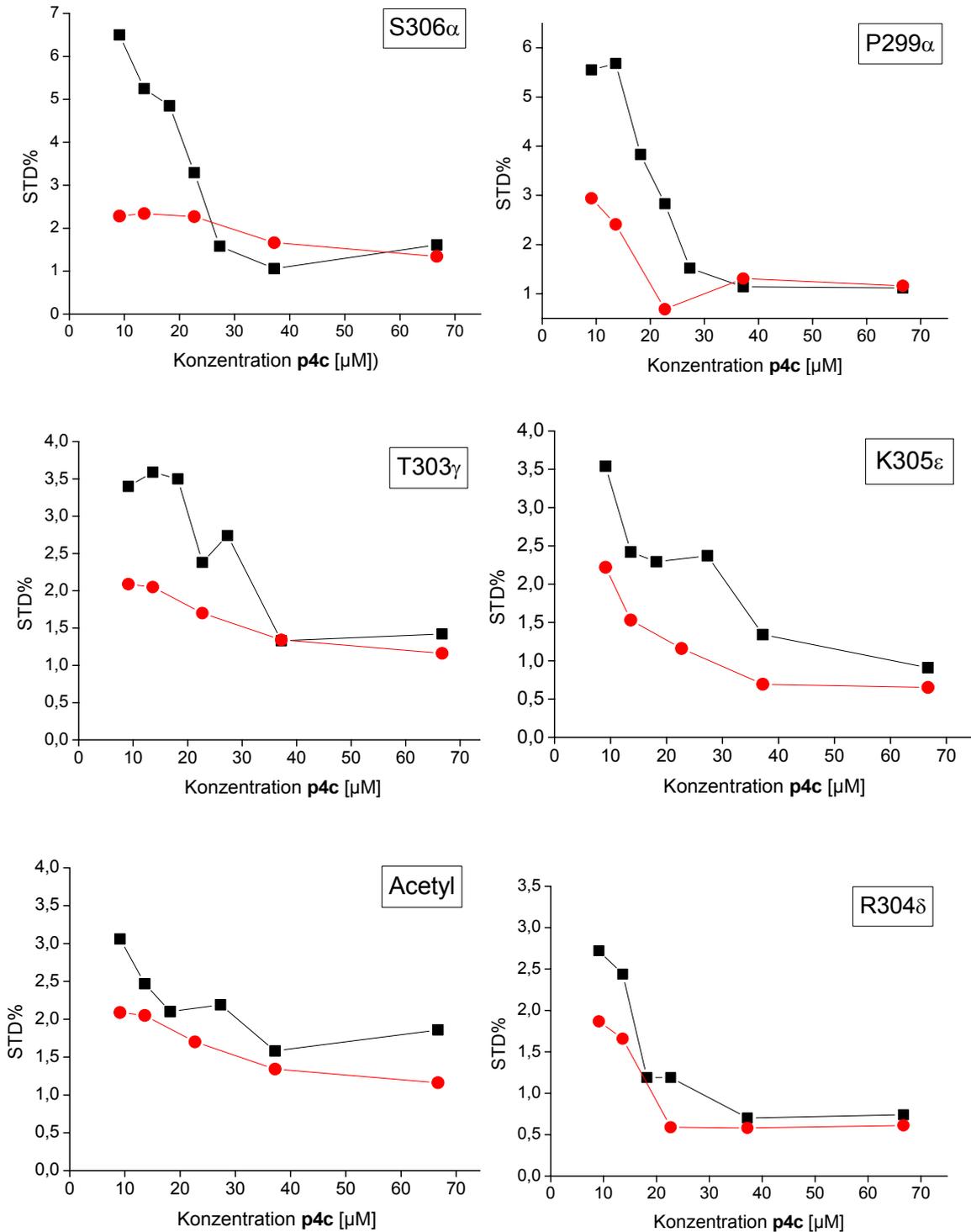


Abb. 3.48 Vergleich von STD-Prozentwerten ausgewählter Protonen eines Experimentes (scFv **P2** und Peptid **p4c**, Symbol: Rechteck) mit denen einer Artefaktbestimmung (nur Peptid **p4c**, Symbol: Kreis). Zu allermeist wiesen die STD-Prozentwerte der Artefaktbestimmungen kleinere Werte als die der Experimente mit scFv auf.

Zur Beurteilung des Einflusses von STD-Artefakten wurden zwei alternative Auswertungen vorgenommen. Zunächst wurden die STD-Prozentwerte ohne Artefaktberücksichtigung durch Multiplikation mit entsprechenden den Ligandüberschüssen zu STD-Amplifikationsfaktoren umgerechnet. Im Zuge der alternativen Auswertung wurden Differenzen zwischen STD-Prozentwerten und den STD-Artefaktwerten gebildet und diese Differenzen in STD-Amplifikationsfaktoren konvertiert, wobei negative Differenzwerte vernachlässigt wurden. Die Bildung von Differenzen dieser Werte führte in Einzelfällen zu einer gewissen Streuung der Daten. In Abb. 3.49 ist am Beispiel der K305 ϵ -Protonen das Ergebnis der Artefaktkorrektur zu sehen.

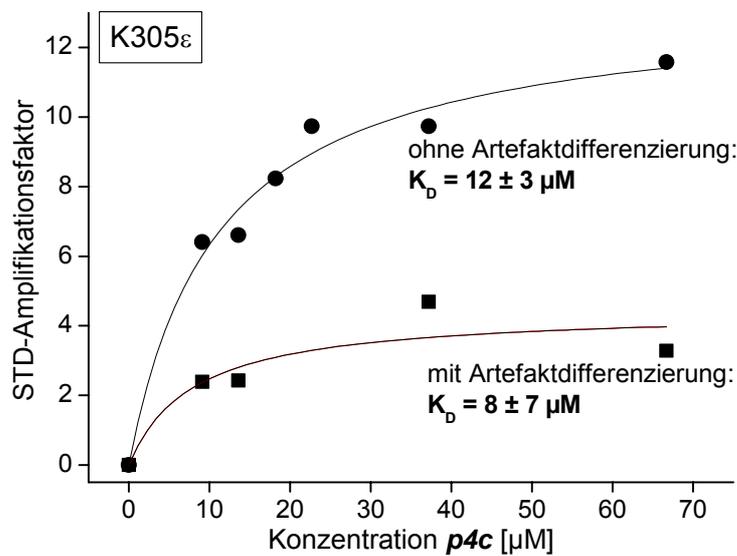


Abb. 3.49 Verlauf der STD-Amplifikationsfaktoren mit und ohne Artefaktdifferenzierung für die K305 ϵ -Protonen von p4c bei Anwesenheit von scFv P2 (1.1 nmol, 5 μM).

Da nicht zu jeder gemessenen Ligandkonzentration ein STD-Artefaktspektrum aufgenommen wurde, konnten weniger Datenpunkte mit Artefaktdifferenzierung erhalten werden. In Tab. 3.17 sind sämtliche ermittelten K_D -Werte mit und ohne Artefaktkorrektur gegenübergestellt. Die Werte weisen einen im Verhältnis zum berechneten K_D -Wert verhältnismäßig großen Fehler auf und sind somit in Bezug auf das Auswerteverfahren als gleichwertig zu betrachten.

Tab. 3.17 Berechnete K_D -Werte [μM] für diverse Protonengruppen des Glycopeptids **p4c** (RPNN(Chi)NTRKS) einer Titrationsreihe mit scFv **P2**. mittlere Spalte: K_D -Werte ohne Berücksichtigung der STD-Artefakte; rechte Spalte: K_D -Werte die ermittelt wurden auf Grundlage der Differenzwerte zwischen STD-Prozentwerten und STD-Artefakten der jeweiligen Konzentration. Im Rahmen der Fehler entsprechen sich die Werte.

	<i>ohne Artefaktkorrektur</i>	<i>mit Artefaktkorrektur</i>
P299 α	3 \pm 2	20 \pm 24
S306 α	8 \pm 2	15 \pm 10
T303 α	9 \pm 5	2 \pm 4
T303 β	20 \pm 9	na
R298 α	3 \pm 1	2 \pm 1
R298 δ	22 \pm 10	24 \pm 21
R304 δ	15 \pm 9	2 \pm 5
K305 ϵ	12 \pm 3	8 \pm 7
Ac'	26 \pm 11	na
Ac	25 \pm 7	na
T303 γ	20 \pm 9	16 \pm 24

Die vorliegende Tabelle verdeutlicht, dass eine rechnerische Berücksichtigung der STD-Artefakte den Wertebereich der thermodynamischen Dissoziationskonstanten nicht beeinflusst. Da die niedrigste ermittelte Dissoziationskonstante aller Protonengruppen bei der STD NMR Spektroskopie der tatsächlichen Dissoziationskonstante am nächsten kommt, ist die Affinität von scFv **P2** zu **p2c** unabhängig von der Berücksichtigung von STD-Artefakten 2 \pm 1 μM . An dieser Stelle bietet es sich an, die mittels STD NMR bestimmte Dissoziationskonstante von **p2c** bezüglich scFv des Klons **P2** mit der über SPR-Studien bestimmten Dissoziationskonstante von **p1c** bezüglich dieses Klons zu vergleichen. Der durch SPR-Studien bestimmte K_D -Wert von 133 nM ist etwa um den Faktor 15 höher. Gerade bei Konzentrationen unter 15 μM wären noch weitere Datenpunkte nötig gewesen, um den Anstieg bei Protonen mit Dissoziationskonstanten unter 10 μM verlässlicher durch eine mathematische Anpassung wiedergegeben zu können. Die Aufnahme von mehr Datenpunkten mit derart hohen Scanzahlen (6-9 k) hätte jedoch in diesem Ausmaß nicht zur Verfügung stehende Messzeit beansprucht. Aus ungenügender Rezeptorvorsättigung ($\sim 15\%$) und einer langsamen Dissoziationsrate ($\sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) resultierten niedrige STD-Prozentwerte, die bei derart geringen Konzentrationen nicht vom Rauschen zu differenzieren sind. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in den verhältnismäßig hohen Fehlerbeträgen der K_D -Werte wieder. Aus den geschilderten Sachverhalten heraus scheint es akzeptabel, dass zwischen den durch unterschiedliche Verfahren ermittelten thermodynamischen Dissoziationskonstanten eine Differenz besteht. Die über SPR-Studien bestimmten Werte unterlagen keinen Limitierungen bezüglich des Messbereiches, so dass

die mit SPR ermittelten K_D -Werte sicherlich eher den tatsächlichen Dissoziationskonstanten entsprechen.

Auf die Aufnahme und Interpretation von STD-Experimenten wurde trotz Problemen mit Artefakten und zu hohen K_D -Werten dennoch nicht verzichtet, da in Abhängigkeit von der Länge des V3-Peptids ein relativer Effekt auf die K_D -Werte aufgezeigt werden konnte. Im folgenden Absatz wird daher der Einfluss der Peptidlänge auf den durch STD NMR bestimmten K_D -Wert geschildert. Bei diesen Untersuchungen wurde auf die Berücksichtigung der STD-Artefakte verzichtet.

3.6.4 STD NMR mit scFv P2 und geringen Überschüssen von V3-Peptiden

In den Abschnitten 3.6.1 und 3.6.2 wurde verdeutlicht, dass die dem Epitop KSIHI zugehörigen STD-Intensitäten in Spektren mit hohen Ligandüberschüssen dominieren, diese Interaktion aber differenziert von der spezifischen Interaktion mit den Antigenbindungsstellen der scFv zu betrachten ist. Um Epitope bezüglich dieser Wechselwirkung zu charakterisieren, wurden STD-Titrationsreihen mit scFv von Klon **P2** und den in

Abb. 3.50 gezeigten V3-Glycopeptiden *p5c*, *p4c* und *p2c* im Konzentrationsbereich von 10 bis 100 μ M, entsprechend Überschüssen von 2 bis 15, vorgenommen.

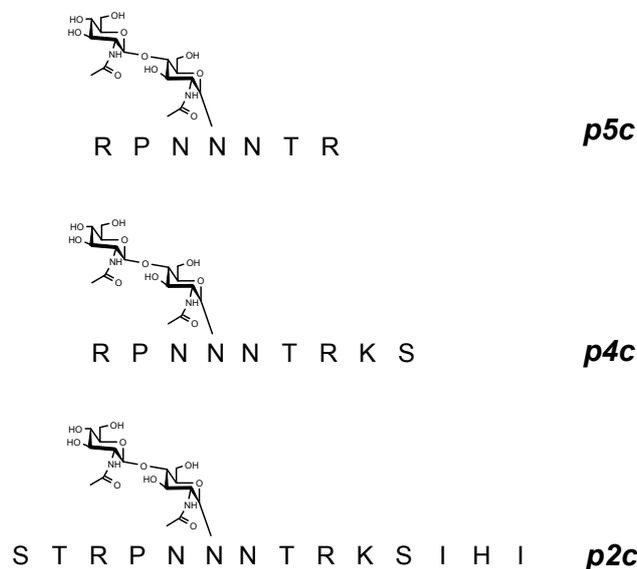


Abb. 3.50 Für STD-Titrationsen mit scFv **P2** eingesetzte V3-Glycopeptide.

Anhand dieser Auswahl von Peptiden sollte durch Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstanten jedes Peptids das Epitop lokal eingegrenzt werden. Zunächst soll auf die Ergebnisse der STD-Titration mit scFv **P2** und dem Glycopeptid *p5c* eingegangen

werden. Das Glycopeptid **p5c** repräsentiert den in der Problemstellung formulierten konservierten Kernbereich, den isolierte scFv erkennen sollten. In Abb. 3.51 ist die Abhängigkeit der Amplifikationsfaktoren von der Peptidkonzentration für ausgewählte Protonensignale aufgetragen und der Verlauf einer Funktion gemäß Gleichung 1.4 angepasst.

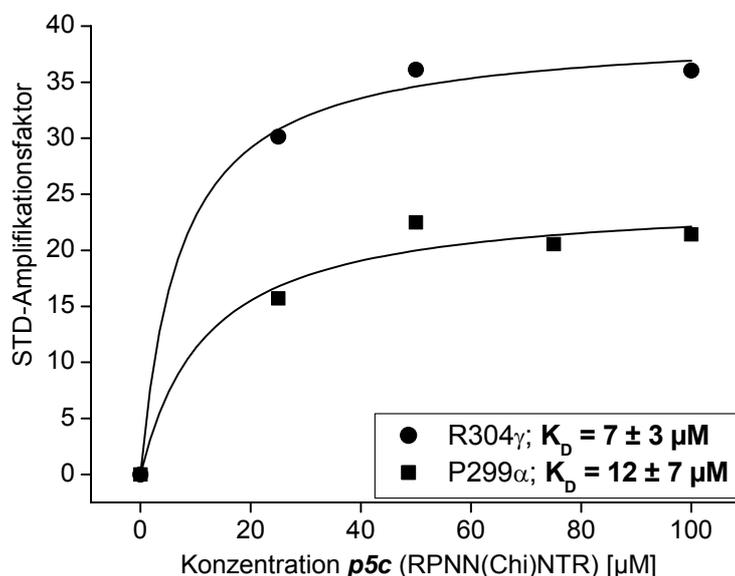


Abb. 3.51 Zunahme der STD-Amplifikationsfaktoren ausgewählter Protonensignale des V3-Glycopeptids **p5c** (RPNN(Chi)NTR) mit der Peptidkonzentration. Die Probe enthielt 1.52 nmol scFv **P2**. Abgebildet sind auch die an den Datenverlauf angepassten Kurven nach Gleichung 1.4.

Eine tabellarische Zusammenfassung aller bestimmten Werte sowie Angaben zur Probenzusammensetzung und den gewählten STD-Parametern befindet sich im sechsten Kapitel dieser Arbeit. Insgesamt liegt eine Affinität von $7 \pm 3 \mu\text{M}$ (R304γ) der scFv des Klons **P2** bezüglich des V3-Glycopeptides **p5c** vor. Dieser Wert ist mit den über SPR bestimmten Wert von $133 \pm 14 \text{ nM}$ für das V3-Vollängenpeptid **p1c** in den Vergleich zu stellen (Tab. 3.7). Der Wert für das kurze Glycopeptid **p5c** ist rund 50fach höher, woraus geschlossen werden kann, das wichtige epitopbildende Bereiche nicht in der verkürzten Sequenz enthalten sind. Dennoch liegt offensichtlich eine spezifische Interaktion vor und die Aufnahme von STD-Titrationsreihen mit geringen Überschüssen des Liganden erwies sich als sinnvoll.

In Abb. 3.52 sind Daten einer analogen STD-Titrationsreihe mit scFv **P2** und dem um K305 sowie S306 verlängertem Peptid **p4c** dargestellt. Auch die Auswertung der Daten dieser Experimente erbrachte zufriedenstellende Ergebnisse.

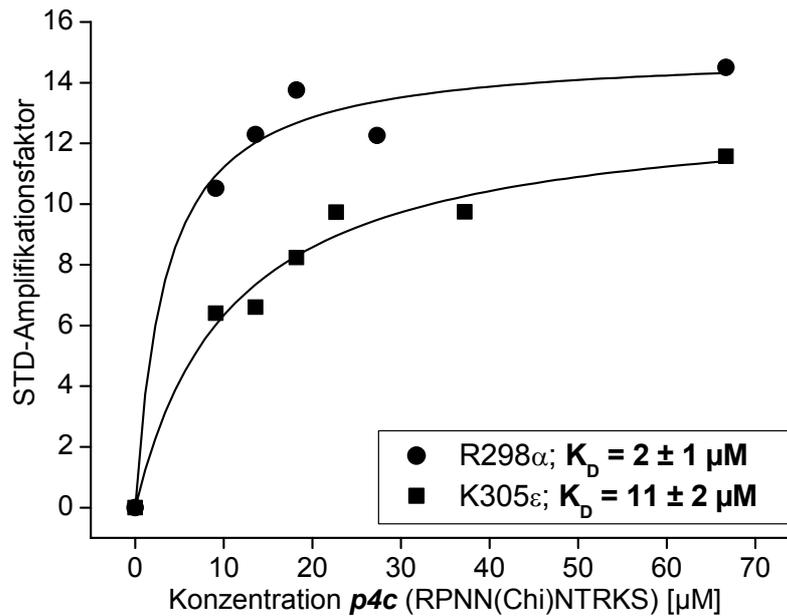


Abb. 3.52 Zunahme der STD-Amplifikationsfaktoren zweier Protonensignale des V3-Glycopeptids $p4c$ (RPNN(Chi)NTRKS) mit der Peptidkonzentration. Die Probe enthielt 1.1 nmol scFv $P2$. Abgebildet sind auch die an den Datenverlauf angepassten Kurven nach einem Bindungsmodell gemäß Gleichung 1.4.

Der niedrigste ermittelte K_D -Wert wurde bezüglich des gemeinsamen Signals der α -Protonen von K305 sowie R304 und auch bezüglich R298 erhalten und betrug 2 μM . Allein durch das zusätzliche Vorliegen von K305 und S306 konnte die Affinität mehr als dreifach gesteigert werden, wodurch diese Aminosäuren als Bestandteil des Epitops gegenüber den scFv des Klons $P2$ anzusehen sind.

Die dritte Titrationsreihe wurde mit $P2$ scFv und dem Glycopeptid $p2c$ durchgeführt, welches verglichen mit $p4c$ zusätzlich die Segmente $^{296}ST^{297}$ und $^{307}IH^{309}$ beinhaltet. Auch dieses mal wurden möglichst niedrige Ligandüberschüsse (1.8 bis 13.2) gewählt, um in dem durch SPR-Studien vorgegebenen Bereich zu messen. Einige Resultate dieser Messreihe sind in Abb. 3.53 präsentiert. Aufgrund komplexer Signalüberlagerungen war es nicht mehr möglich, in 1D-Experimenten alle Signale zuzuordnen. Zu einem Großteil der signifikanten Protonengruppen konnten dennoch K_D -Werte ermittelt werden, welche in Kapitel 6.12 explizit aufgeführt sind.

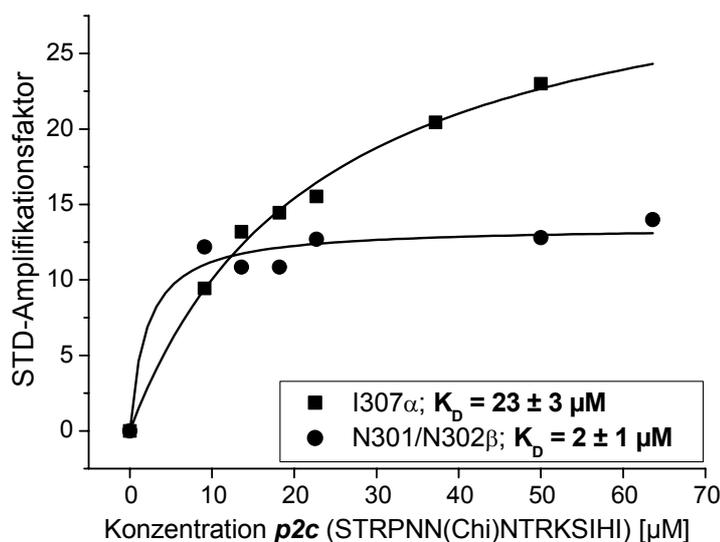


Abb. 3.53 Zunahme der STD-Amplifikationsfaktoren ausgewählter Protonensignale des V3-Glycopeptids **p2c** (STRPNN(Chi)NTRKSIHI) mit der Peptidkonzentration. Die Probe enthielt 1.1 nmol scFv **P2**. Abgebildet sind auch die an den Datenverlauf angepassten Kurven nach Gleichung 1.4. Ein sehr deutlicher Unterschied der Kurvenverläufe für I307α und N301/N302β liegt vor.

Einige der erhaltenen K_D -Werte mit dem V3-Glycopeptid **p2c** waren geringer als die von Experimenten mit dem kürzerem Peptid **p4c**. Diesem Umstand wird bei Vergleich der jeweils niedrigsten Dissoziationskonstanten im Rahmen der Fehler nicht Rechnung getragen, da auch für das Glycopeptid **p2c** ein Wert von 2 µM (R304δ, N301/N302β) erhalten wurde. Die Abnahme des K_D -Wertes bei Verlängerung der Peptidsequenz ist in Tab. 3.18 präsentiert.

Tab. 3.18 Ermittelte thermodynamische Dissoziationskonstanten von **P2** scFv bezüglich der V3-Glycopeptide; besonders K305 und S306 scheinen bedeutend an der Interaktion mit den scFv beteiligt zu sein. grau unterlegt: Asn(Chi).

	RPNNNTR (p5c)	RPNNNTRKS (p4c)	STRPNNNTRKSIHI (p2c)
K_D	7 ± 3 µM	2 ± 1 µM	2 ± 1 µM

Der Veränderung der gemittelten K_D -Werte mit Elongation des Peptides ist aufschlussreich in Bezug auf die Lokalisation des Epitops von **P2** scFv. So leisten K305 und S306 einen sehr wichtigen Beitrag zur Bindungsaffinität, wohingegen S296, T297 und das ³⁰⁷IHI³⁰⁹-Motiv deutlich schwächer zur Affinitätssteigerung beitragen. Den γ- und δ-Protonen beider Isoleucine kann anhand von Bindungskonstanten zwischen 23 und 30 µM nur eine schwache Beteiligung an der Wechselwirkung mit scFv **P2** zugesprochen werden.

Den Ergebnissen der STD-Titrationen folgend, umfasst das Epitop also im Wesentlichen den Bereich des Peptides **p4c**. Eine räumliche Nähe der Chitobiosyleinheit zur Oberfläche der scFv scheint unter diesen Umständen sehr wahrscheinlich vorzuliegen. Auch anhand der

K_D -Werte der Methylprotonen der Acetylgruppe (12 – 20 μM) des asparaginständigen N-Acetylglucosamines kann ein solcher Rückschluss gezogen werden.

3.6.5 STD NMR mit scFv D26 und geringen Überschüssen von V3-Peptiden

Auch mit scFv des Klons **D26** sollten STD-Titrationsexperimente zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst das Glycopeptid **p4c** (RPNN(Chi)NTRKS) ausgewählt, wobei in diesem Falle geringe Konzentrationen von nicht mehr als 25 μM , entsprechend einem 7.5fachen Überschuss, vermessen wurden. Dadurch sollte besonders der Anstieg der Amplifikationsfaktoren genauer wiedergegeben werden. Bei einer scFv-Konzentration von lediglich 4.2 μM (0.93 nmol) wurden trotz Aufnahme von je 7 bis 9 k *Scans* stark verrauschte STD-Spektren erhalten. In Bezug auf die Sensitivität wurde im Vergleich zu den STD-Experimenten mit **P2** sicherlich noch deutlicher im Grenzbereich gearbeitet. Bei der niedrigsten vermessenen Ligandkonzentration wurden zwar Werte von bis zu sieben STD-Prozent erhalten, da die Konzentration aber lediglich 4.55 μM (Überschuss 1:1.1) war und starke scFv-Artefakte diese Signale teilweise überlagerten, konnten nur sehr wenige signifikante Signale zur Auswertung herangezogen werden (Abb. 3.54).

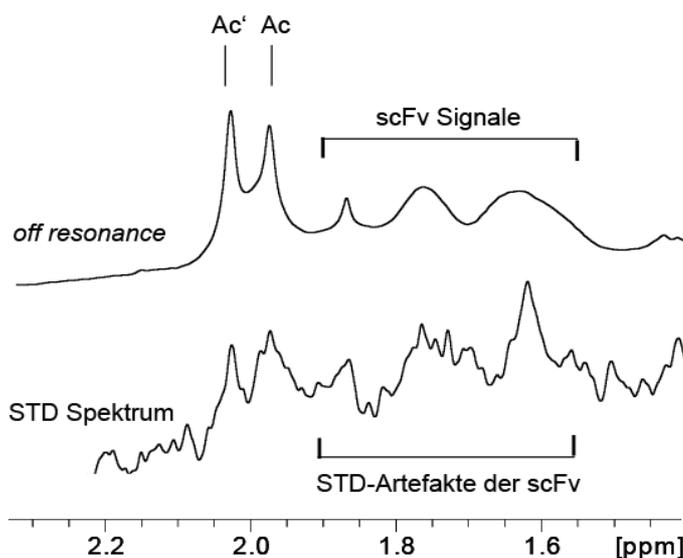


Abb. 3.54 STD-Experiment von scFv **D26** (4.2 μM , 0.93 nmol) und V3-Glycopeptid **p4c** (10.6 μM , 2.3 nmol); oben: off Resonance Spektrum; zu sehen sind die Signale der Chitobiosyleinheit zugehörigen Acetylgruppen sowie Signale die von den scFv stammen; unten: STD Spektrum dieser Probe ($n_s = 8\text{ k}$); Neben den Signalen der Acetylgruppen sind deutlich STD-Artefakte von 1 bis 7% der scFv vorhanden.

Auch bei diesen Experimenten wurden STD-Artefakte des Liganden nicht beachtet. Die Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren des kollektiven N β -Signals sowie das der R δ -Protonen gegen die Konzentration an Glycopeptid **p4c** ist Abb. 3.55 gezeigt. Die

Datenpunkte der wenigen zu bestimmenden Signale konnten gut dem Kurvenverlauf von Gleichung 1.4 angepasst werden.

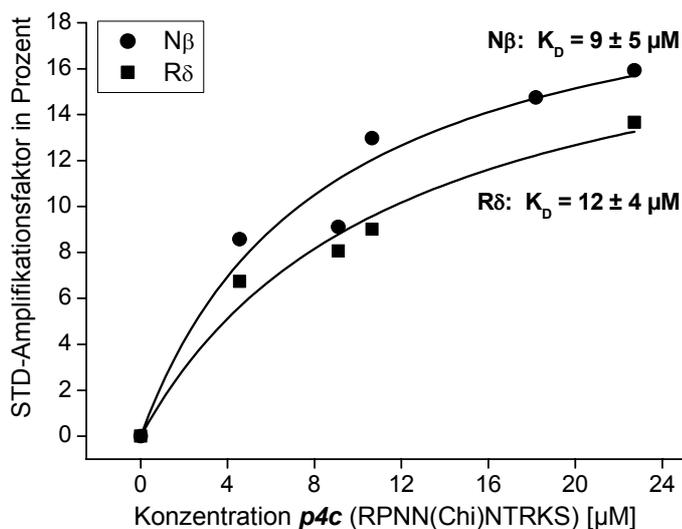


Abb. 3.55 Zunahme der STD-Amplifikationsfaktoren ausgewählter Protonensignale des V3-Glycopeptids $p4c$ (RPNN(Chi)NTRKS) mit der Peptidkonzentration. Die Probe enthielt 0.93 nmol $D26$ scFv. Angebildet sind auch die an den Datenverlauf angepassten Kurven nach Gleichung 1.4.

Für die Methylprotonen der Acetylgruppen wurden K_D -Werte von etwa $15 \pm 14 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Dissoziationskonstanten der α -Protonen konnten nur als ein gemeinsamer Wert von $8 \pm 4 \mu\text{M}$ bestimmt werden, so dass zusammenfassend von der Größenordnung her sehr ähnliche K_D -Werte verglichen mit der Titration von scFv $P2$ mit $p4c$ erhalten wurden. Ein signifikanter Affinitätsunterschied, wie er mit SPR-Studien ermittelt ($P2$: $133 \pm 14 \text{ nM}$; $D26$: $42 \pm 8 \text{ nM}$) wurde, liegt nicht vor. Es wurden keine STD-Titrationsexperimente mit $p2c$ durchgeführt, so dass nicht geklärt ist, ob das $^{307}\text{IHI}^{309}$ -Motiv bei der Interaktion mit scFv $D26$ eine bedeutendere Rolle spielt als es für scFv $P2$ der Fall war.

3.6.6 STD NMR basierte Epitope

Bei der bisherigen Auswertung der STD NMR Experimente lag der Schwerpunkt auf der Bestimmung von Affinitäten der V3-Peptide bezüglich der scFv. In diesem Abschnitt soll mit Hilfe von STD-Prozentwerten das Epitop auf atomarer Ebene kartiert werden.

Ein *Epitope Mapping* wird üblicherweise anhand von STD-Prozentwerten bei einem definierten Ligandüberschuss durchgeführt. Bei diesem Vorgehen wird für jede Protonengruppe nur ein Wert herangezogen und es erfolgt keine Berücksichtigung der Konzentrationsabhängigkeit der STD-Prozentwerte. Bei sich kreuzenden Kurvenverläufen unterschiedlicher Protonengruppen stellt sich jedoch die Frage, bei welchem Ligandüberschuss ein repräsentatives Epitop definiert werden soll. Vereinzelt kommt es unvermeidbar zu einzelnen Datenpunkten, die deutlich von dem Verlauf der angepassten

Gleichung 1.4 abweichen. Aus nur einem Spektrum eines einzigen Ligandüberschusses heraus kann dieses nicht beurteilt werden. Des weiteren hängen STD-Intensitäten nicht nur von der räumlichen Nähe zum Rezeptorprotein, sondern auch von den Relaxationszeiten der Protonen ab. Ein Effekt kann in dieser Hinsicht besonders bei gleichzeitiger Betrachtung von aromatischen und aliphatischen-Protonengruppen von signifikanter Größe sein. Die Bestimmung individueller Relaxationszeiten für die rechnerische Berücksichtigung beim *Epitope Mapping* ist jedoch aufwendig. In Abb. 3.53 ist zu sehen, welche Auswirkungen dieses auch auf homogen, aliphatische Protonen haben kann. So weisen die Amplifikationsfaktoren von I307 α nahezu ausschließlich höhere Werte als die von N300/N301 β auf. Ein *Epitope Mapping* über STD-Prozentwerte würde also den Protonen I307 α eine stärkere Partizipation am Epitop zusprechen. Durch die Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der STD-Prozentwerte konnte jedoch gezeigt werden, dass K305 ϵ stärker mit dem Rezeptor interagiert, da für diese Protonengruppe ein niedrigerer K_D -Wert ermittelt wurde. Die hier angesprochenen Problematiken in Bezug auf STD-Prozent-basierte Epitope können durch eine Epitopkartierung über K_D -Werte umgangen werden. Diesen Überlegungen folgend sollte *Epitope Mapping* sowohl über STD-Prozentwerte einer Ligandkonzentration als auch über die K_D -Werte aus STD-Titrationsreihen ermittelt und miteinander verglichen werden.

Es konnte durch SPR- und STD NMR-Experimente gezeigt werden, dass das Epitop bezüglich scFv **P2** im wesentlichen durch das Peptid *p4c* gegeben sein muss. Die Kartierung des Epitops wurde deshalb auf Grundlage der STD-Experimente mit diesem Peptid durchgeführt. Bei STD-Experimenten mit dem verlängerten Peptid *p2c* treten durch die beiden Isoleucine besonders viele Signalüberlagerungen im ^1H -NMR Spektrum auf. Bei STD-Titrationsexperimenten mit *p2c* konnte zudem gezeigt werden, dass die γ - und δ -Protonen der Isoleucine K_D -Werte im Bereich von 20-30 μM aufwiesen und daher nur wenig an der Interaktion mit scFv **P2** partizipieren. Der Ansatz, STD-HSQC Spektren zur Epitopbestimmung einzusetzen, wurde verworfen. Die ohnehin geringen STD-Intensitäten der ^1H STD-Experimente würden übertragen auf STD HSQC-Experimente einen enorm hohen zeitlichen Messaufwand erfordern. Allein die Aufnahme eines einzelnen 1D-STD Experimentes mit einer Scanzahl von 8 k benötigte bereits mehr als zwölf Stunden.

In der Abb. 3.56 sind die ermittelten Epitope dargestellt, wobei STD-Prozentwerte von auftretenden gemeinsamen Signalen verschiedener Protonengruppen in gleichem Maße allen Protonen des Überlagerungssignals zugeordnet wurden.

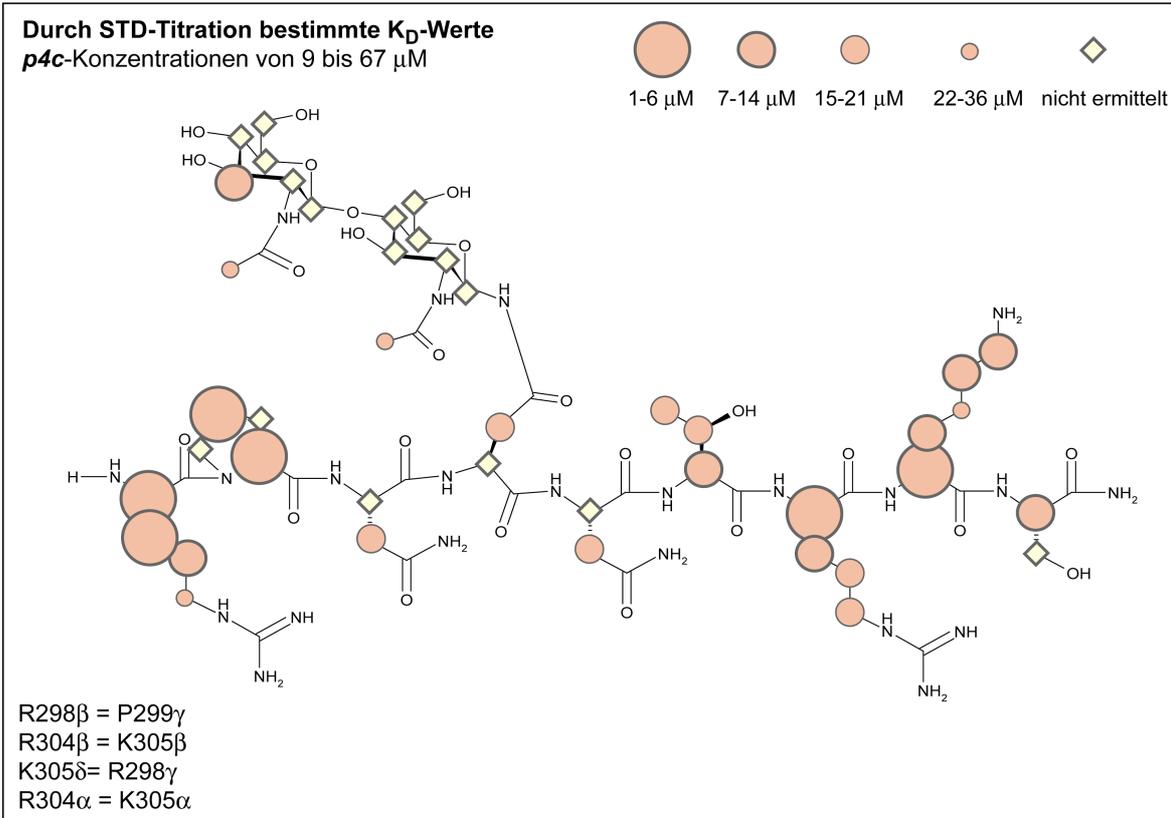
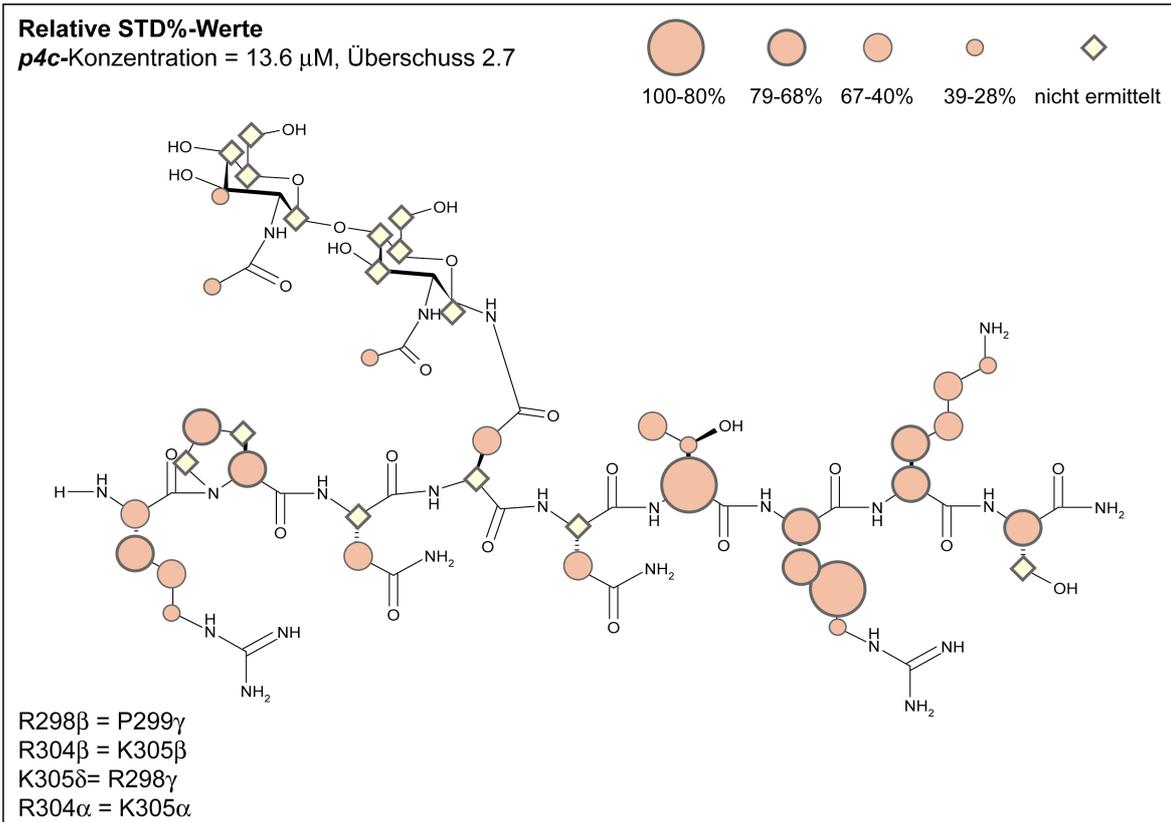


Abb. 3.56 Durch STD-Experimente bestimmte Epitope auf Seiten des V3-Glycopeptids p4c gegenüber scFv P2 ohne die Berücksichtigung von Ligandartefakten. oben: Das Epitop basiert auf relativen STD-Prozentwerten bei einem Peptidüberschuss von 2.7; unten: Das Epitop basiert auf K_D -Werten einer STD-Titrationsreihe. Die Markierungen gelten den Protonengruppen an den jeweiligen Positionen.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, verteilt sich das Epitop gleichmäßig über die gesamte Peptidsequenz und die auf unterschiedliche Weise ermittelten Epitope stimmen weitestgehend überein. In diesem Falle hat sich also die neue Variante der Epitopkartierung über die K_D -Werte als nicht notwendig erwiesen. Für andere Rezeptor/Ligand-Systeme mit stark unterschiedlichen Relaxationszeiten der Ligandprotonen könnte diese alternative Formulierung jedoch von Bedeutung sein. Die Ergebnisse der Titrationsreihe mit scFv **D26** und **p4c** ermöglichten für nur wenige Signale die Bestimmung von STD-Intensitäten. Auf eine Epitopkartierung wurde daher verzichtet.

Die hier präsentierten Epitope von scFv **P2** bezüglich dem V3-Glycopeptid **p4c** zeigen deutlich, dass sowohl Protonen von Seitenketten als auch α -Protonen des Rückrates am Bindungsepitop partizipieren. Diese N- und C-terminal von N301 lokalisierten Aminosäurepositionen sind mit Ausnahme von N300, K305 und S306 hochkonserviert.⁵⁰ Viele Übereinstimmungen mit einem ebenfalls durch STD NMR bestimmten Epitop des V3-Glycopeptids **p2c** bezüglich CCR5-präsentierender Liposomen konnten festgestellt werden.⁶¹ Eine tiefergehende Interpretation der Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten STD NMR Studien sollte im Hinblick auf den nicht berücksichtigten Einfluss von Ligandartefakten nicht erfolgen.

3.7 Externe HIV-1 Neutralisationsstudien

Entscheidend im Hinblick auf die Bewertung der im Rahmen dieser entwickelten Selektionsstrategie sind HIV-1 Neutralisationsstudien mit isolierten Klonen. Dazu wurden bereits im Mai 2006 Proben von scFv **D26** und scFv **P2** an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Balzarini (Department für Mikrobiologie und Immunobiologie der Katholieke Universität Leuven, Belgien) versandt. Die Proben (jeweils 1 mL) hatten eine scFv-Konzentration von $\sim 10 \mu\text{M}$ und die gp120-Affinitäten wurden mit $\sim 100 \text{ nM}$ angegeben. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte im September/Oktober 2006, wobei keine HIV-neutralisierenden Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Da bis zum Stand der Einreichung dieser Arbeit noch keine Informationen über die Durchführung der Neutralisationsversuche vorliegen, kann an dieser Stelle keine Beurteilung der Studie erfolgen. Als mögliche Ursachen für die nicht nachgewiesene HIV-1 Neutralisation kann grundsätzlich jedoch der scFv-Abbau in dem Lagerungsintervall sowie die zu geringe eingesetzte Stoffmenge sein (total $\sim 10 \text{ nmol}$). Letzteres kann besonders Konsequenzen gehabt haben, sollten die durch SPR-Experimente ermittelten Affinitäten deutlich höher sein als die tatsächlichen Affinitäten im viralen Kontext.

3.8 Abschließende Diskussion und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Selektionsstrategie I in Verbindung mit Selektionsschritten gegen immobilisiertes gp120 führte erfolgreich zur Isolierung von scFv, deren Bindungseigenschaften in darauffolgenden Experimenten eingehend charakterisiert worden sind. Neben ELISA gelang vor allem mit SPR-Studien der Nachweis spezifischer Bindung der Klone **D26** und **P2** an verschiedene Isolate des vollständig glycosylierten Proteins gp120 mit Affinitäten im Bereich von 40 bis 140 nM. Klon **P2** erwies sich als der stärker gp120-bindende Klon. Die durch Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten bestimmten K_D -Werte waren bis zu zehnfach niedriger (3 bis 25 nM), wobei die scFv vermutlich partiell dimerisiert vorliegen.

Die grundlegende Selektion wurde in Lösung mit einem V3-Glycopeptid durchgeführt. Dass dennoch Bindung an gp120 belegt werden konnte, bekräftigt die experimentell und in *Molecular Modelling*-Studien aufgezeigte freie Zugänglichkeit der V3-Loop im gp120-Monomer^{39;170} und unterstellt zudem einen gewissen Grad an Flexibilität im N-terminalen Bereich. Die N-terminale Region der V3-Loop ist in der Lage eine Konformation einnehmen, in der eine starke Interaktion mit den scFv **P2** und **D26** möglich ist.

Es konnte anschaulich demonstriert werden, dass im Vergleich zu dem als am potentesten eingestuften V3-Antikörper IgG3 **447-52D** für scFv **P2** ein GPGRAF-unabhängiges Epitop vorliegt. Zudem konnte kein Effekt durch Vorinkubation mit sCD4 festgestellt werden. Der für die Selektion gewählte V3-Peptidausschnitt beinhaltet zur Hälfte Positionen, die gemäß einer Genbankanalyse von 18,000 Sequenzen höher als zu 94% konserviert vorliegen, wodurch die Hoffnung bestärkt wird, mit der gewählten Strategie scFv mit breit neutralisierenden Eigenschaften isoliert zu haben. Aus gezielten Substitutionen von V3-Positionen basierend auf den in Datenbanken am häufigsten vorkommenden Sequenzvariationen ließe sich in weiterführenden *in vitro* Studien, die Breite des Neutralisierungspotentials abschätzen.

Der erzielte Effekt durch das Vorliegen der Chiotobiosyleinheit an Position N301 ist anhand der vorliegenden Daten nur im Ansatz dokumentiert. So konnte in STD NMR Experimenten den *N*-Acetylglucosaminen eine gewisse Beteiligung an der Interaktion mit scFv **P2** zugesprochen werden. Ein signifikanter Effekt auf die Affinität konnte anhand von ELISA und SPR-Studien jedoch nicht aufgezeigt werden. Dass die selektierten Klone in der Lage sind glycosyliertes gp120 zu binden, bestätigt jedoch einen entscheidenden Einfluss der gewählten Glycosylierung auf den Verlauf der Selektion. Es wurden auf diese Weise scFv mit Toleranz gegenüber einer Kohlenhydratstruktur des komplexen Typs in direkter Umgebung des Epitops isoliert.

Ein exaktes *Epitope Mapping* konnte nicht durchgeführt werden. STD NMR-Experimente unterlagen in dem zu untersuchenden Peptidkonzentrationsbereich Limitierungen und durchgeführte SPR-Studien verhalfen lediglich zur Eingrenzung des Epitop-bildenden Bereichs. Zusammenfassend ist das Epitop von scFv **D26** mit ²⁹¹SVEINSTRPNNNTRKSIHI³⁰⁹ anzugeben und das des detaillierter charakterisierten Klons **P2** ²⁹⁸RPNNNTRKS³⁰⁶ ist. Beide Klone weisen Toleranz gegenüber eines komplex-Typ Glycans an N301 auf. In weiterführenden ELISA- oder SPR-basierten Studien könnten V3-Peptide einer genügenden Länge von etwa zehn Aminosäuren, welche jeweils nur um eine Position verschoben sind (*pepscan*) erfolgreich zur genauen Lokalisation des Epitops führen. Besonders wichtige V3-Aminosäureseitenketten für die Interaktion mit den scFv könnten durch Substitution einzelner Aminosäuren (*alanine scan*) ausgemacht werden.

Die am besten charakterisierten humanen anti-V3 mAbs, die das (QR)GPGR-Motiv ausschließen sind **257-2D** (KRIHI) und **311-11D** (KRIHIGP)^{115;188} wie auch ein Satz anderer anti-V3 mAbs, die von Gorny *et al.*¹³¹ isoliert wurden. Sie alle zeigten mäßiges neutralisierendes Potential gegenüber primären HIV-1 M-Viren.¹⁰¹ Der Grund dafür lässt sich schnell der hohen Variabilität der epitopbildenden V3-Positionen zuschreiben. Im Gegensatz dazu konnte für scFv **P2** anhand von STD NMR Spektroskopie belegt werden, dass die Aminosäuren ³⁰⁷IHI³⁰⁹ nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf das Epitop spielen.

Die vorhandenen Diskrepanzen zwischen den Dissoziationskonstanten aus SPR-Kinetik (~5 nM), SPR-Thermodynamik (~100 nM) und STD NMR (~2 µM) entsprechen den Erwartungen. Für SPR-Kinetikexperimente, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden konnte deutlich aufgezeigt werden, dass etwa bedingt durch Rückbindungseffekte deutlich höhere Affinitäten im Vergleich zu Konkurrenzexperimenten in Lösung erhalten werden.¹⁸⁹ Bei STD NMR Spektroskopie gibt es Limitierungen durch kinetische Parameter, die im Rahmen dieser Arbeit dazu führten, dass ungenügend Datenpunkte bei geringen Überschüssen vermessen werden konnten. Dieses könnte zu der Ermittlung von zu hohen Affinitäten bei den STD NMR Experimenten geführt haben.

Das Epitop des IgM **MO97/V3** ist mit PNNNTRKSIR angegeben. Er wurde *in vitro* mit einem rekombinanten nicht-glycosylierten gp120-IIIB-Fragment aus HIV-1 negativen Seren isoliert. **MO97/V3** ist nicht in der Lage die HIV-1 Stämme IIIB and MN zu neutralisieren.¹²³ Die dazu von Ohlin *et al.* geäußerte Vermutung, dass die Glycosylierung die Neutralisation durch **MO97/V3** verhindert ist sicherlich zutreffend. Der hier verfolgte Selektionsansatz mit V3-Glycopeptiden erwies sich daher als ein überlegenes Konzept, um Epitope im N-terminalen Bereich der V3-Region zu frequentieren, ohne dass die Glycosylierung einen nachteiligen Effekt auf die Interaktion hat.

Ein muriner Antikörper mit ähnlichem Epitop ist IgG1 **9284** (NNTRKSIRIQRG).¹⁹⁰ Er interagiert nur mit gp120-IIIB und im oligomeren gp120-Verband ist das Epitop dem Antikörper nicht zugänglich.^{127;128} Beruhend auf der Tatsache, dass IIIB aufgrund der QR-Insertion zu einer Minderheit von V3-Sequenzen gehört und zudem X4-trop ist haben IIIB spezifische Antikörper generell limitiertes neutralisierendes Potential. Die isolierten scFv **D26** und **P2**, für die ja bereits eine Interaktion sowohl mit SF162 und Bal als auch mit IIIB nachgewiesen werden konnte, sind daher wahrscheinlich in ihrem neutralisierendem Potential überlegen.

Die murinen mAbs **IIIB-V3-21** und **IIIB-V3-26** wurden durch Immunisierung mit dem Peptid SVEINCTRPNNNTRKSI erhalten und wiesen keine HIV-1 neutralisierende Eigenschaften auf.¹²⁴ Auch bei diesem Ansatz fehlte die Berücksichtigung des Vorliegens einer komplexen Typ Glycosylierung an N301.

Der von Cavacini *et. al.* aus einem HIV-1 Patientenserum isolierte anti-V3 IgG2 **B4e8** weist neutralisierende Eigenschaften gegenüber HIV-1 Primärisolaten auf. Die Lokalisation des Epitops wurde „Sequenzen der Basis“ zugeordnet.¹⁹¹ Aufgrund der unzureichenden Epitopbeschreibung kann an dieser Stelle kein Bezug zu den scFv **P2** und **D26** hergestellt werden.

Zusammenfassend kann bezüglich scFv **D26** und **P2** eine deutliche Abgrenzung gegenüber allen bisher veröffentlichten anti-V3 mAbs gemacht werden. Es sei darauf verwiesen, dass zudem bislang keine scFv-Formate im Zusammenhang mit der V3-Region beschrieben sind.

Im Rahmen des Ausblickes muss folgende Ausführung vorangestellt werden: Von grundlegender Bedeutung für die Gesamtbewertung der entwickelten Selektionsstrategie und für die Planung sämtlicher, weiterer Schritte ist zwingend eine wiederholte und experimentell genau beschriebene HIV-1 Neutralisationsstudie mit scFv **D26** und **P2** unter Einsatz ausreichender Stoffmengen durchzuführen.

In Bezug auf die Interaktion auf molekularer Ebene der scFv würden sich umfassende Informationen aus Röntgenstrukturaufnahmen der Komplexe aus scFv und V3-Glycopeptiden ergeben. Versuche zur Kristallisation sind somit im Rahmen dieses Ausblickes angeregt. Grundsätzlich eignen sich scFv zur Kristallisation, was anhand einer Anzahl in der *Protein Data Bank* veröffentlichter Strukturen belegt ist. Diese Strukturen sind ferner optimale Ausgangspunkte für die Erstellung homologer *in silico* Modelle von den in dieser Arbeit isolierten scFv.

Die Klone **D26** und **P2** sind lediglich zwei Stellvertreter aus polyklonalen Reservoirs unterschiedlicher Selektionsvarianten. Der Expression einer größeren Anzahl monoklonaler

scFv aus diesen Reservoirs, könnte sich ein SPR-basiertes *screening* zur Identifizierung von möglicherweise noch affineren scFv anschliessen.

Im Bereich von HIV-Antikörpern wurde *in vitro* Affinitätsmaturation bereits erfolgreich durchgeführt, wobei eine nahezu 30fache Erniedrigung des K_D -Wertes von Fab **b12** erreicht wurde.¹⁹² Auch im Falle der isolierten scFv **D26** und **P2** könnten mutagene Verfahren zur Steigerung der Affinität vollzogen werden. Im Falle gp120-Antikörpern kann auch eine Konjugation an sCD4 von einem positiven Effekt auf das Neutralisierungspotential haben, wie es von Dey *et. al.* im Zusammenhang mit **17b** berichtet wurde.¹⁹³

Die vorliegenden scFv dienen als Ausgangspunkt für die rekombinante Transformation in bivalente Antikörperformate, wodurch mit einer mehrfachen Verringerung des K_D -Wertes gerechnet werden kann.^{182;184} Für das bereits vorliegende bivalente Konstrukt scFv**D26**-IgEAC1 konnte bereits eine spezifische Interaktion mit gp120 und dem V3-Glycopeptid *p1c* nachgewiesen werden. Trotz Bindung an monomeres gp120, könnten die scFv aufgrund ihrer geringeren Größe im natürlichen Kontext eines gp120-Trimeres bei einer begrenzten sterischen Zugänglichkeit des Epitops überlegen sein. Die Konstruktion weiterer bivalenter Konstrukte, bis hin zu vollständigen Immunglobulinen, verbunden mit genauer Analyse der Aviditäten und Kinetiken (SPR-Studien) und Studien am viralen System werden zeigen, ob bivalente Konstrukte überlegen sind. Studien zur Eignung einer bestimmten Ig-Subklasse oder eines bestimmten Isotyps könnten ebenfalls von Bedeutung sein. In Bezug auf STD NMR-Experimente könnten sich die höhermolekularen bivalenten Formate, durch ein höheres Ausmaß an erreichbarer Sättigung, als geeigneter im Gegensatz zu den scFv erweisen.

Für eine Gabe von scFv **D26** oder **P2** als HIV-1 neutralisierendes Agens, wäre es aus pharmakokinetischer Sicht besser, scFv-Dimere einzusetzen. Weitere genetische Veränderungen wie zum Beispiel die Veränderung der Netto-Ladung könnten die Möglichkeit für den therapeutischen Einsatz von scFv erhöhen.¹⁸⁴ Langfristigen Bemühungen, passive Immunisierung mit scFv **D26** und **P2** basierten Antikörpern zu erzielen, müssten jedoch in jedem Falle kompetitive Untersuchungen mit derzeit bedeutenden anti-HIV mAbs vorausgehen, aus denen sich dann eventuell auch synergistische Effekte für die Entwicklung von Kombinationstherapien ergeben würden.

Bemerkenswert in Bezug auf die präsentierten Ergebnisse ist die Direktheit dieses verhältnismäßig unaufwendigen Selektionsverfahrens. Da bislang nur eine naive scFv-Bibliothek zum Einsatz kam, bietet es sich an, den entwickelten Selektionsansatz mit dem gleichem V3-Glycopeptid auf eine analoge Selektion mit einer nicht-naiven Bibliothek zu übertragen. Insbesondere eine Antikörperbibliothek eines über einen langen Zeitraum mit

HIV-1 infizierten Patienten, der jedoch nicht durch einen Übergang zu AIDS geprägt ist (*long term non-progressor*, LTNP) scheint in diesem Hinblick hochgradig interessant.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Selektionsstrategie kann möglicherweise auch allgemeinen Wert haben, wenn es die Aufgabenstellung ist, mAbs gegen beliebige proteinogene, konservierte Epitope in direkter Umgebung eines Kohlenhydrats zu isolieren.

4. Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper (mAbs) mit Affinität bezüglich der V3-Region des HIV-1 Glycoproteins gp120 können potentiell die Infektion humaner CD4⁺ Lymphozyten mit dem Virus verhindern. Dieses beruht darauf, dass die V3-Region essentiell für die Interaktion mit dem auf Makrophagen präsenten HIV-Korezeptor CCR5 ist. Da existierende anti-V3 mAbs nahezu ausschließlich Sequenzen eines β -Schleifen bildenden Motivs an der Spitze der V3-*Loop* erkennen und oft keine breit neutralisierende Eigenschaften aufweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein vollständig neuer Ansatz zur Selektion von V3-Antikörpern verfolgt.

Zielstruktur für einen *Phage Display* Ansatz war zunächst ein V3-Glycopeptid der Sequenz ²⁹¹SVEINSTRPNNNTRKSIHI³⁰⁹ mit einer GlcNAc(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc-Glycosylierung an Position N301 (Chi), stellvertretend für ein im viralen Kontext vorkommendes komplexes Oligosaccharid. Die Selektion gegen dieses Antigen wurde in Lösung mit einer Bibliothek semisynthetischer *single-chain* Antikörperfragmente (scFv) humanen Ursprungs im Phagemidvektorformat durchgeführt (*Griffin.1*). Es gelang durch unterschiedliche Selektionsvarianten monoklonale Antikörperfragmente gegen das V3-Glycopeptidantigen zu isolieren, von denen der am besten charakterisierte Klon **D26** ist. Der Selektion mit dem V3-Glycopeptid schlossen sich zusätzliche Selektionsschritte gegen das Volllängenprotein gp120 an, wobei aus diesem Ansatz Klon **P2** hervorging. Die Sequenzen der scFv dieser beiden Klone und die vier weiterer spezifisch an das V3-Glycopeptid bindender Klone sind ermittelt worden.

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von isolierten scFv ausgewählter Klone wurden ELISA-Studien sowohl mit an BSA konjugierten V3-Peptiden als auch mit gp120 erfolgreich durchgeführt. In auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) beruhenden Experimenten wurden für die scFv **D26** und **P2** Affinitäten gegenüber V3-Peptiden, einem V3-Proteinkonstrukt sowie gegenüber den gp120-Isolaten IIIB, SF162 und Bal bestimmt. Die über Gleichgewichtswerte bestimmten thermodynamischen Dissoziationskonstanten sind im Bereich von 40 bis 140 nM, wobei scFv **D26** stärker mit dem V3-Glycopeptid interagiert, scFv **P2** jedoch eine höhere Affinität zu gp120 aufweist. Zusätzlich konnte durch SPR-Kompetitionsstudien das Epitop von **P2** auf den Bereich von S296 bis I309 eingegrenzt werden. Die Analyse der Kinetik der Interaktion deutete auf eine partielle Dimerisierung der scFv hin und führte zu Affinitäten, welche im Bereich von 5 bis 10 nM liegen und somit bis zu zehnfach kleiner waren als die durch die Gleichgewichtswerte bestimmten thermodynamischen Dissoziationskonstanten.

Ein vom Klon **D26** abgeleitetes bivalentes Antikörperkonstrukt (scFv-IgEΔC1), welches extern zur Verfügung gestellt wurde, konnte durch SPR-Studien ebenfalls positiv auf eine Interaktion mit dem V3-Glycopeptid sowie mit gp120-Isolaten getestet werden.

Die Methode der STD NMR Spektroskopie ermöglichte durch Titrationsexperimente mit V3-Glycopeptiden die Bestimmung von thermodynamischen Dissoziationskonstanten bezüglich von V3-Peptiden unterschiedlicher Länge (~2 μM) sowie einer atomar aufgelösten Epitopkartierung auf Seiten eines verkürzten V3-Glycopeptids bezüglich scFv **P2**. Bei geringen Peptidkonzentrationen traten bei der Durchführung dieser Experimente allerdings deutliche Limitierungen auf. Das Epitop von scFv **P2**, konnte durch STD NMR Experimente auf ²⁹⁸RPNN(Chi)NTRKS³⁰⁶ eingegrenzt werden. Zudem wurden erstmalig STD-Experimente mit scFv-präsentierenden Phagen durchgeführt, deren Ergebnisse jedoch nicht interpretiert werden konnten.

Eine Differenzierung jeglicher Klone in der Erkennung von V3-Peptid und V3-Glycopeptid stellte sich bei keinem der durchgeführten Experimente heraus. Es konnte jedoch eindeutig eine hohe Affinität gegenüber den glycosylierten gp120-Isolaten nachgewiesen werden, so dass eine Toleranz gegenüber einer komplexen Glycosylierung an N301 vorliegt. Zugleich beinhaltet das Epitop Aminosäurepositionen in direkter Umgebung zur Glycosylierungsstelle, welche subtypübergreifend größtenteils hochkonserviert vorliegen. Die in dieser Arbeit selektierten scFv unterscheiden sich daher von sämtlichen in der Literatur beschriebenen anti-V3 mAbs.

Bisher konnte eine extern durchgeführte Studie mit den Klonen scFv **D26** und **P2** keine HIV-1 Neutralisation belegen. Weitere Studien sollen diesen Befund überprüfen. Die Klone **D26** und **P2** stellen ideale Ausgangspunkte für Schritte zur Affinitätsmaturation sowie zur Überführung in weitere bivalente Antikörperformate dar. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Selektionsstrategie kann zudem auf eine Durchführung mit nicht-naiven Bibliotheken übertragen werden und stellt möglicherweise ein allgemeines Verfahren zur Selektion von Antikörpern mit Kohlenhydrattoleranz dar.

Zusammenfassend gelang die Selektion und Charakterisierung von monoklonalen scFv-Antikörperfragmenten mit thermodynamischen Bindungskonstanten von etwa 100 nM an das virale Oberflächenprotein gp120. Aufgrund von Epitopen, die hochkonservierte Aminosäurepositionen in direkter Umgebung einer sterisch anspruchsvollen Glycosylierung beinhalten, unterscheiden sich diese deutlich von bisher veröffentlichten V3-Antikörpern.

5. Summary

During the entry of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) the viral envelope glycoprotein gp120 binds to CD4 molecules on host cells followed by an interaction with a coreceptor which is CCR5 on macrophages. In this secondary interaction the third hypervariable loop (V3 loop) of gp120 plays a critical role. Anti-V3 monoclonal antibodies (mAbs) provide insight into the mechanism of HIV-1 entry, are key in the development of passive immunization concepts and could promote novel vaccine approaches.

Monoclonal Abs that bind to the V3 loop are numerous while many of these bind to residues of a highly conserved motif which is responsible for a type II β turn at the V3 loop tip ($^{310}\text{GPGR}^{313}$ for subtype B). They infrequently neutralize other clades with GPGR-motif variations. Only a few mAbs that bind to the N-terminal region excluding the (QR)GPGR motif are documented of which all of them showed limited neutralizing activities. So far approaches with linear V3 peptides or fully glycosylated gp120 did not lead to broadly neutralizing mAbs binding to residues of the highly conserved region $^{298}\text{RPXNNTR}^{304}$ which includes a complex type oligosaccharide at N301. It can be assumed that mAbs selected on linear peptides would not be able to bind these residues in the presence of the complex oligosaccharide. In the course of selections with fully glycosylated gp120 on the other hand, these conserved residues might be masked by the voluminous carbohydrate moiety. The idea of this work was to arrive at mAbs that recognize the highly conserved amino acids and that additionally tolerate the glycan moiety.

Therefore a screening of a naive phagemid vector based library of human monoclonal single-chain Fv antibody fragments (scFv) whose the CDR3 are partially randomized (*Griffin.1*) was performed. In contrast to conventional V3 peptide screens a synthetic N-type glycopeptide of the subtype B V3 N-terminal region ($^{291}\text{SVEINSTRPNNNTRKSIHI}^{309}$, C296S) that excluded the immunodominant $^{310}\text{GPGR}^{313}$ -motif was used as antigen. Instead of a complex glycan at N301 the chitobiosyl-moiety (Chi; $\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$) representing the part of the glycan that is closest to the peptide backbone was used. Several selections were carried out in solution with the biotinylated V3 glycopeptide and led to the isolation of clone scFv **D26**. Additional rounds were performed with immobilized gp120 (clone scFv **P2**). The amino acid sequence of six different clones was determined.

ELISA documented immunoreactivity of clones **D26** and **P2** in regard to the V3 glycopeptide and to gp120. In surface plasmon resonance (SPR) experiments scFv **D26** and **P2** showed about 100 nM binding affinity to the V3 glycopeptide as well as to gp120 isolates IIIB, SF162 and Bal. Analysis of the binding kinetics via SPR led to even lower dissociation constants of about 5 to 10 nM and indicated that part of the scFv form dimers.

Competition experiments with V3 peptide fragments narrowed the Epitope of scFv **P2** to the region $^{296}\text{STRPNN}(\text{Chi})\text{NTRKSIHI}^{309}$. A bivalent antibody construct of scFv **D26** (scFv-IgEAC1) also showed reactivity to the V3 glycopeptide and to gp120 isolates.

Besides SPR studies, saturation transfer difference (STD) NMR was used as a tool for interaction analysis of scFv **P2** with different V3 glycopeptides. Because of insufficient sensitivity at low peptide concentrations these experiments proved out to be borderline. The lowest determined K_D -values of proton groups were in the range of 2 μM . Although these results were not in agreement with the results obtained via SPR valuable conclusions concerning the location of the epitope could be made from the dependence of K_D -values from the length of V3 glycopeptides. Inclusion of K305 and S306 resulted in a significant decrease of the dissociation constant, indicating that these residues markedly contribute to the epitope. Protons of the $^{307}\text{IHI}^{309}$ -motif are apparently not markedly recognized by scFv **P2**. An epitope based on STD experiments with the V3 glycopeptide ($^{298}\text{RPNN}(\text{Chi})\text{NTRKS}^{306}$) by relative STD-percent values as well as by K_D values for individual proton groups was determined.

In all experiments none of the isolated clones showed a significant differentiation between the V3 peptide and the V3 glycopeptide. Nevertheless, because the gp120 isolates bear a complex type glycosylation at N301, the SPR-experiments revealed tolerance respective to the carbohydrate moiety. Isolated scFv bind to highly conserved residues in close proximity to the glycosylation site N301.

The scFv clones represent an optimal starting point for *in vitro* evolution. Furthermore these scFv could be part of new *retrovaccinology* approaches based on the preparatively well accessible V3 glycopeptides. The V3 glycopeptide selection strategy can also be used for a screening of HIV-1 positive patient libraries.

Summarizing this work, scFv specific for the V3 region of subtype B HIV-1 gp120 could be isolated by a simple and direct phage display approach. SPR experiments revealed binding of scFv **D26** and **P2** to the V3 glycopeptide as well as to gp120 isolated with thermodynamic dissociation constants of about 100 nM. A detailed epitope mapping occurred via STD NMR spectroscopy. Anti-V3 scFv are presented which bind to highly conserved residues of the $^{298}\text{RPNNNTRKS}^{304}$ region while tolerating a complex type glycosylation at N301.

6. Experimenteller Teil

6.1 Materialien und Chemikalien

6.1.1 Materialien

<i>Material</i>	<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Biacore Sensorchips	CM5, SA, NTA, CM5-SeriesS	Biacore
Dialyseeinheiten (3-12 mL)	Spectra/Por CE Float-A-Lyzer MWCO 100 kD	SpectrumLabs
Dialyseeinheiten (5-100 µL)	Slide-A-Lyzer MINI MWCO 3.5 kD	Pierce Biotechnology
Dialyseeinheiten (3-12 mL)	Slide-A-Lyzer MWCO 10 kD	Pierce Biotechnology
ELISA-Platten	Mikrolon 96ft und 384 ft	Greiner bio-one
Entsalzungseinheiten	<i>Zeba Desalting Columns</i>	Pierce Biotechnology
Immunoröhrchen	Maxisorb, Polystyrol	Nunc
Kieselgel	Kieselgel 60	Merck
RP-Säule (analytisch)	EC250/4 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule (präparativ)	VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
Spritzenfiltereinheiten	0.22 µm, <i>surfactant-free cellulose acetat</i> -Filtereinheiten	Nunc
Western-Blot Membran	Protran [®] Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell
Zentrifugalfiltereinheiten	SpinX tubes (0.22 µm Celluloseacetat)	CoStar Corp
Zentrifugalkonzentratoren	Amicon [®] Ultra (1-4 mL) MWCO 5 kD	Millipore
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 20 (5-20 mL) MWCO 100 kD	Sartorius

6.1.2 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>
ELISA-Reader	GENios	Tecan
Inkubationsschüttler	innova 4300	New Brunswick scientific
Laborautoklav	GLA 40, Fabr.-Nr. 940306	Gössner GmbH&Co
Lyophylle	Alpha 1-2	Christ
MALDI-TOF-MS	Biflex III	Bruker Daltonics
NMR 500 MHz	DRX500 (11.67 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz Probenkopf mit z-Gradient)	Bruker Biospin
NMR 700 MHz	Avance700 (16.35 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit z-Gradient)	Bruker Biospin
Parallelsyntheseroboter	ACT MOS Ω 496	Advanced Chem Tech
PCR	Mastercycler personal	Eppendorf
Peptidsynthesizer	Pioneer Peptide Synthesis System	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV	SG-Wasser-aufbereitung GmbH
RP-HPLC	BioCad Sprint Perfusions Chromatography System	PerSeptive Biosystems
SDS-PAGE Vorrichtung	Minigel-Apparatur LKB 2050 MIDGET	Hofer Scientific Instruments
SpeedVac	SC110	Savant
SPR	Biacore <i>J</i> , Biacore <i>T100</i>	Biacore
UV/Vis-Spektrometer	BioPhotometer	Eppendorf
Western Blot	Trans-Blot [®] SD Transfer Cell	BioRad
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge	Sorvall RC-5B	Du pont instruments
Zentrifugen	5084R, 5417C, 5417R	Eppendorf

6.1.3 Chemikalien

Die in der folgenden Auflistung nicht explizit aufgeführten Standardchemikalien und molekularbiologischen Reagenzien wurden von AcrosOrganics, AppliChem, Merck, PeqLab, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

<i>Hersteller</i>	<i>Chemikalie</i>
Acros Organics	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC-Grade), Triisopropylsilan (TIPS), Chitin
Applied Biosystems, Iris Biotech	Diisopropylethylamin (DIPEA), Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz, Piperidin 25 % (v/v) in DMF
Biacore	EDC-Lsg; NHS-Lsg; 10 mM Acetat-Puffer pH 4.0, 4.5 oder 5.0; 1.0 M Ethanolamin-HCl pH 8.5; BIAdesorb1 (0.5 % (w/v) SDS); BIAdesorb2 (50 mM Glycin pH 9.5); BIAdisinfektant solution; PDEA
Deutero	Deuteriumoxid, 99.9%
Fluka	Biotin, N-(+)-Biotinyl-6-aminohexansäure
Iris Biotech und Novabiochem	Aminosäuren, Fmoc- und Seitenketten-geschützt (siehe Abkürzungsverzeichnis für Schutzgruppen)
Pierce Biotechnology	sulfo-SMCC, EZ-Link NHS-SS-Biotin, Imject Maleimide Activated BSA
Proligo	Dimethylformamid
Qiagen	Ni-NTA Agarose
Roth	IPTG
Sigma-Aldrich	2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), Cyano-4-hydroxymethylsäure (CCA), Sinapinsäure (SA), Hefeextrakt, Trypton

6.1.4 Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Ermittlung der Sequenz von Phagemid-DNA ausgewählter Klone wurde mit dem ABI Big Dye Terminator Kit der Firma Applied Biosystems gearbeitet. Im Lieferumfang befand sich PCR-Puffer sowie eine Lösung aus Taq-Polymerase, dNTPs und markierten ddNTPs.

6.1.5 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen:

fdSeq: 5`- GAA TTT TCT GTA TGA GGT TTT -3`
LMB3: 5`- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3`

6.1.6 scFv-Phagemid Bibliothek

Im Lieferumfang der *Griffin.1*-Bibliothek,¹⁹⁴ welche vom Arbeitskreis Winter des MRC (*Medical Research Council*) der Universität Cambridge zur Verfügung gestellt wurde, waren folgende Materialien enthalten:

- synthetische scFv-Bibliothek (pHEN2 Phagemidvektor) im Format von *E. coli* TG1
- *E. coli*-Suppressor-Stamm TG1 zur Phagenpropagation
- *E. coli*-Nonsupressor-Stamm HB2151 zur Expression löslicher scFvs

Die M13K07 Helferphagen wurden von der Firma New England Biolabs GmbH bezogen.

6.1.7 Antikörper und Antikörperkonjugate

HIV-1 anti-V3 447-52D

Von dem monoklonalen Antikörper **447-52D** (IgG3, λ -Kette) wurde 1 mL Kulturüberstand von humanen EBV transformierten Heteromyeloma SHM-D33-Zellen (c = 21.6 μ g/mL) durch das NIH AIDS Research and Reference Reagent Program erhalten (cat# 4030, Dr. Susan Zolla Pazner).²⁹

Anti-myc

Zur Detektion der löslichen scFvs auf PVDF-Membranen wurde monoklonaler Anti-*myc*-Antikörper (Maus) der Firma Invitrogen eingesetzt. Dieser bindet an Proteine mit einem *myc*-Epitop, wobei er folgende Sequenz erkennt: EQKLISEEDL.

Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat

Als sekundärer Antikörper wurde ein HRP-Konjugat von Anti-Maus-IgG (γ -Kette, Ziege) der Firma Sigma-Aldrich verwendet.

HRP/Anti-M13 monoklonal

Von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Inc. wurde der HRP-konjugierte Anti-M13 Antikörper eingesetzt, welcher spezifisch an das pVIII-Hüllprotein der Phagen bindet.

Anti-Human IgG (Fc spezifisch) Peroxidasekonjugat

Zur Detektion von **447-52D** in ELISA-Studien wurde Fc-spezifisches Anti-Human-IgG-Peroxidasekonjugat der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt.

6.1.8 Proteine und Proteinkonjugate

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
BSA Albumin Fraktion V	Roth
HIV-1 Bal gp120 (rekombinant, HEK293-Zellen)	NIH AIDS Research and Reference Reagent program(Cat# 4961) ²⁹
HIV-1 IIIB gp120 (rekombinant, CHO-Zellen)	ImmunoDiagnostics, Inc. (Woburn, USA) (Cat# 1041)
HIV-1 SF162 gp120 (rekombinant, CHO-Zellen)	NIH AIDS Research and Reference Reagent program(Cat# 7363) ²⁹
humanes sCD4 (rekombinant, CHO-Zellen)	Progenics Pharmaceuticals, Tarrytown, New York, USA Cat# PRO1008-1
Inject [®] -Maleimide activated BSA	Pierce Biotechnology
Streptavidin	Sigma-Aldrich
Streptavidin-Fe ₂ O ₃ -Partikel (Suspension 0.8-1.2 mg/mL)	Sigma-Aldrich
Streptavidin-POD Konjugat	Sigma-Aldrich

V3-IgYΔC1: Im Rahmen eines Schwerpunktpraktikums von Dorothea Piper im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bredehorst am Institut für Biochemie und Molekularbiologie (Universität Hamburg) wurde unter Anleitung von Dr. E. Spillner ein Proteinkonstrukt entwickelt, welches aus einem IgYΔC1 Antikörperfragment fusioniert an eine erweiterte Subtyp B V3-Loop besteht (V3-IgYΔC1).¹⁷⁴ Die V3-Sequenz dieses Konstrukts ist ²⁹¹SVEIQCTRPNNTRKSIHIGPGRAFYATGNIIGDIRQAHQCIS. Die Expression erfolgte in HEK293.

scFvD26-IgEΔC1: Molekularbiologische Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bredehorst (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg) führten unter Anleitung von Herrn Dr. E. Spillner zur Darstellung eines in HEK293 exprimierten Konstruktes aus scFv **D26** und IgEΔC1.¹⁷⁴ Die Sequenz von scFv D26 ist im Anhang dieser Arbeit vollständig wiedergegeben.

6.1.9 Puffer und Lösungen

<i>Puffer/Lösung</i>	<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>
ABTS-Detektionslösung (für HRP, POD)	14 mL 3.3 mg 26 µL	Citratpuffer (pH 4.0) ABTS H ₂ O ₂
Amp-Stocklösung	20 µg	Ampicillin-Natriumsalz/mL in 70%igem Ethanol
BCIP Citratpuffer	0.5% (w/v) 50 mM	in DMF Zitronensäure, pH 4.0
Coomassie-Färbelösung	0.1 % (w/v) 1 % (v/v) 40 % (v/v)	Coomassie-Brilliant-Blau R-250 Eisessig MeOH
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v)	Eisessig in ddH ₂ O
D ₂ O-PBS		analog zu PBS, D ₂ O (99.9%)
Detektionspuffer (für AP)	0.1 M 0.1 M 0.1 M	Tris, pH 9.5 MgCl ₂ · 6 H ₂ O NaCl
Glc-Stocklösung	20% (w/v)	Glucose in ddH ₂ O, steril filtriert
Imidazol-Elutionslösung	300 mM	Imidazol in PBS
Kan-Stocklösung	20 µg	Kanamycinsulfat /mL ddH ₂ O
MPBS	2%,4% ,5% (w/v)	Milchpulver in PBS
NBT-Lsg	100 mg	NBT in 100 mL AP Detektionspuffer
PAGE-Probenpuffer (6x) (reduzierend)	375 mM 40 % (v/v) 8 % (w/v) 0.006 % (w/v) 100 mM	Tris-HCl, pH 6.8 Glycerin SDS Bromphenolblau DTT
PAGE-Sammelgelpuffer (4x)	0.5 M 0.4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6.8 SDS
PAGE-Tankpuffer (5x)	0.125 M 0.96 M 0.5 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8.3 Glycin SDS
PAGE-Trenngelpuffer (4x)	1.5 M 0.4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8.8 SDS

PBS, pH 7.4	120 mM 10 mM	NaCl (6.96 g) Natriumphosphat (Na ₂ HPO ₄ (5.68 g) NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (1.38 g)
PEG/NaCl	20 % (w/v) 2.5 M	Polyethylenglykol-6000 NaCl
TS-Puffer	0.2 M 0.5 M	Tris/HCl, pH 8.0 Sucrose
¼TS-Puffer	25 %	TS (v/v) in ddH ₂ O
Tris-HCl, pH 7.4	1.0 M	Tris
TPBS	0.1 % (v/v)	Tween 20 in PBS
Western-Blot-Transferpuffer	25 mM 19.2 mM 200 mL 800 mL	Tris/HCl Glycin MeOH ddH ₂ O, pH 8.3

6.1.10 Standards

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
un/prestained SDS-PAGE Broad Range Standard	BioRad
PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas
EI-tuning Mix G2421A	Hewlett Packard
ProteoMass™ MALDI Calibration Kit	Sigma-Aldrich

6.1.11 Zellkulturmedien

<i>Medium</i>	<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>
2YT	16 g/L 10 g/L 5 g/L	Trypton Hefeextrakt NaCl
2YT-A	zusätzlich 100 µg/mL	Amp
2YT-AG	zusätzlich 100 µg/mL und 1 % (w/v)	Amp Glc
2YT-AK	zusätzlich 100 µg/mL und 25 µg/mL	Amp Kan
TYE-AG (Agaroseplatten)	10 g/L 5 g/L 8 g/L 15 g 1 % (w/v) 100 µg/mL	Trypton Hefeextrakt NaCl Select Agar Glc Amp

6.2 Darstellung von Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH

6.2.1 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-4-O-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-1,3,6-tri-O-acetyl-α-D-glucopyranose (**a2**)

Eine Lösung aus 330 mL Ac₂O und 26.5 mL konz. H₂SO₄ wurde auf 54 °C erhitzt und unter starker KPG-Rührung 40 g (entspricht 95 mmol Dimereinheiten) fein gemahlene Chitin (**a1**) in kleinen Portionen zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wurde das Gemisch auf RT abgekühlt und unter Einwirkung von Ultraschall über 20 h gerührt. Hierbei überschreitet die Temperatur nicht 34 °C. Die Lösung wurde vorsichtig in 600 mL Eiswasser gegeben, mit 200 g NaAc versetzt und für eine Stunde gerührt. Nach Extraktion mit CHCl₃ wurde die organische Phase mit ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert. Anschließend wurde mehrfach mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei maximal 30 °C unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Die Auftrennung des Oligomerengemisches erfolgte unter Einsatz einer Mitteldruckpumpe über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Laufmittel: CHCl₃/MeOH 100:1).

Ausbeute:

Es wurden 3.1 g (4.6 mmol) Chitobioseoctaacetat (**a2**) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 5% bezogen auf die Stoffmenge an eingesetzten Dimereinheiten des Chitins.

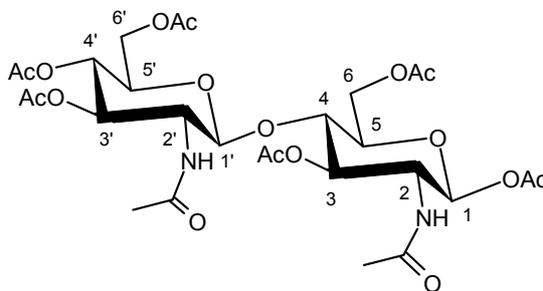
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₈H₄₀N₂O₁₇; MW = 676.64 g/mol

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH (9:1)): 0.42

MALDI-TOF-MS: [M+H]⁺ m/z = 677.6; [M+Na]⁺ m/z = 699.4



¹H-NMR (700 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]:

7.99 (d, 1H, ³J_{NH,2'} = 9.1 Hz, NH'), 7.92 (d, 1H, ³J_{NH,2} = 9.3 Hz, NH), 5.84 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.4 Hz, H1), 5.14 (dd, 1H, ³J_{3',2'} = 9.9 Hz, ³J_{3',4'} = 9.9 Hz, H3'), 5.08 (dd, 1H, ³J_{3,2} = 10.9

Hz, ${}^3J_{3,4} = 9.0$ Hz, **H3**), 4.84 (dd, 1H, ${}^3J_{4',3'} = 9.9$ Hz, ${}^3J_{4',5'} = 9.9$ Hz, **H4'**), 4.67 (d, 1H, ${}^3J_{1',2'} = 8.4$ Hz, **H1'**), 4.36 (dd, 1H, ${}^3J_{6a,5} = 8.1$ Hz, ${}^2J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, **H6a**), 4.31 (dd, 1H, ${}^3J_{6'a,5'} = 4.0$ Hz, ${}^2J_{6'a,6'b} = 12.3$ Hz, **H6a'**), 4.18-4.13 (m, 1H, **H2**), 4.03 (dd, 1H, ${}^3J_{6b,5} = 4.0$ Hz, ${}^2J_{6b,6a} = 12.3$ Hz, **H6b**), 3.94 (dd, 1H, ${}^3J_{6b',5'} = 1.8$ Hz, ${}^2J_{6b',6a'} = 12.3$ Hz, **H6b'**), 3.91-3.81 (m, 3H, **H5**, **H4**, **H5'**), 3.59-3.62 (m, **H2**), 2.14 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 1.99 (s, 3H, COCH₃), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 1.93 (s, 3H, COCH₃), 1.88 (s, 3H, COCH₃), 1.77 (s, 3H, NHCOCH₃'), 1.73 (s, 3H, NHCOCH₃).

6.2.2 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-4-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose (**a3**)

Es wurden 2.0 g (3.0 mmol) Chitobioseoctaacetat (**a2**) in 75 mL abs. MeOH gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1%iger Natriummethanolat-Lsg. auf einen Wert von 9 eingestellt und das Gemisch bei RT gerührt. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert der Lösung korrigiert. Nach einer Reaktionszeit von 18 h wurde durch Zugabe von Trockeneis neutralisiert (pH 5-7) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute:

Es wurden 1.1 g (2.5 mmol) Produkt als α/β-Enantiomergemisch (4:1) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 84%.

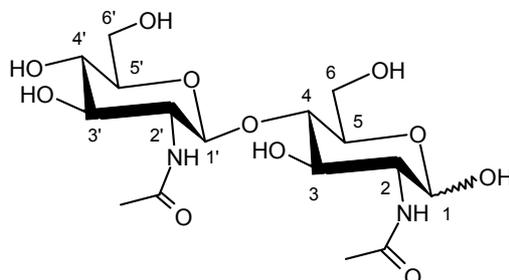
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Summenformel: C₁₆H₂₈N₂O₁₁; MW = 424.42 g/mol

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH (1:1)): 0.34

MALDI-TOF-MS: [M+H⁺] m/z = 425.4; [M+Na]⁺ m/z = 447.2



¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]:

5.10 (d, 1H, ${}^3J_{1,2} = 3.3$ Hz, **H1β**), 4.88 (d, 1H, ${}^3J_{1',2'} = 2.5$ Hz, **H1'**), 4.32 (d, 1H, ${}^3J_{1,2} = 8.3$ Hz, **H1α**), 3.93 (d, 1H, ${}^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, **H6b**), 3.91-3.92 (m, 1H, **H6'b**), 3.75-3.77 (m,

1H, H2), 3.76 (d, 1H, $^2J_{6a,6b}=12.2$ Hz, H6a), 3.75-3.73 (m, 2H, H2', H6a'), 3.62-3.40 (m, 6H, H3, H3', H4, H4', H5, H5').

6.2.3 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-4-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosylamin (a4)

Es wurden 1.0 g (2.5 mmol) Chitobiose (a3) in 40 mL ges. NH_4HCO_3 -Lsg. gelöst und bei 50 °C gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 36 h wurde das braune Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingeeengt und anschließend gefriergetrocknet. Die Gefrierdrying wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt.

Ausbeute:

Es wurden 0.9 g (2.2 mmol) Produkt erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 88%.

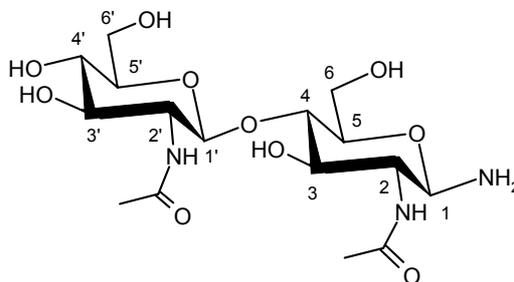
Charakterisierung:

bräunlicher Feststoff

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{10}$; MW = 423.42 g/mol

R_f -Wert (EtOAc / MeOH / H_2O (4:3:2)): 0.55

MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 424.3; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z = 446.1



Eine Charakterisierung per NMR wurde nicht vorgenommen.

6.2.4 Synthese von O^1 -*t*Butyl- N^2 -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N^4 -[3,6-di-O-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-4-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-asparagin (a5)

In N_2 -Atmosphäre wurden 0.9 g (2.0 mmol, 0.9 eq) Fmoc-Asp-*Ot*Bu, 2.1 g (2.6 mmol, 1.2 eq) TBTU und 445 μL (336 mg, 2.6 mmol, 1.2 eq) DIPEA in 10 mL wasserfreien DMF gelöst. Diese Lösung wurde langsam bei -15 °C (Eis/Kochsalzbad) zu 1.0 g (2.2 mmol, 1 eq) Chitobiosylamin (a4), gelöst in 15 mL trockenem DMF, getropft und 3 h bei -15 °C gerührt (DC-Kontrolle EtOAc/MeOH/ H_2O (4:3:2), R_f = 0.8). Ein Großteil des Lösungsmittels wurde im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt und der Rückstand mit

einem Gemisch aus 50 mL abs. Pyridin und 40 mL Ac₂O versetzt. Darauffolgend wurde über Nacht bei RT gerührt, das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet und dreimal mit Toluol kodestilliert. Es folgte die säulenchromatographische Auftrennung des Rohproduktes (Laufmittel CHCl₃/MeOH 10:1 bzw. 5:1 nach Elution von etwa einem Säulenvolumen Lösungsmittel).

Ausbeute:

Es wurden 1.1 g (1.0 mmol) Produkt erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 45%.

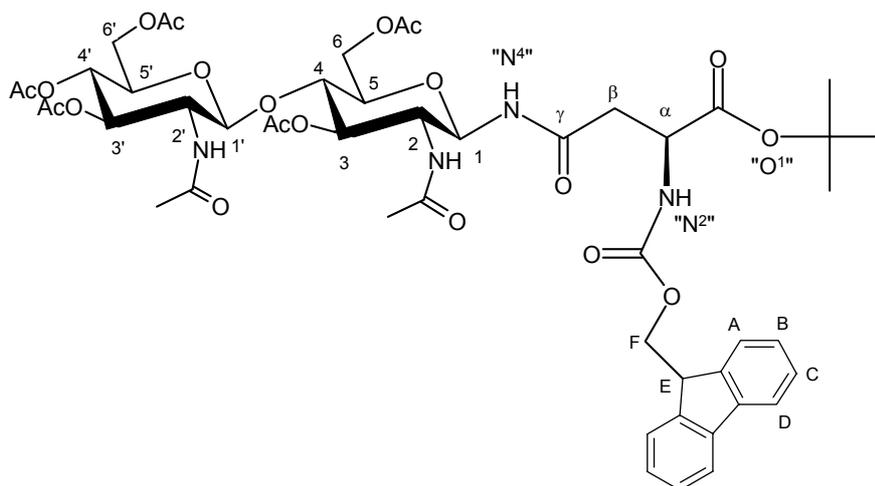
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Summenformel: C₄₉H₆₂N₄O₂₀; MW = 1027.01 g/mol

R_F-Wert (CHCl₃/ MeOH (9:1)): 0.51

MALDI-TOF-MS: [M+H]⁺ m/z = 1028.1; [M+Na]⁺ m/z = 1050.0



¹H-NMR (700 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]:

8.51 (d, 1H, ³J_{NH,1} = 9.2 Hz, NH_α), 7.99 (d, 1H, ³J_{NHAc',2'} = 9.0 Hz, NHAc'), 7.91-7.88 (m, 2H, HA/HD), 7.84 (d, 1H, ³J_{NHAc,2} = 9.2 Hz, NHAc), 7.72-7.70 (m, 2H, HA/HD), 7.55 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, NH_γ), 7.44-7.40 (m, 2H, HB/HC), 7.35-7.31 (m, 2H, HB/HC), 5.15 (dd, 1H, ³J_{H3',H2'} = 9.8 Hz, ³J_{H3',H4'} = 9.8 Hz, H3'), 5.06 (dd, 1H, ³J_{H1,H2} = 9.4 Hz, ³J_{H1,γ-NH} = 9.4 Hz, H1), 4.95 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 9.4 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.4 Hz, H3), 4.81 (dd, 1H, ³J_{H4',H5'} = 9.8 Hz, H4'), 4.67 (d, 1H, ³J_{H1',H2'} = 8.3 Hz, H1'), 4.36-4.39 (m, 1H, HF), 3.45-3.36 (m, 1H, HE), 4.30 (m, 1H, H1_α), 4.27 (m, 1H, H6a), 4.23 (t, 1H, H6b'), 3.96 (dd, 1H, ³J_{5,6a} = 5.7 Hz, ²J_{6a,6b} = 11.8 Hz, H6a), 3.91 (d, 1H, ³J = 10.9 Hz, H6a'), 3.81 (m, 2H, H2', H2), 3.70 (dd, 1H, ³J_{4,5} = 9.4 Hz, H4), 3.55 (m, 2H, H5', H5), 2.62 (dd, 1H, ²J_{Hβ,Hβ} = 6.2 Hz, ³J_{Hβ,Hα} = 15.8 Hz, Hβ), 2.41 (dd, 1H, ²J_{Hβ',Hβ} = 6.4 Hz, ³J_{Hβ',Hα} = 15.8 Hz, Hβ'), 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.04

(s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 1.96 (s, 3H, COCH₃), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.91 (s, 3H, COCH₃), 1.75 (s, 3H, NHCOCH₃'), 1.71 (s, 3 H, NHCOCH₃).

6.2.5 Synthese von *N*²-(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*N*⁴-[3,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-asparagin (**a6**)

Es wurden 1.1 g (1.0 mmol) **a5** in 50 mL TFA/H₂O (19:1) gelöst und eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet und mehrfach mit Toluol codestilliert.

Ausbeute:

Es wurden 0.8 g (0.8 mmol) eines farblosen Feststoffes erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 82%.

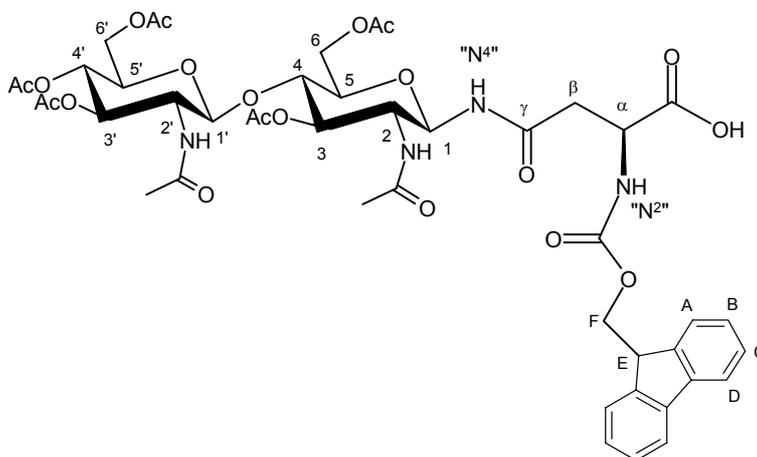
Charakterisierung:

farbloser Feststoff

Summenformel: C₄₅H₅₄N₄O₂₀; MW = 970.90 g/mol

R_F-Wert (CHCl₃ / MeOH (5:1)): 0.60

MALDI-TOF-MS: [M+H]⁺ m/z = 971.6



¹H-NMR (700 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]:

8.51 (d, 1H, ³J_{α-NH,H1} = 8.7 Hz, NHα), 8.00 (d, 1H, ³J_{NHAc',H2'} = 8.8 Hz, NHAc'), 7.89-7.93 (d, 2H, HA/HD), 7.84 (d, 1H, ³J_{NHAc,H2} = 9.3 Hz, NHAc), 7.74-7.72 (m, 2H, HA/HD), 7.51 (d, 1H, ³J_{NH,H1} = 8.6 Hz, NHγ), 7.43-7.40 (m, 2H, HB/HC), 7.32-7.30 (m, 2H, HB/HC), 5.14 (dd, 1H, ³J_{H3',H2'} = 10.2 Hz, ³J_{H3',H4'} = 10.2 Hz, H3'), 5.07 (dd, 1H, ³J_{H1,H2} = 9.4 Hz, ³J_{H1,NHγ} = 9.4 Hz, H1), 4.96 (dd, 1H, ³J_{H3,H2} = 9.4 Hz, ³J_{H3,H4} = 9.4 Hz, H3), 4.82 (dd, 1H, ³J_{H4',H5} = 9.8 Hz, H4'), 4.67 (d, 1H, ³J_{H1',H2'} = 8.7 Hz, H1'), 4.35-4.38 (m, 1H, HF), 4.30 (m, 1H, Hα), 4.27 (m, 1H, H6a), 4.23 (t, 1H, ³J = 6.8 Hz, H6b'), 3.97 (dd, 1H, ²J = 5.5 Hz,

$^3J= 12.2$ Hz, **H6a**), 3.91 (d, 1H, $^3J= 11.8$ Hz, **H6'a**), 3.81 (m, 2H, **H2'**, **H2**), 3.70 (m, 1H, **H4**), 2.64 (dd, 1H, $^2J_{\text{H}\beta, \text{H}\beta'}= 5.5$ Hz, $^3J_{\text{H}\beta, \text{H}\alpha}= 16.6$ Hz, **H β**), 2.48 (m, 1H, **H β'**), 2.05 (s, 3H, **COCH $_3$**), 2.02 (s, 3H, **COCH $_3$**), 1.96 (s, 3H, **COCH $_3$**), 1.95 (s, 3H, **COCH $_3$**), 1.91 (s, 3H, **COCH $_3$**), 1.75 (s, 3H, **NHCOCH $_3$ '**), 1.70 (s, 3H, **NHCOCH $_3$**).

6.3 Peptid- und Glycopeptidsynthese

6.3.1 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die Synthesen aller Peptide wurden am Parallelsyntheseroboter ACT MOS 496Ω nach dem *batch*-Verfahren oder am Peptidsynthesizer *Pioneer Peptide Synthesis System* nach dem *continuous-flow* Verfahren durchgeführt. Die dabei verwendeten Prozeduren sind im Anhang detailliert wiedergegeben. Fmoc-PAL-PEG-PS Harz einer Belegung von 0.17-0.22 μmol Aminogruppen pro mg Harz wurde in eine Kammer des Reaktionsblockes gegeben. Das Harz wurde in Isopropanol und DMF gequollen. Die Entschützung der Fmoc-Gruppe erfolgte mit Piperidin (1:4 in DMF) und die Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen (*capping*) mit Ac₂O (1:9 in DMF). Waschschriffe entsprachen dem Spülen der Kammer mit DMF. Ein Kupplungszyklus beinhaltete die Zugabe von dreimal je vier Äquivalenten der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure (0.5 M in DMF), fünf Äquivalenten TBTU (0.5 M in DMF) sowie von fünf Äquivalenten DIPEA (1 M in DMF) (1:4:5:5). Die Kupplungszeiten für den ersten Zyklus betragen jeweils dreimal 90 min, für die der weiteren Aminosäurekupplungen 30, 60 und 90 min. Dem letzten Zyklus folgte ein Waschschriff mit DCM und Isopropanol.

Die Entschützung der letzten Fmoc-Gruppe der Peptide wurde bei einigen Ansätzen manuell durchgeführt, um eine Aussage über die Größenordnung der Ausbeute machen zu können. Deacetylierung von Glycopeptiden, Biotinylierung und Abspaltung vom Harz wurden von Hand vorgenommen.

6.3.2 Kupplung von Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH

Die Kupplung von Fmoc-Asn(Ac₅Chi)-OH (**a6**) erfolgte manuell im Reaktionsblock des Parallelsyntheseroboters. Dazu wurden 1.2 Äq des Bausteines und jeweils 1.5 Äq TBTU und DIPEA in 800 μL DMF gelöst (1:1.2:1.5:1.5) und per Hand in die Kammer des Reaktionsblockes überführt. Der Syntheseroboter wurde so programmiert, dass die Synthese für diesen Zugabeschritt pausierte und nach der Zugabe für 8 h schüttelte, bevor die restlichen Aminosäuren vollautomatisch angefügt wurden. Mit dieser Verfahrensweise sollte unter anderem ein Reagenzienverlust durch Totvolumina vermieden werden.

Im Falle des *continuous flow* Methode wurde das Harz dem *Peptide Synthesizer* entnommen, die Kupplung in analoger Weise manuell durchgeführt und im Anschluss das Harz wieder in den Reaktionsraum des Gerätes überführt.

6.3.3 Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Methylfluoren-Monitoring

Nach Beendigung der automatisierten Peptidsynthese wurde bei Bedarf, die letzte Fmoc-Gruppe manuell abgespalten, um die bei der Synthese erzielten Ausbeuten mittels photometrischen Nachweises des Methylfluorens zu bestimmen.

Das Harz wurde nach der Synthese mit DMF/DCM (1:1) aus dem Reaktionsblock in eine Glasfritte überführt, im Wasserstrahlpumpen-Vakuum getrocknet, zweimal mit je 2 mL Pip/DMF (1:4) versetzt und jeweils für 10 min geschüttelt. Das Harz wurde abschließend 4x mit je 4 mL DMF gewaschen und die vereinigten Abspalllösungen in einem mit Alufolie umwickeltem Kolben aufgefangen. Es wurden je 100 μL dieser Lösung mit 1900 μL DMF verdünnt und photometrisch bei 301 nm im UV/Vis-Spektrometer vermessen. Die Stoffmenge n_{Fmoc} [mol] an abgespaltener Fmoc-Gruppen berechnet sich durch Einsetzen der OD-Werte in das Lambert-Beer'sche Gesetz:

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

mit: $\varepsilon_{301} = 7.95 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (molarer Extinktionskoeffizient)
 $V = 0.02 \text{ L}$ (Gesamtvolumen der vereinigten Abspalllösungen)
 $d = 1 \text{ cm}$ (Schichtdicke der Glasküvette)
 $F = 20$ (Verdünnungsfaktor)

Die Ausbeute an Rohprodukt ergibt sich aus dem Quotienten von n_{Fmoc} und der vor der Peptidsynthese eingewogenen Harz-Stoffmenge.

6.3.4 Biotinylierung der Peptide am Harz

Die Peptide wurden am Harz zweimal für 4 h bei RT in DMF mit einem vierfachen Überschuss an *N*-(+)-Biotinyl-6-aminohexansäure unter TBTU/DIPEA-Aktivierung umgesetzt (1:4:5:5). Bei Glycopeptiden erfolgte dieser Schritt, vor der Deacetylierung des Kohlenhydratanteils.

6.3.5 Deacetylierung der Glycopeptide am Harz

Die Deacetylierung der Kohlenhydratanteile erfolgte mit Hydrazin-Hydrat/MeOH (1:5, v/v) über mindestens 6 h bei RT nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe und eventueller Biotinylierung.

6.3.6 Abspaltung der Peptide vom Harz

Zur Abspaltung wurde das Harz zweimal für jeweils 45 min mit je 3 mL TFA/TIPS/H₂O (95:5:2; v/v) versetzt und geschüttelt. Das Harz wurde 4x mit je 2 mL TFA nachgewaschen und die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne

eingengt. Der Rückstand wurde in 10 mL ddH₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Lagerung des so erhaltenen Rohproduktes erfolgte im Gefrierschrank bei -20 °C.

6.3.7 Produktaufreinigung mittels RP-HPLC

Für die Aufreinigung des Rohproduktes wurde eine präparative Säule (Ø 21 mm, *reversed phase* C₁₈) verwendet. Es wurden jeweils 30 mg des Rohproduktes eingewogen und in einem Milliliter H₂O/TFA (100:0.1; v/v) oder H₂O/MeCN/TFA (90:10:0.1;v/v) im Ultraschallbad gelöst. Die trübe Suspension wurde auf zwei Zentrifugalfilter (0.22 µm) verteilt und für 4 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat konnte dann in die HPLC injiziert und je nach Länge des Peptids mit einer der zwei Methoden aufgereinigt werden.

Methode I (Peptide mit M < 1600)

- i) für 2.5 CV von 100% A nach A/B 83:17
- ii) für 0.25 CV von A/B 87:13 nach A/B 77:23
- iii) für 0.75 CV von A/B 73:27 nach A/B 0:100
- iv) für 1 CV 100% B

Methode II (Peptide mit M > 1600)

- i) für 1.0 CV von A/B 90:10 nach A/B 79:21
- ii) für 2.5 CV von A/B 79:21 nach A/B 77:23
- iii) für 1.5 CV von A/B 77:23 nach A/B 0:100
- iv) für 1 CV 100% B

Laufmittel A:	ddH ₂ O/MeCN/TFA (95:5:0.1)
Laufmittel B:	MeCN/ddH ₂ O/TFA (95:5:0.1)
Flussrate:	20 mL/min
Detektion:	photometrisch bei λ = 215 nm

Wenn nötig wurden die angegebenen Gradienten geringfügig verändert. Die Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF-MS auf die Anwesenheit des Produktes überprüft, gegebenenfalls vereinigt und das MeCN am Rotationsverdampfer destillativ entfernt. Im Anschluss wurden die Peptide gefriergetrocknet und bei -20 °C gelagert. In teilweise notwendigen weiteren Analyse- und Aufreinigungsschritten kam eine analytische Säule (Ø 4 mm, *reversed Phase* C₁₈) mit einem dem obigen entsprechenden Gradientenprogramm zum Einsatz (Flussrate 1 mL/min).

6.3.8 Darstellung von BSA-Peptid-Konjugaten

Die Konjugation der Peptide an BSA erfolgte über ein C-terminales Cystein des Peptids an Maleimid-aktiviertes BSA. Dazu wurden je 2.5 – 3.0 mg des Peptids zusammen mit 2 mg Imject[®] Maleimide *activated* BSA (Pierce Biotechnology) in 200 µL ddH₂O gelöst und bei für 3 h schwach geschüttelt. Teilweise wurden noch 200 µL PBS hinzugegeben, um das

voraktivierte BSA quantitativ in das Reaktionsgefäß zu überführen. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit 600 µL PBS verdünnt. Die Lagerung der Konjugate erfolgte bei -20 °C.

Zur Charakterisierung der Konjugate mit MALDI-TOF-MS wurden 10 µL entnommen, in ddH₂O dialysiert und mit DHB als Matrix vermessen. Es konnte bei keinem der Konjugate ein einheitliches Produkt detektiert werden. Anstelle dessen lag ein sich über den Molmassenbereich von 15 kD erstreckendes Produktgemisch vor.

6.3.9 Tabellarische Auflistung von Daten zu den Peptidsynthesen

<i>pI</i>	SVEINSTRPNNNTRKSIHI
Molmasse	2177.17 g/mol
Summenformel	C ₉₁ H ₁₅₆ N ₃₂ O ₃₀
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	27.2 mg (25%)
MALDI-TOF (m/z)	2179.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2

<i>pI</i> <i>S291C</i>	CVEINSTRPNNNTRKSIHI
Molmasse	2194.14 g/mol
Summenformel	C ₉₀ H ₁₅₅ N ₃₃ O ₂₉ S
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	19.7 mg (18%)
MALDI-TOF (m/z)	2194.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR

<i>pIc</i>	SVEINSTRPNN(Chi)NTRKSIHI
Molmasse (exakt)	2584.32 g/mol
Summenformel	C ₁₀₇ H ₁₈₁ N ₃₅ O ₄₀
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	12.9 mg (10%)
MALDI-TOF (m/z)	2586.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2

<i>p1cS291c</i>	CVEINSTRPNN(Chi)NTRKSIHI
Molmasse (exakt)	2600.30 g/mol
Summenformel	C ₁₀₆ H ₁₈₁ N ₃₅ O ₃₉ S
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	20.8 mg (16%)
MALDI-TOF (m/z)	2601.6 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
<i>p1cB</i>	Biotin-SVEINSTRPNN(Chi)NTRKSIHI
Molmasse (exakt)	2972.42 g/mol
Summenformel	C ₁₂₂ H ₂₀₅ N ₃₇ O ₄₃ S ₃
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Biotinylierung am Harz	1x 82 µmol Sulfosuccinimidyl-[2-(biotinamido)-ethyl-1]3-dithiopropionat (Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce Biotechnology)) in 2 mL PBS, 6 h bei 4 °C dann RT 8 h
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	11.9 mg (8%)
MALDI-TOF (m/z)	2973.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
<i>p2c</i>	STRPNN(Chi)NTRKSIHI
Molmasse (exakt)	2042.05 g/mol
Summenformel	C ₈₃ H ₁₄₃ N ₂₉ O ₃₁
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	17.4 mg (17%)
MALDI-TOF (m/z)	2043.4 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2

<i>p3cB</i>	Biotin- INSTRPNN(Chi)NTRKSI
Molmasse (exakt)	2358.20 g/mol
Summenformel	C ₉₇ H ₁₆₇ N ₃₁ O ₃₅ S
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Biotinylierung am Harz	2x 3 Äq <i>N</i> (+)-Biotinyl-6-aminohexansäure unter TBTU/DIPEA Aktivierung (1:4:5:5) in DMF
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	15.3 mg (13%)
MALDI-TOF (m/z)	2359.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
<i>p4c</i>	RPNN(Chi)NTRKS
Molmasse (exakt)	1490.76 g/mol
Summenformel	C ₅₉ H ₁₀₄ N ₂₁ O ₂₄
Ansatzgröße (Harz)	60 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	17.9 mg (20%)
MALDI-TOF (m/z)	1491.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2
<i>p5c</i>	RPNN(Chi)NTR
Molmasse (exakt)	1275.63 g/mol
Summenformel	C ₅₀ H ₈₇ N ₁₈ O ₂₁
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: manuell; 90, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	16.1 mg (21%)
MALDI-TOF (m/z)	1276.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2

<i>p5c</i>	CGGGSGGGGGSGGTRPNN(Chi)NTR
Molmasse (exakt)	2166.93 g/mol
Summenformel	C ₈₀ H ₁₃₄ N ₃₂ O ₃₁₇ S
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	14.1 mg (13%)
MALDI-TOF (m/z)	2168.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2
<i>p5cB</i>	Biotin-GGGSGGGGGSGGTRPNN(Chi)NTR
Molmasse (exakt)	2489.12 g/mol
Summenformel	C ₉₆ H ₁₅₉ N ₃₅ O ₄₁ S
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 180 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: <i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Biotinylierung am Harz	2x 3 Äq N-(+)-Biotinyl-6-aminohexansäure unter TBTU/DIPEA Aktivierung (1:4:5:5) in DMF
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	9.9 mg (8%)
MALDI-TOF (m/z)	2490.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	siehe Kapitel 6.5.2
<i>p6c</i>	NN(Chi)NTR
Molmasse (exakt)	1022.46 g/mol
Summenformel	C ₃₈ H ₆₆ N ₁₄ O ₁₉
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301 manuell, 90, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 300 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: manuell; 90, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	12.8 mg (25%)
MALDI-TOF (m/z)	1023 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR

p7	SVEINSTR
Molmasse (exakt)	903.48 g/mol
Summenformel	C ₃₆ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₄
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	5.4 mg (20%)
MALDI-TOF (m/z)	904.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
p8	KSIHI
Molmasse (exakt)	595.39 g/mol
Summenformel	C ₂₈ H ₅₁ N ₈ O ₆
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	Manuell nach 6.3.6
Ausbeute	5.2 mg (29%)
MALDI-TOF (m/z)	595.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
p9	KGGGGGSVEINST
Molmasse (exakt)	1160.59 g/mol
Summenformel	C ₄₇ H ₈₂ N ₁₅ O ₁₉
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	4.5 mg (13 %)
MALDI-TOF (m/z)	1161.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
p10	KGGGGGTRPNN(Chi)NTR
Molmasse (exakt)	1821.96 g/mol
Summenformel	C ₆₀ H ₁₂₃ N ₂₇ O ₂₉
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	bis N301 manuell; 90, 90 min Fmoc-Asn(Ac ₅ Chi)-OH: manuell; 180, 240 min (1:1.2:1.5:1.5) ab N302: manuell; 60, 60 min (1:4:5:5)
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	16.3 mg (18%)
MALDI-TOF (m/z)	1823.1 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR

<i>pI1</i>	KGGGGGTRPNNTR
Molmasse (exakt)	1383.71 g/mol
Summenformel	C ₅₄ H ₉₅ N ₂₄ O ₁₉
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	3.7 mg (9%)
MALDI-TOF (m/z)	1384.8 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
<i>pI2</i>	KGGGGGGTRKSIHI
Molmasse (exakt)	1322.77 g/mol
Summenformel	C ₅₇ H ₁₀₃ N ₂₁ O ₁₆
Ansatzgröße (Harz)	50 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>continuous flow</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	11.2 mg (17%)
MALDI-TOF (m/z)	1323.8 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
<i>pG</i>	KGGGGGG
Molmasse (exakt)	487.26 g/mol
Summenformel	C ₁₉ H ₃₅ N ₈ O ₇
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	3.2 mg (22%)
MALDI-TOF (m/z)	488.4 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR
<i>pR</i>	GIENDRTNGVTAKE
Molmasse (exakt)	1500.74 g/mol
Summenformel	C ₆₁ H ₁₀₄ N ₂₀ O ₂₄
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	9.9 mg (22%)
MALDI-TOF (m/z)	1501.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR

<i>pR_{GIC}</i>	CIENDRTNGVTAKE
Molmasse (exakt)	1547.74 g/mol
Summenformel	C ₆₁ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₂₄ S
Ansatzgröße (Harz)	30 µmol
Kupplungslösung	Harz-NH ₂ / Aminosäure / TBTU / DIPEA (1:4:5:5)
Kupplung	<i>batch</i> -Verfahren; 30, 60, 90 min
Abspaltung	manuell nach 6.3.6
Ausbeute	7.0 mg (15 %)
MALDI-TOF (m/z)	1547.9 [M+H] ⁺ (DHB)
NMR	keine Charakterisierung per NMR

6.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Messungen wurden am BRUKER Biflex III Gerät im Positivionenmodus mit einer Unterdrückung des Bereiches bis $m/z = 600$ durchgeführt. Die Desorbition/Ionisation erfolgte mit einem N₂-LASER ($\lambda = 337$ nm). Zur externen Kalibrierung bei Vermessung von Peptidproben im Reflektormodus diente ein Standard mit Molekulargewichten im Bereich zwischen 118 und 2721 g/mol (ES Tuning Mix, Hewlett Packard). Für die Vermessung von Proteinproben wurde extern mit dem ProteoMassTM Protein MALDI Kalibrierungsset (Sigma-Aldrich) im Molmassenbereich von 12-67 kD kalibriert und kein Reflektor verwendet. Es wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Matrices verwendet.

	<i>Name</i>	<i>Lsg.</i>	<i>Substanzklasse</i>	<i>Attenuierung</i>
CCA	α -Cyano-4-hydroxymizinsäure	übersättigte Lsg. H ₂ O/MeCN(1:1) 0.1 % TFA	Peptide, Proteine	40-50 30-45
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	15 mg/mL H ₂ O/MeCN (1:1) 0.1 % TFA	Peptide, Glycopeptide	30-40
SA	Sinapinsäure	10 mg/mL H ₂ O/MeCN (1:1) 0.1 % TFA	Proteine	25-35

Von der Matrixlösung wurden 0.5 µL auf dem Probenhalter gegeben. Nach dem Antrocknen wurden dann 0.5 µL der Analytlösung aufgetragen (Schichtpräparation). Alternativ wurden die beiden Lösungen aber auch auf dem Probenhalter noch vor dem Auskristallisieren in der Pipettenspitze vermischt. Entsalzung von Proteinproben wurde mit Zeba Desalt Spin Columns oder mit Slide-A-Lyzer MINI Dialyseeinheiten (beides Pierce Biotechnology) durchgeführt.

6.5 NMR Spektroskopie

6.5.1 Allgemeines zur Probenaufnahme

Alle Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 280 und 305 K an einem der beiden Bruker DRX500- oder Avance700-Spektrometer durchgeführt. Die Proben wurden in 5 mm und 3 mm Röhren mit Füllvolumina von 550 μL und 220 μL vermessen. 2D-Spektren wurden phasensensitiv durch TPPI aufgenommen. Die Unterdrückung des Wassersignals für TOCSY-, NOESY- und ROESY-Experimente wurde mittels der WATERGATE-Pulsfolge vorgenommen. Im verwendeten ^1H , ^1H -COSY Pulsprogramm wird die Wasserunterdrückung durch Vorsättigung erreicht (*presat*).

Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur, Kalibrierung und Auswertung erfolgte mit der Software XWINNMR 3.1 oder TOPSPIN 1.3 (Bruker). Im Rahmen der Prozessierung wurde die Anzahl der Datenpunkte verdoppelt (*zero filling*). Die Kalibrierung der Spektren erfolgte gemäß Gottlieb *et. al*, so dass dem HDO-Signal bei 305 K eine chemische Verschiebung von 4.70 ppm zugeordnet wurde.¹⁹⁵

Es wurden folgende Pulsprogramme verwendet:

<i>NMR-Experiment</i>	<i>Pulsprogramm</i>
1D- ^1H	zg
1D- ^1H -presat	zgpr
1D- ^1H -watergate	p3919gp, w5gpsl, w5gp.rm
^1H , ^1H - TOCSY	mlevgp-phw5
NOESY	noesygp-phw5
ROESY	roesygp-ph19
^1H , ^1H -COSY	cosygp-phpr

6.5.2 Charakterisierung der Peptide

Zur Charakterisierung der Peptide wurden millimolare Peptidlösungen in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) angesetzt. Der pH-Wert wurde mittels TFA auf 3 bis 4 eingestellt. Die Zuordnung von Aminosäuren erfolgte durch die Aufnahme von TOCSY-Spektren. Der sequenzielle Zusammenhang wurde über NH_n - $\text{NH}_{(n-1)}$ -Kreuzpeaks des Peptidrückgrats in NOESY oder ROESY-Spektren bei pH 3-4 hergestellt. Die Protonen der Chitobiosyleinheit konnten durch ^1H , ^1H -COSY-Experimente zugeordnet werden. Da die STD-Messungen bei pH 7.4 durchgeführt wurden, erfolgte für ausgewählte Peptide ebenfalls eine Charakterisierung in D_2O -PBS Puffer bei pH 7.4. In diesem Falle wurde die sequenzielle Identität der Aminosäuren aus Analogien zu den Spektren bei pH 3-4 hergestellt.

Charakterisierung von p2c bei pH 3.0

Probe: 1.2 mM in 200 μ L H₂O/D₂O (9:1), pH 3.0, T = 305 K, 700 MHz.
N300 und 301 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

		NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ϵ	ζ
296	S	nb	4.241	3.995	3.995	-	-	-	-	-
297	T	8.602	4.415	4.172	-	1.221	-	-	-	-
298	R	8.438	4.640	1.842	1.842	1.722	1.722	3.238	7.133	-
299	P	-	4.407	2.284	2.018	2.018	1.903	3.827	-	-
								3.635		
	N	8.455	4.640	2.770	2.770	-	-	-	-	-
	N	8.456	4.644	2.796	2.796	-	-	-	-	-
302	N	8.397	nb	2.848	2.848	-	-	-	-	-
303	T	8.055	4.291	4.179	-	1.192	-	-	-	-
304	R	8.258	-	1.846	1.763	1.640	1.607	3.191	nb	-
305	K	8.268	4.465	1.820	1.739	1.418	1.418	1.672	2.990	7.486
306	S	8.267	4.456	3.825	3.825	-	-	-	-	-
307	I	8.179	4.129	1.804	-	1.163	-	0.914	-	-
308	H	8.555	nb	3.236	3.160	-	-	7.248	7.894	-
309	I	8.068	4.191	1.831	-	0.848	1.149	0.848	-	-

	NH (δ)	NHAc	1	2	3	4	5	6a, 6b	Ac
GlcNAc	8.577	8.186	5.023	3.816	3.719	3.605	3.514	3.787	1.977
								3.619	
GlcNAc'	-	8.323	4.589	3.719	3.545	3.437	3.468	3.893	2.048
								3.719	

nb: nicht bestimmt

Charakterisierung von p2c bei pH 7.4

Probe: 8.2 mM in 220 μ L D₂O-PBS, pH 7.4, T = 305 K, 700 MHz.
N300 und N301 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

		NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ϵ	ζ , ..
296	S	-	nb	4.191	4.191	-	-	-	-	-
297	T	-	4.353	4.185	-	1.197	-	-	-	-
298	R	-	4.639	1.831	1.721	1.659	1.659	3.206	-	-
299	P	-	4.397	2.274	2.008	2.008	1.895	3.808	-	-
								3.628		
	N	-	4.719	2.760	2.760	-	-	-	-	-
	N	-	4.645	2.795	2.795	-	-	-	-	-
302	N	-	4.715	2.839	2.839	-	-	-	-	-
303	T	-	4.272	4.209	-	1.186	-	-	-	-
304	R	-	4.321	1.851	1.765	1.629	1.602	3.179	-	-
305	K	-	4.312	1.823	1.743	1.448	1.401	1.668	2.974	-
306	S	-	4.439	3.795	3.795	-	-	-	-	-
307	I	-	4.081	1.789	-	0.875	1.401	0.812	-	-
							1.114			
308	H	-	4.631	3.070	2.987	-	-	6.949	7.764	-
309	I	-	4.152	1.812	-	0.815	1.286	0.804	-	-
							1.098			

	NH (δ)	NHAc	1	2	3	4	5	6a, 6b	Ac
GlcNAc	-	-	5.007	3.815	3.729	3.620	3.526	3.784 3.630	1.985
GlcNAc'	-	-	4.579	3.715	3.563	3.443	3.485	3.978 3.896	2.042

nb: nicht bestimmt

Charakterisierung von p1c bei pH 3.5

Probe: 0.4 mM in 600 μ L H₂O/D₂O (9:1), pH 3.5, T = 305 K, 700 MHz.

N295, N300, N301 und 302 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

	NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ϵ	ζ
291 S	-	nb	nb	nb	-	-	-	-	-
292 V	8.445	nb	1.913	-	0.793	0.693	-	-	-
293 E	8.425	nb	1.828	1.761	1.616	1.541	-	-	-
294 I	8.243	4.015	1.702	-	0.749	1.318 1.043	0.749	-	-
	N	8.485	4.591	2.706	2.641	-	-	-	-
296 S	8.255	4.352	3.784	3.706	-	-	-	-	-
297 T	8.100	4.198	4.074	-	1.055	-	-	-	-
298 R	8.218	4.191	nb	nb	1.533	1.533	-	nb	-
299 P	4.407	2.279	2.014	2.014	1.892	3.831 3.638	-	-	-
	N	8.485	4.591	2.706	2.641	-	-	8.535	-
	N	8.485	4.591	2.706	2.641	-	-	-	-
	N	8.485	4.591	2.706	2.641	-	-	-	-
303 T	7.991	4.135	4.084	-	1.062	-	-	-	-
304 R	8.209	4.160	1.705	1.624	1.510	1.510	3.079	nb	-
305 K	8.229	nb	nb	nb	1.432	1.432	nb	nb	nb
306 S	8.230	4.314	3.688	3.688	-	-	-	-	-
307 I	8.043	4.040	1.665	-	0.697	1.219 0.996	0.697	-	-
308 H	8.518	4.588	3.012	3.075	-	-	6.989	7.593	-
309 I	8.149	3.948	1.633	-	0.752	nb	0.701	-	-

	NH (δ)	NHAc	1	2	3	4	5	6a, 6b	Ac
GlcNAc	8.102	8.535	4.875	3.708	3.606	3.495	3.402	3.694 3.505	1.859
GlcNAc'	-	8.290	4.442	3.499	3.427	3.321	3.357	3.666 3.609	1.914

nb: nicht bestimmt

Charakterisierung von p4c bei pH 3.5

Probe: 9.5 mM in 200 μ L H₂O/D₂O (9:1), pH 3.5, T = 395 K, 700 MHz.

		NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ϵ	ζ
298	R	nb	4.320	1.895	1.895	1.664	1.664	3.187	7.153	-
299	P	-	4.434	2.286	1.995	1.952	1.866	3.695	-	-
								3.542		
300	N	8.531	4.603	2.753	2.753	-	-	nb	-	-
301	N	8.421	4.668	2.742	2.742	-	-	8.539	-	-
302	N	8.377	4.690	2.722	2.722	-	-	nb	-	-
303	T	8.029	4.221	4.154	-	-	-	-	-	-
304	R	8.244	4.278	1.719	1.719	1.561	1.561	3.136	7.090	-
305	K	8.321	4.287	1.775	1.704	1.376	1.376	1.619	2.933	7.441
306	S	8.223	4.350	3.807	3.807	-	-	-	-	-

	NH (δ)	NHAc	1	2	3	4	5	6a, 6b	Ac
GlcNAc	8.539	8.112	4.960	3.784	3.684	3.562	3.479	3.755	1.969
								3.579	
GlcNAc'	-	8.288	4.527	3.671	3.506	3.399	3.429	3.859	2.025
								3.690	

nb: nicht bestimmt

Charakterisierung von p4c bei pH 7.4

Probe: 67 μ M in 200 μ L D₂O-PBS, pH 7.4, T = 305 K, 700 MHz.

N300, N301 und N302 wurden in Analogie zu der Charakterisierung bei pH 3.5 zugeordnet.

		NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ϵ	ζ
298	R	-	4.130	1.844	1.824	1.685	1.685	3.216	-	-
299	P	-	4.452	2.306	2.013	2.013	1.899	3.748	-	-
								3.594		
300	N	-	4.654	2.819	2.819	-	-	-	-	-
301	N	-	4.644	2.800	2.800	-	-	-	-	-
302	N	-	4.722	2.800	2.800	-	-	-	-	-
303	T	-	4.257	4.215	-	1.181	-	-	-	-
304	R	-	4.325	1.833	1.766	1.610	1.610	3.179	-	-
305	K	-	4.323	1.822	1.727	1.428	1.428	1.670	2.983	-
306	S	-	4.380	3.839	3.839	-	-	-	-	-

	NH (δ)	NHAc	1	2	3	4	5	6a, 6b	Ac
GlcNAc	-	-	5.011	3.821	3.726	3.615	3.325	3.806	1.982
								3.629	
GlcNAc'	-	-	4.575	3.710	3.561	3.439	3.480	3.892	2.038
								3.725	

nb: nicht bestimmt

Charakterisierung von p5c bei pH 7.4

Probe: 3.9 mM in 600 μ L D₂O-PBS, pH 7.4, T = 305 K, 700 MHz.

	NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ε	ζ	
298	R	-	4.213	1.892	1.860	1.696	1.696	3.222	-	-
299	P	-	4.461	2.309	2.028	2.002	1.902	3.744	-	-
							3.592			
	N	-	4.733	2.847	2.847	-	-	-	-	-
	N	-	4.666	2.790	2.717					
	N	-	4.737	2.819	2.819					
303	T	-	4.284	4.219	-	1.182	-	-	-	-
304	R	-	4.288	1.866	1.759	1.647	1.610	3.188	-	-

	NH (δ)	NHAc	1	2	3	4	5	6a, 6b	Ac
GlcNAc	-	-	5.006	3.815	3.727	3.607	3.518	3.783	1.983
								3.626	
GlcNAc'	-	-	4.575	3.720	3.556	3.452	3.475	3.893	2.034
								3.706	

nb: nicht bestimmt

Charakterisierung von p8 bei pH 7.4

Probe: 1.5 mM in 600 μ L D₂O-PBS, pH 7.4, T = 302 K, 500 MHz.

	NH	α (α')	β	β' (β'')	γ	γ' (γ'')	δ (δ')	ε	ζ	
305	K	-	3.813	1.799	1.688	1.424	1.424	nb	2.982	6.950
306	S	-	4.518	3.829	3.800	-	-	-	-	-
307	I	-	4.176	1.817	-	0.834	1.307	0.834	-	-
						1.112				
308	H	-	4.640	3.045	3.003	-	-	-	6.955	7.769
309	I	-	4.084	1.789	-	0.874	1.407	0.874	-	-
						1.127				

nb: nicht bestimmt

6.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Sambrook¹⁹⁶ und Ausubel¹⁹⁷ durchgeführt. Für alle wässrigen Puffer, Lösungen und Medien wurde Reinstwasser (ddH₂O) verwendet. Einige Puffer und Lösungen wurden zusätzlich steril filtriert. Alle Medien sowie einige Puffer und Lösungen wurden im Autoklav durch wassergesättigten, unter Druck (5 bar) stehenden Dampf 20 Minuten bei 120 °C hitzesterilisiert. Die praktischen Ausführungen der vorliegenden Arbeit wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 1 gemäß des GenTG durchgeführt. Durch Sterilisation wurden in Lösungen, Puffern, Medien sowie in angefallenen Abfällen Organismen und Zellkulturen abgetötet.

6.6.1 Wachstum von Bakterienzellkulturen

Die in dieser Arbeit von den *E. coli*-Stämmen TG1 und HB2151 angesetzten Kulturen wuchsen entweder auf TYE-Platten (Brutschrank, 30 °C od. 37 °C) oder im 2YT-Flüssigmedium (Inkubationsschüttler, 30 °C od. 37 °C, 220 rpm). Die Bestimmung der OD erfolgte mit einem Photometer bei 600 nm. Es gilt die Näherung, dass ein OD₆₀₀-Wert von 0.5 in etwa einer Konzentration von $4 \cdot 10^8$ Bakterien/mL entspricht.

6.6.2 Selektion von *E. coli*-Zellen

TG1- und HB2151-Zellen ohne pHEN2-Vektor besitzen keinerlei Antibiotikaresistenz und können so durch die Zugabe vom Ampicillin zum festen oder flüssigem Medium (100 µg/mL) ausselektiert werden. TG1- und HB2151-Zellen mit pHEN2-Vektor besitzen Ampicillin-Resistenz. Unmittelbar nach Infektion mit den Helferphagen verfügen die mit Helferphagen infizierten Zellen über eine Kanamycin-Resistenz. Durch Anwesenheit von Kanamycin (25 µg/mL) im festen oder flüssigem Medium können so nicht mit Helferphagen infizierte Zellen ausselektiert werden.

6.6.3 Lagerung von Bakterien-Kolonien

TG1- und HB2151-Klone sind mindestens vier Wochen lebensfähig, wenn die TYE-Platten verschlossen und in invertierter Position bei 4 °C gelagert werden. Bei Langzeitlagerung wurden Zellen einer ÜNK mit 15-30% Glycerin gemischt, in sterilen Reaktionsgefäßen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

6.6.4 Lagerung von Phagen

Phagen wurden grundsätzlich nicht länger als vier Tage bei 4 °C gelagert. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit diese mit Glycerol zu versetzen (30% v/v) und sie bei -20 °C zu lagern.

6.6.5 Wachstum und Replikation der *Griffin.1* Bibliothek

Tiefgekühlte Aliquots der Bibliothek (mit Phagemid-Vektor transformierte *E. coli* TG1 Zellen) wurden verwendet, um eine Kultur in 500 mL 2YT-AG-Medium mit einem OD₆₀₀-Wert von ~ 0.1 anzupflanzen. Nachdem bei 37 °C und 250 rpm ein OD₆₀₀-Wert von etwa 0.5 erreicht war wurden 25 mL dieser Kultur mit einem 1:20 Überschuss an M13K07- oder PKM13- Helferphagen für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert.

Der Rest der nicht-infizierten Kultur wurde für weitere 2 h bei 37 °C kultiviert, zentrifugiert (1500 xg, 12 min) und in wenig 2YT mit 15% Glycerin resuspendiert. Aliquots der Zellsuspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die infizierten Zellen wurden bei 1600 xg für 10 min zentrifugiert und in 500 mL 2YT-AK-Medium resuspendiert. Nach Kultivierung über Nacht bei 30 °C und 220 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 xg, 4 °C, 30 min) abgetrennt und der Überstand mit 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lsg. versetzt. Nach mehr als zweistündigem Stehen in einem Eisbad wurden die Phagen durch Zentrifugation (3000 xg, 4 °C, 30 min) pelletiert.

6.6.6 Infektion von *E. coli* Zellen mit Helferphagen

Zur Infektion von TG1 oder HB2151 mit PKM13-Helferphagen wurde eine Kultur angeimpft (OD < 0.1) und diese bis zu einer OD₆₀₀ = 0.4-0.6 wachsen gelassen. Bei dieser OD bilden die TG1-Zellen den für die Infektion benötigten F-Pilus aus. Bei der Infektion wurde ein Phagenüberschuss von 1:10 bis 1:20 gewährleistet. Die Infektion erfolgte über einen Zeitraum von 30 min im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden im Anschluss zentrifugiert (2500 xg, 4 °C, 10 min) und in einem Volumen von 25 bis 75 mL 2YT-AK-Medium resuspendiert und über Nacht bei 30 °C (220 rpm) kultiviert.

6.7 Allgemeine proteinchemische Methoden

6.7.1 Durchführung von ELISA-Varianten

Im Verlaufe diverser Selektionsvarianten wurden verschiedene Varianten angewandt und diese wahlweise in 96er oder 384er ELISA-Platten durchgeführt. Standardvolumina waren 50 μL beziehungsweise 20 μL pro Vertiefung. Bei Verwendung der 384er Platten wurde ein OD-Blindwert von 0.14 bei 405 nm bei Anwesenheit von 20 μL PBS festgestellt. Dieser Wert wurde teilweise von den erhaltenen Auslesedaten als Pufferblindwert subtrahiert.

a) *ELISA mit polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen*: Über Nacht wurden die Vertiefungen mit je 50 μL von Lösungen der jeweiligen Antigene befüllt (4 °C). Lösungen der BSA-Peptid-Konjugate sowie von BSA und Streptavidin wurden in einer Konzentration von 100-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. Eine Vertiefung blieb als Negativkontrolle unbesetzt. Die Lösungen wurden entnommen und freie Bindungsstellen für mindestens 2 h mit 360 μL (120 μL) 4% MPBS geblockt. Nach dem Waschen (kalt; 1x PBS) wurden je 50 μL (20 μL) einer 1:1 Mischung von Phagenlösung und 4% MPBS in den Vertiefungen für 90 min inkubiert. Nach dem Waschen der Vertiefungen (2x TPBS, 2x PBS) wurden je 50 μL (20 μL) einer 1:2000-Verdünnung von HRP/Anti-PKM13 in 2% MPBS für 45 min hinzugegeben. Die nach Waschen (4x TPBS, 4x PBS) durch Zugabe von je 50 μL (20 μL) der ABTS-Lösung eingeleitete Farbreaktion wurde photometrisch (405 nm) vermessen.

b) *ELISA mit monoklonalen scFv-präsentierenden Phagen*: Da es sich um monoklonale Phagen handelte wurden 50 μL einer 1:1 Mischung von Phagen und lediglich 2% MPBS verwendet. Die übrigen Schritte erfolgten analog zu a).

c) *ELISA mit biotinylierten scFv*: Nach Immobilisierung der BSA-Konjugate und Negativkontrollen über Nacht (20 μL) wurde mit 4% MPBS für 2 h bei RT geblockt. Nach dreimaligen Waschen mit TPBS und PBS wurden die biotinylierten scFv in 2% MPBS für 90 min inkubiert. Nach gründlichem Waschen (4x TPBS, 4x PBS) wurde Streptavidin-POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:6000 in 4% TPBS verwendet, welches für 40 min in den Vertiefungen bei RT verweilte. Nach erneutem intensiven Waschen (7x TPBS, 7x PBS) wurde der Nachweis von scFv-Bindung durch Zugabe von ABTS-Lsg vollzogen.

d) *ELISA mit 447-52D IgG3*: Die Detektion von IgG3 **447-52D** erfolgte mit anti-human IgG-HRP Konjugat in einer Verdünnung von 1:2000 in 2% MPBS.

6.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt nach Molekülgröße, elektrophoretischer Beweglichkeit und Gesamtladung. Durch Zugabe des stark amphiphatischen Detergenz SDS werden die Proteine bei der SDS-PAGE lediglich nach Masse getrennt, da nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört werden. Gleichzeitig wird negative Ladung auf das Protein übertragen und die im Vergleich geringe Ladung des Proteins auf diese Weise maskiert. Die Proteine werden bei völliger Entfaltung aufgrund von Siebeffekten in der Reihenfolge ihrer Molekulargewichte auf dem Gel aufgetrennt. Eine Optimierung stellt die diskontinuierliche pH-Elektrophorese (Disc-Elektrophorese) dar. Sie erzeugt durch den Einsatz von zwei Gelsystemen schärfere Banden. Die pH-Differenz zwischen Trenngel bzw. Tankpuffer und Sammelgel um zwei Einheiten, hat beim Eintritt der Proteine in das Trenngel eine Fokussierung der Proteine zur Folge.

Zusammensetzung der 12.5% Trenngele (Ansatzgröße für fünf Gele):

Acrylamid (30%)	12.5 mL
Trenngelpuffer (4x)	7.5 mL
ddH ₂ O	9.9 mL
10% APS	150 µL
TEMED	15 µL

Zusammensetzung der 3% Sammelgele:

Acrylamid (30%)	1.5 mL
Sammelgelpuffer	3.75 mL
ddH ₂ O	9.6 mL
10% APS	100 µL
TEMED	10 µL

Zuerst wurden das Trenngel in einer Größe von 90x60 mm gegossen. Es wurde mit 500 µL Isopropanol überschichtet und 90 min zur Polymerisierung bei RT stehen gelassen. Das Isopropanol wurde abgegossen und das Trenngel mit einer Sammelgellösung überschichtet. In dieses wurde zur Erzeugung der Probestaschen ein Teflonkamm gesteckt. Nach dem Auspolymerisieren (2 h) wurde der Kamm herausgezogen und das Gel mit ddH₂O gewaschen.

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurde für einen anschließenden Western Blot ein vorgefärbter (*prestained*) Proteinstandard und für nachfolgende Coomassie-Färbung der entsprechende nicht-vorgefärbte Standard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 140 V begonnen, wobei diese nach Überschreiten der Proteine der Sammelgel/Trenngelgrenze auf 160 V erhöht wurde.

Vom periplasmatischen Extrakt ausgewählter Klone wurden je 20 μL entnommen und mit 6 μL Probenpuffer (reduzierend, 6x) versetzt. Die Proben wurden 7 min im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend 20 μL jeder Probe in eine Tasche des PA-Gels gefüllt. Eine der Probentaschen wurde mit 2 bis 4 μL des vorgefärbten oder ungefärbten Proteinstandards beladen.

6.7.3 Färbung von Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen

Alternativ zum Blot und anschließendem Immunprint können auch alle Proteinbanden der SDS-PAGE unspezifisch mit Coomassie angefärbt werden. Nach abgeschlossener elektrophoretischer Auftrennung wurde dazu das Trenngel für etwa 2 h bei RT in einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel für ungefähr 1 h im Entfärbepad (20%ige Essigsäure) bei RT inkubiert. Zur Verbesserung des Banden-Verhältnisses zum Hintergrund wurden die Gele einige Tage in ddH_2O gelagert.

6.7.4 Western Blot

Der elektrochemische Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran wird Western Blot genannt. Dazu wurde zunächst ein etwa 8 x 5 cm großes Stück Membran zurechtgeschnitten. Der elektrochemische Transfer erfolgte horizontal mit Hilfe einer *Semi-Dry*-Blot-Apparatur. Mit Transferpuffer getränktes Filterpapier (vier Lagen) wurde auf die Platinelektrode (Anode) gelegt. Auf die Filterpapiere wurde die zuvor in MeOH und Transferpuffer vorgetränkte Membran gelegt und auf diese das SDS-PAGE-Gel. Das Gel wurde mit einer erneuten Schicht angefeuchtetem Filterpapier (vier Lagen) bedeckt und die Kathode aufgesetzt. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 durchgeführt und nach etwa 1.5 h beendet.

6.7.5 Immunprinting

Das Immunprinting schließt sich dem Western Blot an und beinhaltet die Visualisierung bestimmter Proteinbanden durch Inkubation mit einem primären und sekundären Antikörper. Zunächst wurde die Membran für 30 min in 5% MPBS geblockt und über Nacht mit Maus-Anti-*myc* (1:2500 in 2 % MPBS) inkubiert, da die scFvs des pHEN2-Vektors über einen *myc*-Tag verfügen. Nach dem Waschen (2x TPBS, PBS) wurde Ziege-Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (1:5000 in 2% MPBS) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h und Waschen der Membran (3x TPBS, PBS), bevor diese mit Detektionslösung (1.5 mL NBT-Lsg, 125 μL BCIP-Lsg. in 11.5 mL Detektionspuffer-AP) benetzt wurde. Durch die eingeleitete AP-katalysierte Farbreaktion wurden die mit Antikörper markierten Proteinbanden sichtbar. Nach ausreichender Entwicklung wurde die Membran in H_2O gewaschen und an der Luft getrocknet.

6.8 Selektion von scFv-präsentierenden Phagen

Grundlage sämtlicher hier geschilderten Arbeitsschritte war das im Lieferumfang enthaltene Protokoll zur Nutzung der *Griffin.1* Bibliothek.¹⁹⁴

6.8.1 Überblick über das methodische Vorgehen

Es wurden diverse aufeinander folgende Selektionsrunden unter teilweise veränderten Bedingungen durchgeführt. Eine Selektionsrunde bestand in Vorselektionen, der Inkubation der Phagenbibliothek (bzw. der Phagen der vorherigen Selektionsrunde) mit biotinyliertem Peptid, dem Hinzufügen von SA-Fe₂O₃-Partikeln und Abtrennen der nicht gebundenen Phagen. Mit den eluierten Phagen wurden TG1-Zellen infiziert, aus denen wahlweise auf polyklonaler oder, durch Verwendung einzelner Klone, auf monoklonaler Ebene weitergearbeitet werden konnte. Die Vermehrung der Phagen erfolgte durch Infektion einer TG1-Kultur mit M13K07-Helferphagen. Der Erfolg einer Selektionsrunde konnte auf poly- oder monoklonaler Ebene durch einen ELISA verfolgt werden. Zur Expression der scFvs in HB2151 wurden von ausgewählten Klonen Phagen isoliert und mit diesen HB2151-Kulturen infiziert. Die Produktion löslicher scFvs wurde durch Induktion mit IPTG initiiert. Um den Erfolg der Expression zu belegen, wurde nach durchgeführtem TS-Aufschluss eine SDS-PAGE und ein Western Blot mit anschließendem Immunprint durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Expression mit ausgewählten Klonen im Liter-Kulturmaßstab ausgeführt. Nach einer His-Tag-Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und MALDI-TOF-MS die Anwesenheit der scFv nachgewiesen. Ausgangsmaterial für die Sequenzierung der scFv-Fragmente ist die isolierte Plasmid-DNA, deren Sequenz nach der Sanger Didesoxymethode bestimmt wurde.

6.8.2 Vorselektion in der Vertiefung einer ELISA-Platte

Da bei der Selektion in Lösung ein biotinyliertes Glycopeptid und Streptavidin-Fe₂O₃-Partikel verwendet wurden, war es nötig scFv präsentierende Phagen mit Affinitäten zu Biotin und Streptavidin im Vorfeld auszuwählen. Dieses erfolgte in den Vertiefungen einer ELISA-Platte, welche über Nacht mit den entsprechenden Lösungen (SA 0.1 mg/mL, Biotinyl-Linker (hitzeaktiviert) 0.5 mg/mL) inkubiert wurden. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen mit 2% MPBS (2 h) wurden die Phagen (1 mL) vor der eigentlichen Selektion in Lösung in diese Vertiefungen gegeben und nach jeweils 90 min entnommen.

6.8.3 Vorselektion im Immunoröhrchen

Über Nacht wurden Lösungen von BSA (500 µg/mL), Biotin (200 µg/mL) oder Streptavidin (100 µg/mL) in ein Immunoröhrchen gegeben und auf einem Rollbrett bei 4 °C inkubiert. Die Lösungen wurden verworfen und nicht besetzte Positionen der Oberfläche mit 2-4 mL 4% MPBS Lösung für zwei Stunden blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TPBS und PBS wurden die Phagen in 2% MPBS in das Röhrchen gegeben und für etwa eine Stunde auf einem Rollbrett inkubiert, bevor die nun vorselektierte Phagenlösung wieder entnommen wurde.

6.8.4 Vorselektion gegen Streptavidin-Eisenoxidpartikel

Zu den Phagen in 2% MPBS wurden 250 µL Streptavidin-Eisenoxidpartikel-Suspension gegeben und für etwa 1 h durch leichtes Invertieren inkubiert. Die Partikel und eventuell bindende Phagen wurden durch einen Magneten am Gefäßboden gesammelt, so dass die Phagen im Überstand zur Selektion in Lösung verwendet werden konnten.

6.8.5 Selektion in Lösung

Bei der Selektion in Lösung wurden die bereits vorselektierten Phagen (1 mL) zunächst mit 1 mL 2 % MPBS versetzt und für 30 min auf dem Rollbrett inkubiert (4 °C). Es folgte die Zugabe des biotinylierten Glycopeptids zu einer finalen Konzentration von etwa 100-250 nM. Nach Inkubation für 2 h bei RT (Rollbrett) wurden 600 µL der SA-Fe₂O₃-Partikel-Suspension (0.8-1.2 mg/mL; Kapazität etwa 2 µg/mg) hinzugegeben. Nach 15 min wurde auf vier Reaktionsgefäße aufgeteilt und unter Einsatz eines Magneten die Partikel (mit biotinyliertem Glycopeptid und affinen Phagen-scFv-Konjugaten) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets durch Resuspendieren sowie erneutes Trennen durch einen Magneten gewaschen (2-3x TPBS, 2-3x PBS, 4 °C) und anschließend vereinigt.

a) *Elution mit TEA (PKM13- oder M13K07-Helferphagen)*: Das Pellet wurde in 500 µL TEA 0.1 M resuspendiert und die Suspension für 8 min bei 4 °C gelagert. Nach dem Pelletieren wurde der Überstand mit 1 mL Tris pH 7.4 (1 M) neutralisiert und auch auf das Pellet wurden 500 µL des Tris-Puffers gegeben.

b) *Elution mit Trypsin (nur PKM13-Helferphagen)*: Das Pellet wurde in 1 mL Trypsin/EDTA (1x) resuspendiert und für 15 min inkubiert. Nach dem Pelletieren wurde der Überstand mit 1 mL und das Pellet mit 200 µL FKS-DMEM-Medium (10%) versetzt.

6.8.6 Selektionen mit kompetitiver Zugabe des Peptids p8

Zu der Lösung aus Phagen, Milchpulver und biotinyliertem V3-Peptid wurde zusätzlich ein 30facher Überschuss des Peptids KSIHI (**p8**) gegeben.

6.8.7 Selektionen mit immobilisiertem gp120

Zunächst wurden 40 μL einer gp120-Lösung in PBS bereitet, die jeweils 3 μL drei verschiedene gp120-Isolate enthielt (Bal, SF162, IIIB; alle 1 mg/mL). Die gp120 Lösung hatte somit eine Konzentration von 300 $\mu\text{g/mL}$ (2.5 μM). Von dieser Lösung wurden je 20 μL in eine Vertiefung einer 384er ELISA-Platte gefüllt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Lösung wurde entfernt und die Vertiefung bis zum Rand mit 4% MPBS versetzt. Nach Blockierung für 2 h wurde zweimal mit TPBS und PBS gewaschen bevor jeweils 20 μL der Phagenlösung (2% MPBS) versetzt mit 0.5 μL sCD4 (1 mg/mL) zugegeben wurden. Die Phagen inkubierten im Brutschrank bei 37 °C unter gelegentlichen Schwenken der ELISA-Platte (1 h). Die Anzahl der Waschschrte wurde mit zunehmender Selektionsrunde von je 3x TPBS, PBS (kalt) auf 10x TPBS, PBS (4 °C) erhöht. Die Elution der Phagen erfolgte im Anschluss zweimal für je 10 min mit 40 μL TEA (0.1 M) unter gelegentlicher Resuspension der Lösung, wobei das Eluat im Anschluss durch Zugabe von 100 μL Tris-Puffer (1 M, pH 7.4) neutralisiert wurde.

6.8.8 Vermehrung der eluierten Phagen

Mit den erhaltenen etwa 2 mL Phagen-Eluat wurden 5 mL einer exponentiell wachsenden *E. coli* TG1-Kultur infiziert. Zur Bestimmung des Titers oder zum Picken von einzelnen Klonen wurden Verdünnungen angesetzt (10^{-1} bis 10^{-5}) und davon je 100 μL ausplattiert (TYE-AG). Der Rest der Zellsuspension wurde zentrifugiert (3000 xg, 10 min), das Pellet in 1 mL 2YT resuspendiert und je 500 μL ausplattiert (ÜN, 30 °C). Zudem wurde stets die nicht infizierte TG1-Kultur als Negativkontrolle ausplattiert (TYE-AG).

a) *polyklonal*: Die Zellen wurden mit etwa 10 mL 2YT abgeschabt und 100 μL dieser Zellsuspension zu 100 mL 2YT-AG gegeben ($\text{OD} < 0.1$), um die angeimpfte Kultur bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von etwa 0.5 wachsen zu lassen. Der Rest der Zellsuspension wurde mit 15-30% Glycerin versetzt und eingefroren. 5 mL der exponentiell wachsenden Kultur wurden bei mit 0.65 μL PKM13-Helferphagen ($4 \cdot 10^{13}$ P/mL) infiziert (MOI etwa 1:20), zentrifugiert (3000 xg, 10 min) und das Pellet in 1 mL 2YT resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 50 mL 2YT-AK gegeben und die Zellkultur bei 30 °C ÜN geschüttelt. Nach Zentrifugation (3000 xg, 30 min) wurde der Überstand mit 1/5 des Volumens PEG/NaCl-Lsg. versetzt und für mindestens 2 h bei 4 °C stehen gelassen. Nach

Zentrifugation (3000 xg, 30 min) wurde das Phagenpellet in 1-2 mL PBS resuspendiert und Zellreste (10.000 xg, 8 min) abzentrifugiert. Die so gewonnenen Phagen konnten dann für eine weitere Selektionsrunde oder einen ELISA verwendet werden.

b) *monoklonal*: Zunächst wurden Vorkulturen von einzelnen cfu der Verdünnungsplatten angeimpft (je 3 mL; 2YT-AG ÜN bei 30 °C). Davon wurden neue 3 mL Zellkulturen angeimpft ($OD_{600} < 0.1$) und diese bis zu einer OD_{600} von etwa 0.5 wachsen gelassen. Infektion mit PKM13-Helferphagen (MOI etwa 1:20), Zentrifugation und Fällung mit PEG/NaCl entsprachen a) Das Phagenpellet wurde in 150 µL PBS resuspendiert. Auf eine Abtrennung der Zellreste wurde verzichtet. Die erhaltenen monoklonalen Phagen konnten nun für einen ELISA verwendet werden und dienten darüber hinaus zur Infektion von *E. coli* HB2151-Zellen.

6.9 Sequenzierung der scFv

6.9.1 Plasmid-DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das E.Z.N.A[®] Plasmid Miniprep Kit II (PeqLab) oder das NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die Durchführung der Isolierung erfolgte gemäß der empfohlenen Arbeitsvorschrift, wobei als Ausgangsmaterial 10 mL ÜNK (TG1 oder HB2151) des entsprechenden Klones dienten. Die methodische Grundlage dieser Systeme kombiniert die alkalische Lyse der Zellen mit Zentrifugationssäulen, deren Membranen selektiv und reversibel DNA binden. Eluiert wird im Anschluss mit sterilem ddH₂O oder speziellem Elutionspuffer. Die Plasmid-DNA wurde mit 75 µL ddH₂O eluiert und das Eluat 5 min bei 20,000 xg zentrifugiert.

6.9.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine Methode, unter Verwendung von DNA-Oligonukleotiden bekannter Sequenz spezifisch kleinste DNA-Mengen *in vitro* zu vervielfältigen.¹⁹⁸ Die als Primer bezeichneten Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Die zur Sequenzierung angewandte Methode nach Sanger¹⁹⁹ beruht auf dem Einsatz nur eines Oligonukleotids, dNTPs und 3'-Hydroxy-defiziten dNTPs (ddNTPs). Jedes der vier unterschiedlichen ddNTPs ist mit einer bei verschiedener Wellenzahl fluoreszierenden Gruppe konjugiert. Durch das Fehlen der 3'-Hydroxy-Gruppe kommt es bei der DNA-Synthese durch DNA-Polymerase I zum Abbruch, sobald eines dieser 3'-Hydroxy-defiziten dNTPs eingebaut wird. Da dieser Vorgang statistisch abläuft, erhält man ausgehend vom Primer verschieden lange DNA-Replikate, die an ihren Enden einen der vier

Fluoreszenzmarkern tragen. Durch Gel- oder Kapillarelektrophorese lässt sich das Gemisch auftrennen, die einzelnen Banden auf ihre Fluoreszenz untersuchen und sich daraus die Sequenz ableiten.

Von der erhaltenen Plasmid-DNA wurde eine PCR mit dem Oligonukleotid fdSeq oder LMB3 wie folgt angesetzt:

	<i>Volumen [μL]</i>
Premix ABI Big Dye Terminator	2.0
Puffer	2.0
fdSeq oder LMB3 (ca. 20 pmol)	1.0
DNA template (ca. 200 ng)	1.5
ddH ₂ O	3.5

Standard-Programm für durchgeführte PCRs:

<i>Temperatur [$^{\circ}$C]</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
96	1:00	1
96	0:30	30
53	0:30	
60	4:00	

6.9.3 Fällung von DNA

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 90 μ L ddH₂O und 300 μ L EtOH (99.8%) zu dem 10 μ L PCR-Ansatz. Nach Zentrifugation (15,000 xg, 35 min, RT). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das DNA-Pellet mit 100 μ L EtOH (70%) überschichtet und erneut zentrifugiert (15,000 xg, 10 min, RT). Dieser Schritt diente der Entfernung von Salzresten des PCR-Puffers. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde die DNA bei RT oder 37 $^{\circ}$ C an der Luft getrocknet. Der Schritt der elektrophoretischen Auftrennung des Oligomergemisches erfolgte extern am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

6.9.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzierungsdaten wurden mit der Software CHROMAS LITE 1.45 begutachtet. Die Übersetzung der DNA-Sequenz in Aminosäuresequenz erfolgte über eine Funktion des ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) welcher vom Schweizer Institut für Bioinformatik (SIB) betrieben wird.¹⁷⁷ Nach der Kabat-Nomenklatur erfolgte die Zuordnung der CDR- und der Framework-Regionen.^{175;176}

Aus der Aminosäuresequenz heraus lässt sich der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm in guter Näherung vorhersagen.^{178;179} Die Massen (*average*) der scFv wurden mit MALDI-TOF-MS bestimmt und mit Hilfe einer Funktion des ExPASy Proteomics Servers theoretisch berechnet.

6.10 Expression von scFv

6.10.1 Transformation der Phagemidvektoren von TG1- in HB2151-Zellen

Wenige Mikroliter der Lösung monoklonaler Phagen wurden verwendet, um jeweils 500 μL *E. coli* HB2151 ($\text{OD}_{600} \sim 0.4$) zu infizieren (2 min, RT). Nach Zentrifugation (1500 $\times g$, 8 min) wurde das Zellpellet in 2YT-Medium resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungen auf TYE-AG ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte HB2151-Zellen auf einer TYE-AG-Platte ausgestrichen.

6.10.2 Expression von scFv (50 mL Kultur)

Von den TYE-AG Platten wurden einzelne Klone gepickt und davon je eine 15 mL Kultur (2YT-AG) angeimpft (ÜN, 30 °C). Von diesen Kulturen wurden je 500 μL zu 50 mL 2YT-A gegeben und bis $\text{OD}_{600} \sim 1$ wachsen lassen. Durch Zugabe von IPTG (final 1 mM) wurde nun die Expression der löslichen scFv induziert und die Zellen kultivierten ÜN bei 30 °C. Von der induzierten Zellkultur wurden 15 mL zentrifugiert (3000 $\times g$, 15 min), das Pellet in 1 mL kaltem TS suspendiert und für 4-6 min im Eisbad gekühlt. Anschließend wurde mit je 1.5 mL $\frac{1}{4}$ TS versetzt, mehrfach invertiert und für weitere 90 min im Eisbad gekühlt. Durch Zentrifugation (15,000 $\times g$, 15 min) wurde der periplasmatische Extrakt von Zellresten abgetrennt. Der periplasmatische Extrakt wurde ohne weitere Behandlung mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immunoblot auf die Anwesenheit und relative Konzentration von scFv überprüft.

6.10.3 Expression von scFv (3 L Kultur)

Von ausgewählten Klonen wurde ausgehend von einer monoklonalen HB2151-Vorkultur (100 mL, 2YT-AG) eine 3 L Kultur in 2YT-A angeimpft und zu dieser bei $\text{OD} \sim 1$ IPTG (final 1 mM) gegeben (ÜN, 30 °C). Nach Zentrifugation (3000 $\times g$, 30 min) wurde der periplasmatische Extrakt durch Zugabe von 30 mL kaltem TS-Puffer (6-10 min) zum Zellpellet und anschließender Zugabe von 45 mL $\frac{1}{4}$ TS-Puffer (90 min, 4 °C, mehrfaches Invertieren) gewonnen und durch Zentrifugation (15,000 $\times g$, 15 min) von Zellresten abgetrennt. Mit dem periplasmatischen Extrakt wurde im Anschluss eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt, um die scFv mit Hilfe des vorhandenen His-Tag zu isolieren.

6.10.4 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Die löslichen scFv des pHEN2-Phagemid-Vektors verfügen über einen His-Tag, welcher zur Anwendung einer Nickel-NTA-Affinitätschromatographie ausgenutzt werden kann. Das

Protein wird dabei über den His-Tag an die Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarosematrix gebunden, die Matrix mit PBS gewaschen und die Antikörperfragmente anschließend mit einer Imidazolösung eluiert. Der periplasmatische Zellextrakt eines 3L-Expressionsansatzes wurde dazu auf einem Rollbrett bei 4 °C für mindestens 2 h mit 5 mL einer Ni-NTA-Agarose/EtOH-Suspension (1:1) mit 20-30 mM Imidazol inkubiert. Nachdem die Suspension in eine Säule gegeben wurde und die überstehende Flüssigkeit abließ, wurde die Matrix mit 15 mL PBS gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von je 1 mL einer 300 mM Imidazol-Lösung. Je 20 µL der Fraktionen wurden mit 6 µL reduzierenden Probenpuffer (5x) versetzt, für 5 min aufgekocht und zusammen mit 7 µL eines ungefärbten Proteinstandards auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen, welches nach der Elektrophorese mit Coomassie angefärbt wurde. Die Fraktionen, welche intensive Banden von scFvs aufwiesen, wurden vereinigt und in PBS bei 4 °C für mindestens 6 h dialysiert (Slide-A-Lyzer-Cassettes, MWCO 10 kD).

6.10.5 Biotinylierung von scFv

Um die Bindung von scFv an die Zielmoleküle mit ELISA zu dokumentieren, bietet es sich an, diese kovalent zu biotinylieren. Die Anwesenheit kann somit durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase-Konjugat durch eine Farbreaktion mit ABTS aufgezeigt werden. Dazu wurde N-(+)-Biotinyl-6-aminocaprinsäure-N-succinimidylester (Fluka) 20 mM in kaltem ddH₂O zu der scFv-Lösung in PBS gegeben und für etwa 3 h bei RT leicht geschüttelt. Es wurde dabei ein 15facher Überschuss des Biotinylierungsreagenzes verwendet. Um überschüssiges Reagenz zu entfernen wurde im Anschluss Dialyse gegen PBS (MWCO 10 kD) durchgeführt. Die ungefähre Anzahl der verknüpften Biotineinheiten wurde mit MALDI-TOF-MS ermittelt und lag zwischen drei und fünf Biotinylresten pro scFv.

6.10.6 Konzentrationsbestimmung der scFv-Lösungen

Eine grobe Abschätzung der Konzentration konnte durch SDS-PAGE vorgenommen werden. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von BSA in PBS (50 µg/mL bis 500 µg/mL) angesetzt und Proben dieser parallel zu der scFv-Lösung unbekannter Konzentration in die Taschen eines 12.5% SDS-PAGE Gels gegeben. Das Elektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt und ein nicht-vorgefärbter Proteinmarker diente der Zuordnung der Molmasse. Darüber hinaus konnte über die vom Hersteller angegebene Spezifikation des Markers ebenfalls eine Abschätzung der scFv-Konzentration vorgenommen werden.

Wurde durch MALDI-TOF-MS oder SDS-PAGE eine zufriedenstellende Reinheit der scFv nachgewiesen, konnte die Konzentration auch UV/Vis-spektroskopisch bestimmt werden. Dazu wurden mit Hilfe von statistisch ermittelten Absorbationswerten von Trp, Cys und Tyr bei 280 nm der molare Extinktionskoeffizient berechnet, wobei mit verschiedenen Werten gerechnet wurde.¹⁷⁸ Die Proben wurden in einer Küvette bei 280 nm vermessen, wobei stets Zweifachbestimmungen vorgenommen wurden.

	<i>Tyr</i>	<i>Trp</i>	<i>Cys</i>	
D26	12	5	4	
Lewis <i>et. al.</i>	17760	27700	536	
Gray <i>et. al.</i>	17880	27500	500	$\epsilon_{\text{gemittelt}} = 45900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
P2	11	5	4	
Lewis <i>et. al.</i>	16280	27700	536	
Gray <i>et. al.</i>	16390	27500	500	$\epsilon_{\text{gemittelt}} = 44500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
F62	12	4	4	
Lewis <i>et. al.</i>	17760	22160	536	
Gray <i>et. al.</i>	17880	22000	500	$\epsilon_{\text{gemittelt}} = 40400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
L72	12	6	4	
Lewis <i>et. al.</i>	17760	33240	536	
Gray <i>et. al.</i>	17880	33000	500	$\epsilon_{\text{gemittelt}} = 51500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
D2	13	4	4	
Lewis <i>et. al.</i>	19240	22160	536	
Gray <i>et. al.</i>	19370	22000	500	$\epsilon_{\text{gemittelt}} = 41900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
F14	11	4	4	
Lewis <i>et. al.</i>	16280	22160	536	
Gray <i>et. al.</i>	16390	22000	500	$\epsilon_{\text{gemittelt}} = 38900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

6.11 SPR-Bindungsstudien

Alle durchgeführten SPR-Bindungsstudien wurden an den Geräten Biacore *J*, Biacore *3000* oder Biacore *T100* bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Da kleinste Änderungen des Dunkelfeldwinkels detektiert werden sollen und die Flusszellen extrem geringe Volumina aufweisen (Höhe: 100, 20 und 50 µm), wurden alle verwendeten Lösungen filtriert (0.22 µm) und durch Ultraschall entgast, wobei das Biacore *T100* letzteres systemintegriert vollzieht. Die Reinigung des Mikrofluidiksystems erfolgte durch Injektion von 0.5% (w/v) SDS-Lösung (Biacore) gefolgt von 50 mM Glycin pH 9.5 (Biacore). Desinfektion wurde durch Einsatz verdünnter Hypochloridlösung erreicht.

6.11.1 Immobilisierung von Peptiden durch Aminkupplung

Bei allen zur Immobilisierung von Peptiden notwendigen Schritten wurde ddH₂O als Laufpuffer gewählt. Die Aktivierung der Carboxylatfunktionen der CM-Chipoberfläche eines CM5-, CM3- oder CM5-SeriesS-Chips erfolgte Geräte-unabhängig durch 8-15 min Injektion von unmittelbar zuvor vermischten NHS- und EDC-Lösungen (1:1, Biacore) bei geringer Flussrate (5-10 µL/min). Es wurde darauf geachtet, dass die immobilisierte NHS/EDC-Stoffmenge einer Antwort von mindestens 300 RU entsprach. Gegebenenfalls wurde durch erneute Injektion ein entsprechendes Aktivierungslevel erreicht. Zur Immobilisierung von Peptiden wurden diese in Konzentrationen von 1 mg/mL in 10 mM Acetatpuffer pH 5.0 oder pH 4.5 (Biacore) gelöst und zunächst für 8 min bei einer Flussrate von 10 µL/min über die Oberfläche der entsprechenden Flusszelle geleitet. Darauf folgend wurden zusätzliche Intervalle von Peptidinjektionen durchgeführt bis eine gewünschte Stoffmenge auf der Oberfläche immobilisiert wurde. Im Anschluss erfolgte die Blockierung nicht umgesetzter Carboxylatfunktionen durch 8 min Umsetzung mit 1.0 M Ethanolamin-HCl pH 8.5 (Biacore). Die Referenzzelle wurde analog aktiviert und direkt im Anschluss mit Ethanolamin-HCl geblockt. Als immobilisierte Stoffmenge gilt per Konvention die Differenz des RU-Wertes der entsprechenden Flusszelle vor der Aktivierung und nach Blockierung mit Ethanolamin. Es gilt die Näherung, dass 1 RU einem Picogramm immobilisierter Masse entspricht.

6.11.2 Immobilisierung von gp120-Isolaten durch Aminkupplung

Die Immobilisierung von gp120-Isolaten wurden an einem Biacore *T100* Gerät mit CM5-SeriesS-Chips mit PBS (0.005% Tween20 (v/v)) als Laufpuffer durchgeführt. Die Aktivierung mit NHS/EDC bei 10 µL/min führte zu Aktivierungen von 294-376 RU auf den entsprechenden Flusszellen. Teilweise waren dazu Injektionsintervalle von bis zu 15 min notwendig. Zur Immobilisierung der gp120-Isolate wurden 3 µL der Stammlösungen

(~ 1 mg/mL PBS) zu 50 μ L 10 mM Acetat-Puffer pH 5.0 (Biacore) gegeben. Durch schrittweise Injektionen wurden grob einheitliche Immobilisierungsniveaus erhalten. Die Blockierung freier Carboxylatfunktionen wurde durch 12 min Injektion von 1.0 M Ethanolamin-HCl pH 8.5 (Biacore) erreicht. Zur Referenzierung wurde auf der ersten Flusszelle (Fc1) durch analoges Vorgehen BSA immobilisiert. Die finalen Mengen an Immobilisat betragen 7200-9800 RU.

6.11.3 Immobilisierung von Peptiden durch Thiolkupplung

Bei der Immobilisierung von Peptiden, die über Disulfidbrücken kovalent gebunden werden sollten, mussten im Anschluss an die NHS/EDC-Aktivierung (10 μ L/min, 1000 s, Laufpuffer: ddH₂O) reaktive Disulfidbindungen eingeführt werden. Dieses geschah durch eine 80 mM PDEA- und 0.1 M Natriumborat-Lösung (pH 8.5) bei einer Flussrate von 5 μ L/min für 240 s, wobei ein Rückgang der RU-Werte von 200 bis 2000 RU beobachtet wurde. Von den zu immobilisierenden Peptiden wurden mit 10 mM Acetatpuffer pH 4.0 (Biacore) Lösungen von 1 mg/mL hergestellt. Die Injektion der Lösungen erfolgte bei Flussraten von 5 bis 10 μ L/min für 90 bis 240 s. Im Falle der Thiolkupplung erfolgte das Blockieren reaktiver Gruppen durch eine filtrierte Lösung aus 50 mM L-Cystein, 1 M NaCl und 10 mM Acetatpuffer pH 4.0 (Biacore) bei einer Flussrate von 5 μ L/min für 5 min. Als Referenz diente das Peptid pR_{GIC}, welches in analoger Weise immobilisiert werden konnte. Es wurden finale Werte von 2000-6500 RU erzielt.

6.11.4 Aufnahme und Auswertung von Messreihen

Als Laufpuffer wurde bei Messungen mit über Amin-gekoppelten Peptiden PBS und bei allen anderen Messungen PBS mit 0.005% Tween20 (v/v) verwendet. Eingesetzte scFv-Stammlösungen wurden zumeist in der als Laufpuffer eingesetzten Puffercharge dialysiert (Slide-A-Lyzer MINI, 3.5 kD MWCO), um Sprünge in Sensorgrammen durch Inhomogenitäten der Pufferzusammensetzungen zu vermeiden.

Am Biacore *J* und *3000* wurden die Messungen nicht-automatisiert vorgenommen und die Auswertung der Daten erfolgte mit der BIAevaluation Software 3.0 und Origin 6.1. Die Biacore *T100* Control-Software bietet modifizierbare Prozeduren für die automatisierte Aufnahme von Konzentrationsreihen zur Analyse der Kinetik und Affinität an, welche zur Vermessung von scFv-Lösungen im Konzentrationsbereich von 50-1200 nM eingesetzt wurden (Wizard Template: *Kinetics/Affinity*, erweitert auf „multi“ Detektion). Die Datenanalyse erfolgte mit der Biacore *T100* Evaluations Software (1.1), welche durch Abzug eines Puffer-Sensorgramms neben dem Abzug der Referenzzelle eine zusätzliche Referenzierungsmöglichkeit anbietet. Zur Ermittlung der Affinitäten über die

Gleichgewichtswerte wurde aufgrund von teilweise unzutreffenden Achsenabschnittswerten für $c = 0$ M zusätzlich die Software Origin 6.1 verwendet.

Die Injektionsdauern betragen 3 bis 4 min bei Flussraten von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Biacore *T100*) und 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Biacore *J*), wobei letztere Flussrate wohl zu Massentransportlimitierungen führt. Konzentrationsreihen wurden beginnend mit der niedrigsten Konzentration aufgenommen. Die Regeneration der Chipoberfläche wurde nach einer Dissoziationsphase von 4 bis 6 min durch kurze Injektionen von 50 mM HCl-Lösung (5-10 s, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$) erreicht. Im Laufe der Aufnahme von Konzentrationsreihen kam es teilweise zu Verschiebungen der Basislinie um bis zu 10% der höchsten RU-Werte. Doppelbestimmungen sowie Kontrollen durch Pufferinjektionen sicherten jedoch die Qualität der Daten ab.

Für die Analyse der Kinetik mit der Biacore *T100* Evaluations Software (1.1) nach dem bivalenten Bindungsmodell wurde die Konzentration der scFv nachträglich halbiert und die Molmasse verdoppelt, bevor eine mathematische Anpassung an den Kurvenverlauf durchgeführt wurde.

6.11.5 Konkurrenzexperimente zur Epitopbestimmung am Biacore *T100*

Eine vorgegebene Prozedur zur Ermittlung von Affinität eines Liganden in Lösung (Wizard Template: *Affinity in Solution*) wurde für kompetitive Experimente zur Ermittlung des Epitops von **P2** scFv bezüglich des V3-Glycopeptids verwendet. Diese Methode beinhaltet die vorhergehende Aufnahme einer Konzentrationsreihe von **P2** scFv mit immobilisiert vorliegendem Glycopeptid *p1c*_{S291C} im Konzentrationsbereich von 11-64 nM. Die unten aufgeführten Konzentrationen von Peptidfragmenten wurden jeweils zu einer 32 nM Lösung von **P2** scFv gegeben.

	<i>Peptidsequenz</i>	<i>Peptidkonzentration I</i>	<i>Peptidkonzentration II</i>
p7	SVEINSTR	980 μM c (scFv P2) = 32 nM	98 μM c (scFv P2) = 32 nM
p4c	RPNN(Chi)NTRKS	1550 μM c (scFv P2) = 32 nM	155 μM c (scFv P2) = 32 nM
p8	KSIHI	1120 μM c (scFv P2) = 32 nM	112 μM c (scFv P2) = 32 nM

Aus der Abnahme der frei vorliegenden scFv-Konzentration mit zunehmender Peptidkonzentration konnte rechnerisch die Affinität der Peptidsegmente zu den scFv ermittelt werden. Peptidkonzentrationen im zweistelligen mM-Bereich führten unabhängig vom eingesetzten Peptid zu sprunghaften Kurvenverläufen der Sensorgramme.

6.12 STD NMR Spektroskopie

6.12.1 Phagenpräparation für STD NMR Experimente

Eine 50 mL Übernachtkultur (30 °C) von Phagemidvektor tragenden *E. coli* TG1-Zellen diente als Ausgangsmaterial für eine NMR-Probe (600 µL). Die Phagen wurden wie in Kapitel 6.8 beschrieben durch Fällung mit Polyethylenglycol 6000 isoliert. Nach Resuspension in PBS (10 mL) und Zentrifugation zur Abtrennung von Zellresten (8000 xg, 10 min, 4 °C) wurde über Nacht gegen 5 L PBS bei 4 °C dialysiert (Float-A-Lyzer, MWCO 100 kD), um in NMR-Experimenten störendes PEG möglichst quantitativ zu entfernen. Der Austausch von PBS gegen D₂O-PBS erfolgte durch Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 100 kD) bei gleichzeitiger Konzentrierung der Probe auf 600 µL Probenvolumen.

6.12.2 Probenbereitung für STD NMR Experimente mit scFv

Um letzte Spuren von Imidazol aus der Probe zu entfernen, wurden die durch His₆-Aufreinigung isolierten scFv gegebenenfalls zweimal gegen PBS bei 4 °C dialysiert (Slide-A-Lyzer Cassettes, MWCO 10 kD). Der Austausch von PBS zu D₂O-PBS unter gleichzeitiger Aufkonzentrierung erfolgte mit Zentrifugalkonzentratoren (Amicon, MWCO 10 kD), wobei diese zuvor mehrfach mit ddH₂O zentrifugiert wurden, um zur Konservierung der Membran vorhandenes Glycerin abzutrennen. Nach erfolgtem Pufferaustausch wurde die Konzentration der scFv-Lösungen erneut photometrisch bestimmt, um Verluste durch die Aufkonzentrierung mit einzubeziehen. Die Proben mit scFv (220 µL) wurden stets in 3 mm NMR-Röhrchen unter Einsatz eines entsprechenden MATCH-Systemes (BRUKER) vermessen.

6.12.3 Aufnahme von STD NMR Spektren

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten STD-Pulsprogramme entsprechen der Natur von pseudo-2D-Spektren, wodurch eine simultane Aufnahme von *on*- und *off*-resonance Spektren in einem Datensatz möglich ist.²⁰⁰ Zur Vorsättigung des Rezeptors wurden Gaußförmige Pulse (gauss1.1k) einer Länge von 50 ms über einen Zeitraum von 2-5 min (t_{sat}) bei -0.5 ppm (*on*) und +40 ppm (*off*) mit einer Unterbrechung von jeweils 4 µs eingestrahlt. Von den unten angegeben und im Anhang explizit präsentierten STD-Pulsprogrammen wurde das Programm mit *Spinlock*-Filter routinemäßig verwendet.

std19sp2d_4.bc (ohne *Spinlock*-Filter)

std.t4_w5.th (mit *Spinlock*-Filter)

Das Ausmaß der Rezeptorsättigung wurde durch Verwendung des STD-Pulsprogrammes ohne *Spin-Lock*-Pulsfolge bestimmt. Entsprechende Sättigungswerte wurden durch prozentualen Vergleich des STD-Spektrums mit dem *off-resonance* Spektrum erhalten. Die Bestimmung von STD-Artefakten durch Sättigung von Peptidsignalen wurde durch Aufnahme STD-Spektren mit *Spinlock* von reinen Peptidproben bestimmt.

6.12.4 Aufnahme von STD-Titrationsreihen

Für die Aufnahme von Konzentrationsreihen wurden Peptidstammlösungen (1-10 mM in D₂O) angesetzt und von diesen für jeden Titrationspunkt Volumina von 1-3 µL zur Probe gegeben. Dazu wurde die Peptidlösung an den oberen Glasrand des Probenröhrchens pipettiert und nach Aufsetzen der Verschlusskappe die Probe mehrfach invertiert. Auf eine rechnerische Einbeziehung der Probenvolumenzunahme durch Zugabe von Peptidlösungen wurde verzichtet. Die Anzahl der *scans* bei Titrationen mit geringem Überschuss von Peptid variierte zwischen 6 und 9 k pro Messung.

6.12.5 Auswertung von STD-Titrationsreihen

Für die Auswertung der STD-Spektren wurde das *on-resonance* Spektrum so gephaset, dass dem Pulsprogramm folgend negative Signale erhalten wurden. Die Phasen des *off-resonance* Spektrums wurden mit den gleichen Werten phasenkorrigiert, woraus positive Signale resultierten. Die Addition beider Spektren führte zum STD Spektrum. STD-Prozentwerte wurden durch Vergleich mit dem *off-resonance* Spektrum erhalten und sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben. Nicht zu allen Konzentrationen konnten für sämtliche Protonen STD-Prozentwerte ermittelt werden. Gerade bei geringen Konzentrationen waren einige STD-Signalintensitäten nicht vom Rauschen der Grundlinie zu differenzieren. Bei der Auftragung von STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration wurde zudem für einige Datenpunkte offensichtlich, dass diese durch Artefakte stark verfälscht wurden und somit nicht in die Auswertung miteinbezogen werden konnten. Der Verlauf der Datenpunkte bei der Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration wurde mit der Software ORIGIN 6.1 der Gleichung 1.4 angepasst.

Titration: scFv P2 mit V3-Glycopeptid p2c (STRPNN(Chi)NTRKSIHI)

scFv P2 10 μM in 200 μL D₂O-PBS (2 nmol), T = 305 K, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 3$ s, ns = 3 k.

<i>c(p2c)</i> [μM]	125	255	424	678	
Überschuss	13	25	43	68	K_D [μM] mit/ohne 678 μM
I307 α	2.273	2.730	1.650	2.280	linear / 236 ± 153
I309 α	4.760	4.720	2.940	4.840	linear / 253 ± 147
H308 β	1.810	1.480	0.817	1.950	linear / linear
K305 ϵ	1.950	2.020	1.090	1.970	linear / 180 ± 163

Titration: scFv P2 mit V3-Glycopeptid p5c (RPNN(Chi)NTR)

scFv P2 7.58 μM in 200 μL D₂O-PBS (1.52 nmol), T = 305 K, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 3$ s, ns = 6-8 k.

<i>c(p5c)</i> [μM]	25	50	75	100	
Überschuss	3.3	6.7	13	17	K_D [μM]
P α	4.720	3.370	1.580	1.260	12 ± 6
R304 α , T α	4.540	1.940	1.110	1.300	15 ± 20
R298 α , T β	4.400	2.640	1.250	1.330	17 ± 12
GlcNAc'	4.440	1.520	1.600	1.350	32 ± 47
R298(δ)	1.850	1.090	0.380	0.698	63 ± 34
R304(δ)	1.660	1.510	0.500	0.592	29 ± 20
N β (2.79 ppm)	3.630	2.230	1.410	0.968	17 ± 7
Ac'	3.050	1.820	1.190	1.290	107 ± 83
Ac	3.150	1.540	1.360	1.040	50 ± 38
R298 β , β' , R304 β , P299 γ'	2.820	1.510	1.410	1.450	148 ± 95
R304 β'	7.820	6.530	2.850	2.240	14 ± 2
R298 γ , γ'	6.560	3.070	2.080	1.530	9 ± 7
R304 γ , γ'	9.130	5.390	2.220	2.120	7 ± 3
T γ	3.280	2.350	1.560	1.030	29 ± 15

Titration: scFv P2 mit V3-Glycopeptid p4c (RPNN(Chi)NTRKS)

scFv P2 4.9 μM in 220 μL D₂O-PBS (1.10 nmol), T = 305 K, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 3$ s, ns = 6-8 k.

<i>c(p4c)</i> [μM]	9.1	13.6	18.2	22.7	27.3	37.2	66.7	
Überschuss	1.81	2.73	3.64	4.55	5.45	7.27	12.73	K_D [μM]
P299 α	5.550	5.680	3.830	2.830	1.520	1.140	1.120	3 ± 2
S306 α	6.500	5.250	4.850	3.292	1.580	1.060	1.610	8 ± 2
R304 α , K305 α	5.560	5.810	3.280	2.850	1.940	1.320	0.960	2 ± 2
T303 α	5.340	6.020	3.470	2.640	1.620	1.530	1.510	9 ± 5
T303 β	3.510	2.880	2.090	1.780	1.780	1.140	1.150	20 ± 9
R298 α	5.810	4.500	3.780	nb	2.250	1.280	1.140	2 ± 1
R298 δ	2.130	nb	2.120	1.480	nb	0.911	0.994	22 ± 10

R304 δ	2.720	2.440	1.190	1.190	nb	0.701	0.740	15 \pm 9
K305 ϵ	3.540	2.420	2.262	1.230	2.370	1.340	0.910	12 \pm 3
N β 1	3.000	2.540	2.320	2.140	2.310	0.969	1.070	21 \pm 1
N β 2	3.750	3.340	2.480	2.560	2.200	1.050	1.060	21 \pm 3
Ac'	2.480	2.140	2.130	1.520	1.820	1.390	1.280	26 \pm 11
Ac	3.060	2.470	2.100	1.260	2.190	1.580	1.860	25 \pm 7
R298 β,β' , P299 γ'	6.500	5.280	nb	3.510	3.260	2.120	1.520	6 \pm 2
R304 β,β' , K305 β	8.320	5.740	4.820	3.580	3.600	2.290	2.110	10 \pm 5
K305 $\delta,\beta',R298\gamma,\gamma'$	4.410	4.410	2.920	2.360	2.420	1.640	1.320	11 \pm 4
R304 γ,γ'	7.410	7.360	5.960	4.610	5.110	2.227	2.780	21 \pm 4
K305 γ,γ'	5.640	4.940	4.970	4.900	5.220	2.440	2.810	36 \pm 9
T γ	3.420	3.610	3.500	2.380	2.740	1.330	1.420	20 \pm 9
chi (3.90 ppm)	3.300	1.960	1.810	1.910	1.340	1.090	0.855	13 \pm 5
chi (3.45 ppm)	2.260	2.160	1.870	1.690	1.410	1.030	1.330	11 \pm 4

Titration: scFv P2 mit V3-Glycopeptid p2c (STRPNN(Chi)NTRKSIHI)

scFv P2 4.9 μ M in 220 μ L D₂O-PBS (1.10 nmol), T = 305 K, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 3$ s, ns = 6-8 k.

c(p2c) [μ M]	9.1	13.6	18.2	22.7	37.2	50.0	63.6	
Überschuss	1.81	2.73	3.64	4.55	7.27	10.00	12.73	K _D [μ M]
H1'	nb	nb	nb	5.88	4.25	5.11	2.12	12 \pm 30
S306 α	6.65	8.29	9.02	4.03	4.16	4.24	3.26	21 \pm 9
P299 α	8.13	7.16	5.04	2.9	1.79	1.74	1.01	4 \pm 9
T297 α	10.20	5.94	4.54	1.77	1.95	1.36	1.15	3 \pm 5
T303 α	6.55	4.7	3.22	2.43	2.32	1.44	1.34	5 \pm 2
T303 β	5.04	4.46	3.77	2.82	2.12	1.70	1.91	10 \pm 2
I307 α ,R304 α ,T297 β	4.19	3.37	2.94	2.11	1.93	1.54	1.50	17 \pm 5
I309 α	4.97	5.73	5.65	2.82	3.20	3.09	2.41	26 \pm 8
R298 δ	4.29	2.58	2.39	1.35	nb	1.19	0.54	9 \pm 7
R304 δ	4.21	4.23	2.92	1.35	nb	0.98	0.81	2 \pm 3
H308 β	8.88	5.49	4.11	3.65	3.01	2.53	1.93	11 \pm 5
K395 ϵ , H308 β'	4.44	3.25	3.16	2.12	1.38	1.24	1.37	5 \pm 2
N β 1	6.94	3.81	2.14	1.96	1.41	1.43	1.25	13 \pm 11
N β 2	6.73	3.97	2.98	2.79	1.38	1.28	1.10	2 \pm 1
Ac'	3.22	2.32	2.00	1.26	1.13	0.91	0.79	9 \pm 2
Ac	4.25	2.67	1.82	1.46	1.24	1.08	1.17	12 \pm 8
K305 δ	9.04	5.19	4.13	4.19	2.87	3.34	2.91	6 \pm 4
T γ	4.09	2.90	2.25	1.60	1.66	1.13	0.95	11 \pm 4
I309 δ	5.22	4.83	3.97	3.41	2.81	2.30	2.43	23 \pm 3
I307 δ	5.93	4.88	4.56	3.70	3.16	2.84	2.56	30 \pm 11

Titration: scFv D26 mit V3-Glycopeptid p4c (RPNN(Chi)NTRKS)

scFv D26 4.2 μ M in 220 μ L D₂O-PBS (0.93 nmol), T = 305 K, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 3$ s, ns = 7-8 k.

$c(p2c)$ [μM]	4.55	9.09	10.64	18.18	22.73	31.82	
Überschuss	1.10	2.15	3.22	4.30	5.38	7.53	K_D [μM]
$\alpha_{\text{gemittelt}}$	-	-	5.590	5.340	4.445	-	9 ± 1
R δ	6.130	3.750	2.800	3.810	2.540	-	12 ± 4
K ε	-	3.890	3.950	5.720	5.170	1.590	
N β_1	7.800	4.240	4.030	3.430	2.960	-	8 ± 3
N β_2	6.670	4.610	4.520	3.160	3.120	-	9 ± 5
Ac'	2.590	1.990	2.640	1.910	1.630	0.829	15 ± 13
Ac	3.020	2.860	3.110	2.160	2.400	1.320	14 ± 16

STD-Artefakte: Titration von V3-Glycopeptid p4c (RPNN(Chi)NTRKS):

224 μL D₂O-PBS, T = 305 K, $\delta_{\text{sat}} = -0.5$ ppm, $\text{att}_{\text{sat}} = 40$ dB, $t_{\text{sat}} = 3$ s, ns = 7-8 k (kein scFv).

$c(p2c)$ [μM]	9.1	13.6	22.7	37.2	66.7
P299 α	2.94	2.41	0.69	1.31	0.97
S306 α	2.28	2.34	2.27	1.66	1.34
T303 α	4.53	1.64	2.94	1.93	nb
T303 β	2.03	2.3	3.38	1.84	1.38
R298 α	3.95	2.05	0.68	1.31	nb
R298 δ	0.97	1.75	1.49	0.55	0.68
R304 δ	1.87	1.66	0.59	0.58	0.61
K305 ε	2.22	1.53	1.16	0.70	0.65
Ac'	3.07	2.11	2.00	1.31	1.12
Ac	2.15	1.62	2.02	1.82	1.39
T303 γ	2.09	2.05	1.70	1.34	1.16

Anhang

I. Prozeduren für den Syntheseroboter (ACT MOS 496.Ω)

Quellen des Harzes

- 1 Dispense System Fluid DMF (2) 1000µl to Reaktionsblock[1-8]
- 2 Mix for 3.00 minutes at 600 rpm(s)
- 3 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 4 Dispense System Fluid ISOPROPANOL (4) 1000µl to Reaktionsblock[1-8]
- 5 Mix for 3.00 minutes at 600 rpm(s)
- 6 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 7 Dispense System Fluid DMF (2) 1000µl to Reaktionsblock[1-8]
- 8 Mix for 3.00 minutes at 600 rpm(s)
- 9 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 10 Repeat from step 1, 2 times

Fmoc-Abspaltung

- 1 Transfer 1000µl from FlaschenLinks[1](PIPERIDIN) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 2 Mix for 4.00 minutes at 600 rpm(s)
- 3 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 4 Transfer 1000µl from FlaschenLinks[1](PIPERIDIN) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 5 Mix for 8.00 minutes at 600 rpm(s)
- 6 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

Waschen des Harzes

- 1 Dispense System Fluid DMF (3) 1000µl to Reaktionsblock[1-8]
- 2 Mix for 30 seconds at 600 rpm(s)
- 3 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 4 Repeat from step 1, 4 times

Kupplung (15 µmol-Ansatz)

- 1 Dispense System Fluid DMF (2) 300µl to Reaktionsblock[1-8]
- 2 Dispense matrix <SEQUENCE> with 120 µl to Reaktionsblock rack using DMF
- 3 Transfer 150µl from Reagenzien[1](TBTU_0.5M) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 4 Transfer 150µl from Reagenzien[2](DIPEA_1.0M) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 5 Mix for 30.00 minutes at 600 rpm(s)
- 6 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 7 Dispense System Fluid DMF (2) 1500µl to Reaktionsblock[1-8]
- 8 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
- 9 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

- 10 Dispense System Fluid DMF (2) 300µl to Reaktionsblock[1-8]
- 11 Dispense matrix <SEQUENCE> with 120µl to Reaktionsblock rack using DMF
- 12 Transfer 150µl from Reagenzien[1](TBTU_0.5M) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 13 Transfer 150µl from Reagenzien[2](DIPEA_1.0M) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 14 Mix for 60.00 minutes at 600 rpm(s)
- 15 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 16 Dispense System Fluid DMF (2) 1500µl to Reaktionsblock[1-8]
- 17 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
- 18 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

- 19 Dispense System Fluid DMF (2) 300µl to Reaktionsblock[1-8]
- 20 Dispense matrix <SEQUENCE> with 120µl to Reaktionsblock rack using DMF
- 21 Transfer 150µl from Reagenzien[1](TBTU_0.5M) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 22 Transfer 150µl from Reagenzien[2](DIPEA_1.0M) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 23 Mix for 90.00 minutes at 600 rpm(s)

- 24 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 25 Dispense System Fluid DMF (2) 1500µl to Reaktionsblock[1-8]
- 26 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
- 27 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

Kupplung des Glycobausteines

- 1 pause
- < Manuelle Injektion der frisch angesetzten Kupplungslösung in den Reaktionsblock >
- 2 Mix for 3.00 hours at 600 rpm(s)
- 6 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 7 Dispense System Fluid DMF (2) 1500µl to Reaktionsblock[1-8]
- 8 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
- 9 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 10 Pause
- < Manuelle Injektion der frisch angesetzten Kupplungslösung in den Reaktionsblock >
- 11 Mix for 3.00 hours at 600 rpm(s)
- 12 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 13 Dispense System Fluid DMF (2) 1500µl to Reaktionsblock[1-8]
- 14 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

Capping

- 1 Transfer 1500µl from FlaschenMitte[1](Ac2O) to Reaktionsblock[1-8] using DMF (2)
- 2 Mix for 8.00 minutes at 600 rpm(s)
- 3 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

Deacetylierung

- 1 Transfer 1000 µl from Reagenzien[6](DCM) to Reaktionsblock[1-8] using ISOPROPANOL (4)
- 2 Mix for 1.00 minutes at 600 rpm(s)
- 3 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 4 Transfer 1000µl from Reagenzien[7](HYDRAZIN-HYDRAT) to Reaktionsblock[1-8] using ISOPROPANOL(4)
- 10 Mix for 3.00 hours at 600 rpm(s)
- 11 Wait for 10.000 minute(s)
- 12 Mix for 3.00 hours at 600 rpm(s)
- 13 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)

Nachquellen

- 1 Transfer 1000 µl from Reagenzien[6](DCM) to Reaktionsblock[1-8] using ISOPROPANOL (4)
- 2 Mix for 30 seconds at 600 rpm(s)
- 3 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 4 Dispense System Fluid ISOPROPANOL (4) 1000µl to Reaktionsblock[1-8]
- 5 Mix for 30 seconds at 600 rpm(s)
- 6 Empty Reaktionsblock for 1.000 minute(s)
- 7 Repeat from step 1, 2 times
- 8 Empty Reaktionsblock for 6.000 minute(s)

II. Sequenzausschnitt: pHEN2 Phagemidvektor

LMB3

```

----->
TT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTT GCA TGC AAA TTC

                                pelB leader
TAT TTC AAG GAG ACA GTC ATA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA
                                M K Y L L P T A A A G

                                SfiI                NcoI                XhoI
TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAGGTGCAGCTGCAGGTCGACC TCG
L L L L A A Q P A M A                                     S

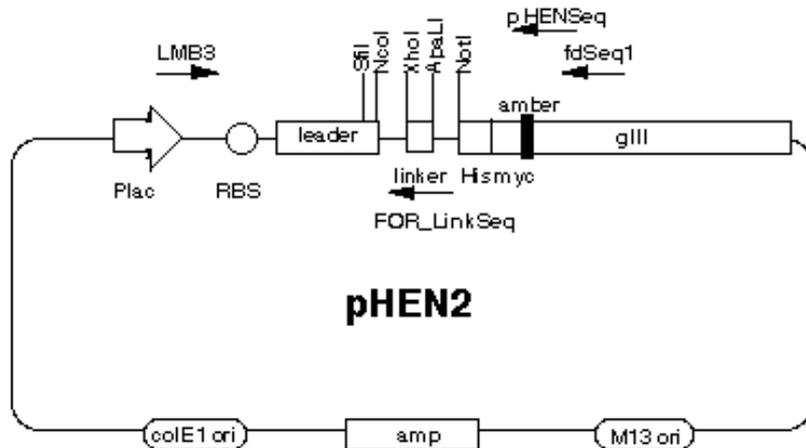
                                FOR_LinkSeq
<-----
AGT GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT AGT GCA CAG GTCCAAC
S G G G G S G G G G S G G S A

                                NotI                6xHis-tag
TGCAGGAGCTCGATATCAAACGGGCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA
                                A A A H H H H H H G A A

                                myc-tag                PHEN-SEQ
GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA
E Q K L I S E E D L N G A A *
                                <-----Amber
                                E T V E

                                fdSeq1
<-----
AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT ACA GAA AAT TCA TTT ...
S C L A K P H T E N S F ...

```



III. Sequenzen ausgewählter Klone

scFv D2

```

atggccgaggtgagcagctgggtggantntgggggnagggcgtgggtccagcctgggaggtccntg   60
(M)(A) E V Q L V X X G X G V V Q P G R S X
agactctcctgtgagcagctctggattcaccttcagtagctatgctatgactgggtccgc   120
R L S C A X S G F T F S S Y A M H W V R
caggctccaggcaaggggctggagtggggtggcagttatatcatatgatggaagcaataaa   180
Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K
tactacgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacg   240
Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
ctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgtattactgtgcaaga   300
L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
gttaagcataagatgaataagggtaggtggggccaaggtaccctgggtcaccgtctcgagt   360
V K H K M N K G R W G Q G T L V T V S S
ggtagggcggttcaggcggaggtggctctggcggttagtgacttgacatccagttgacc   420
G G G G S G G G G S G G S A L D I Q L T
cagtctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccaggcg   480
Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q A
agtcaggacattagcaactatTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG   540
S O D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P K
ctcctgatctacgatgcacccaatttggaaacaggggtcccatcaaggttcagtggaagt   600
L L I Y D A S N L E T G V P S R F S G S
ggatctgggacagatTTTACTTTCCCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACA   660
G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T
tattactgtcaacagtatgataatctccacacggttcggccaagggaccaagctggaaatc   720
Y Y C Q Q Y D N L H T F G Q G T K L E I
aaacgtgcccgcacatcatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaaactcatctca   780
K R A A A H H H H H H H G A A E Q K L I S
gaagaggatctgaatggggccgcatag
E E D L N G A A ***

```

scFv D26

atggcccaggtgcagctggtgagctctggggctgaggugaagaagcctggggcctcagtg 60
 (M)(A) Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
 aaggtttcctgcaaggttctggatacaccttactagctatgctatgcattgggtgctg 120
 K V S C K A S G Y T F T S Y A M H W V R
 caggcccccgacaaaaggttgagtggatggatggatcaacgctggcaacggtaacaca 180
 Q A P G Q R L E W M G W I N A G N G N T
 aaatattcacagaagttccagggcagagtcaccattaccagggacacatccgagcaca 240
K Y S Q K F Q G R V T I T R D T S A S T
 gcctacatggagctgagcagcctgaggtctgaagacacggcctgtattactgtgcaaga 300
 A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
 gggaaagcttcataagtttgagcggcctaagcattggggccaaggtaccctggtcaccgtc 360
G K L H K F E R P K H W G Q G T L V T V
 Tcgagtggaggagcgttccagggcaggtggtctctggcgttagtgacgtgacatccag 420
 S S G G G S G G G S G G S A R D I Q
 Ttgaccagctctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgc 480
 L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
 Caggcgagtcaggacattagcaactatttaaattgggtatcagcagaaaccagggaaagcc 540
Q A S O D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A
 cctaagctcctgatctacgatgcatccaatttggaaacaggggtcccatcaaggttcagt 600
 P K L L I Y D A S N L E T G V P S R F S
 Ggaagtggatctgggacagattttactttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatatt 660
 G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I
 Gcaacatattactgtcaacagtatgataatctccgtacgttcggccaagggaccaaggtg 720
 A T Y Y C Q O Y D N L R T F G Q G T K V
 Gaaatcaaacgtgcccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaaactc 780
 E I K R A A A H H H H H H G A A E Q K L
 atctcagaagaggatctgaatggggccgcatag
 I S E E D L N G A A ***

scFv F14

atgggvcgaggtgcagctggtgagtttggggaggcctgtacagcctggggggtccctgaga 60
 (M)(G) E V Q L V S L G R U V Q P G G S L R
 ctctcctgtcagcctctggattcaccttaagccttagcagctatgccctgggtccgcca 120
 L S C T A A S G F T L S S Y A M S W V R Q
 gctccagggaaagggctggagtggtctcagctattagtggtagtggtgtagcacatac 180
 A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y
 tacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctg 240
Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L
 tatctgcaaatgaacagcntgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcaagaact 300
 Y L Q M N S X R A E D T A V Y Y C A R T
 aagcataagcagggcgaagcctcctcgtgattggggccaaggtaccctggtcaccgtctcg 360
K H K Q A K P P R D W G Q G T L V T V S
 agtgggtggaggcgttcaggcggaggtggctctggcgttagtgactttcttctgagctg 420
 S G G G G S G G G G S G G S A L S S E L
 actcag accctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgccaagga 480
 T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G
 gacagcctcagaagccattatgcaagctggtaccagcaaaagccaggacaggcccctgta 540
D S L R S H Y A S W Y Q Q K P G Q A P V
 cttgtcatctatggtaaaaaaacaccggccctcagggatcccagaccgattctctggctcc 600
 L V I Y G K N N R P S G I P D R F S G S
 Gaaacacagcttcttgaccatcacatcactggggctcaggcgggaagatgaggctgac 660
 S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D
 tattactgtaactcccgggacagcagtggttaaccataggtattcggcggaggacaaa 720
 Y Y C N S R D S S G N H M V F G G G T K
 ctgaccgtcctaggtgcccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaaa 780
 L T V L G A A A H H H H H H G A A E Q K
 ctcatctcagaagaggatctgaatggggccgcatag
 L I S E E D L N G A A ***

scFv F62

atggccgaggtgcagctgggtggagctcgggggagggcttggtacagcctggggggcctctg 60
 (M)(A) E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L
 agactctcctgtgcagcctctggattcaccttttagcagctatgcatgagctgggtccgc 120
 R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R
 caggctccaggaaggggctggagtggtctcagctattagtggtagtggtggttagcaca 180
 Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T
 tactacgcagactccgtgaagggccgggttcaccatctccagagacaattccaagaacag 240
Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
 ctgtatctgcaaataaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcaaga 300
 L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
 gataatgctaagcgtaagaatcagagttggggccaaggtaccctgggtcaccgtctcgagt 360
D N A K R K N Q S W G Q G T L V T V S S
 ggtggaggcgggttcaggcggggtggctctggcggtagtgactttcttctgagctgatt 420
 G G G G S G G G S G G S A L S S E L I
 caggaccctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgccaaggagac 480
 Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G D
 agcctcagaagctattatgcaagctgggtaccagcagaagccaggacaggcccctgtactt 540
S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L
 Gtcatctatggtaaaaacaaccggccctcagggatcccagaccgattctctggctccagc 600
 V I Y G K N N R P S G I P D R F S G S S
 Tcaggaaacacagcttcccttgaccatcactggggctcaggcgggaagatgaggctgactat 660
 S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y
 Tactgtaactcccgggacagcagtggtactgtattcggcggaggaccagaagctgaccgtc 720
 Y C N S R D S S G T V F G G G T K L T V
 Ctaggtgcccgcacatcatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaaactcatctca 780
 L G A A A H H H H H H G A A E Q K L I S
 gaagaggatctgaatggggccgcatag
 E E D L N G A A ***

scFv L72

atggcccaggtgcagctgggtgcagctcgggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtg 60
 (M)(A) Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
 aaggctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccagttatgatatcaactgggtgcca 120
 K V S C K A S G Y T F T S Y D I N W V R
 caggccactggacaagggcttgagtggtatgggatgaaccctaacagtggttaacaca 180
 Q A T G Q G L E W M G W M N P N S G N T
 ggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggaacacctccataagcaca 240
G Y A Q K F Q G R V T M T R N T S I S T
 gcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcaaga 300
 A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
 cctattgcatgagggattcgtgggtggggccaaggtaccctgggtcaccgtctcgagtgg 360
P I A M R D S W W G Q G T L V T V S S G
 ggaggcgggttcaggcgggaggtggctctggcggtagtgactttcttctgagctgactcag 420
 G G G S G G G S G G S A L S S E L T Q
 gaccctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgccaaggagacagc 480
 D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G D S
 ctcagaagctattatgcaagctgggtaccagcagaagccaggacaggcccctgtacttgtc 540
L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V
 atctatggtaaaaacaaccggccctcagggatcccagaccgattctctggctccagctca 600
 I Y G K N N R P S G I P D R F S G S S
 ggaaacacagcttcccttgaccatcactggggctcaggcgggaagatgaggctgactattac 660
 G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y
 tgtaactcccgnacagcagtgataaccatancggtgtattcggcngagggaccagaagctg 720
 C N S R X S S D N H X R V F G X G T K L
 accgtcctaggtgcccgcacatcatcatcaccatcacggggccncagaacaaaaa 780
 T V L G A A A H H H H H H G A X E Q Q K
 ctcatctcagaagaggatctgaatggggccgcatag
 L I S E E D L N G A A ***

scFv P2

atggccgaggtgcagctgggtggagtctgggggaggtgtggtacggcctggggggctccctg 60
 (M)(A) E V Q L V E S G G G V V R P G G S L
 agactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatggcatgagctgggtccgc 120
 R L S C A A S G F T F D D Y G M S W V R
 caagctccaggggaaggggctggagtgggtctctggtattaattggaatggtagcaca 180
 Q A P G K G L E W V S G I N W N G G S T
 ggttatgcagactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcc 240
G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S
 ctgtatctgcaaatgaacagtctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcaaga 300
 L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
 ggtaagggctcttggttaagtataagcgtttttggggccaaggtaccctggtcaccgtctcg 360
G K G L G K Y K R F W G Q G T L V T V S
 agtgggtggagcggttcaggcgaggttggtctggcggtagtgcacttcagtctgtgctg 420
 S G G G G S G G G G S G G S A L Q S V L
 acgcagccgacctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgcactggg 480
 T Q P P S V S G A P G Q R V T I S C T G
 agcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagcttcaggaaca 540
S S S N I G A G Y D V H W Y Q Q L P G T
 gccccaaactcctcatctatgtaacagcaatcggccctcaggggtccctgaccgattc 600
 A P K L L I Y G N S N R P S G V P D R F
 tctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcactgggctccaggctgaggat 660
 S G S K S G T S A S L A I T G L Q A E D
 gaggtgattattactgccagtcctatgacagcagcctgagtgattcggcgaggaggacc 720
 E A D Y Y C Q S Y D S S L S V F G G G T
 aagctgaccgtcctaggtgcygcccacatcatcaccatcacggggccncagaacaa 780
 K L T V L G A A A H H H H H H G A X E Q
 caaaaactcatctcagaagaggatctgaatggggccgcatag
 Q K L I S E E D L N G A A ***

scFv anti-Hel (hyhel10)

gacgtgcagcttcaggagtcaggacctagcctcgtgaaaccttctcagactctgtccctc 60
 D V Q L Q E S G P S L V K P S Q T L S L
 acctgttctgtcactggcgactccatcaccagtgattattggagctggatccggaaattc 120
 T C S V T G D S I T S D Y W S W I R K F
 ccagggaaatagacttgagtacatgggtacgtaagctacagtggttagcacgtactacaat 180
 P G N R L E Y M G Y V S Y S G S T Y Y N
 ccatctctcaaaaagtcgaatctccatcactcgcagacacatccaagaatcagtactatctg 240
P S L K S R I S I T R D T S K N Q Y Y L
 gagctgaattctgtgactactgaggacacagccacatattactgtgcaaaactgggacggg 300
 D L N S V T T E D T A T Y Y C A N W D G
 gattactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggaggcgggttcaggcgga 360
D Y W G Q G T T V T V S S G G G S G G
 ggtggctctggcggtggcggtatcgacattgtgctgaccagctctccagccacctgtct 420
 G G S G G G S D I V L T Q S P A T L S
 gtgactccagggaaatagcgtcagccttctcagggccagccaaagtattggcaacaac 480
 V T P G N S V S L S C R A S Q S I G N N
 ctacactgggtatcaacaaaaatcacatgagctcctaaggcttctcatcaagtatgcttcc 540
L H W Y Q Q K S H E S P R L L I K Y A S
 cagtcctatctctgggatcccctccagggttcagtggcagtgatcagggacggatttctc 600
Q S I S G I P S R F S G S G S G T D F T
 ctcagtatcaacagtgtggagactgaagattttggaatgtatttctgtcaacagagtaac 660
 L S I N S V E T E D F G M Y F C Q Q S N
 agctggccgtycacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaa
S W P X T F G G G T K L E I K

IV. STD NMR Pulsprogramme

pseudo 2D Variante mit w5-Wasserunterdrückung und Spinlocksequenz

```
std.t4_w5.th
;avance-version (03/10/10)
;1D sequence
;for saturation transfer difference
;with shaped pulse train for saturation on f2 channel
;with spinlock to suppress protein signals
;alternating between on and off resonance
;to be defined by fq2list
;
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1784-1788 (1999)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. 111, 1902-1906 (1999).

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

"d12=20u"

"p29=d29"

"l5=d20/p13+0.5"
"d31=p13*15"

"DELTA1=d1-d31"

1 ze
  10u st0
2 30m
  4u BLKGRAD
  d12 fq2:f2 st

  50u UNBLKGRAD
  4u pl10:f1
  (p17 ph2)
  (p17*2 ph3)
  4u
  p30:gp1
  10m pl1:f1
  4u BLKGRAD

  DELTA1

3 (p13:sp13 ph4):f2
  4u
  lo to 3 times l5

  p1 ph1

  4u pl29:f1
  (p29 ph21)

  50u UNBLKGRAD
  p16:gp2
  d16 pl18:f1
  p28*0.0867 ph5
```

```

d19*2
p28*0.2056 ph5
d19*2
p28*0.4133 ph5
d19*2
p28*0.7822 ph5
d19*2
p28*1.4911 ph5
d19*2
p28*1.4911 ph6
d19*2
p28*0.7822 ph6
d19*2
p28*0.4133 ph6
d19*2
p28*0.2056 ph6
d19*2
p0*0.0867 ph6
46u
p16:gp2
d16
go=2 ph31
30m wr #0 if #0
4u BLKGRAD
d31
exit

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

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default) [120 dB]
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p129: f1 channel - power level as for TOCSY-spinlock
;sp13: f2 channel - shaped pulse for saturation [35 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - high power pulse
;p13: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p29: f1 channel - trim pulse
;p30: gradient pulse [5 msec]
;d1 : relaxation delay: 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d20: saturation time
;d29: spinlock time [10 - 50 msec]
;d31: saturation time as executed
;l5: loop for saturation: (p11 + d20) * l5 = saturation time
;NS: 16 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 16
;gp1: gradient for spinlock
;gp2: gradient for watersupression
;define FQ2LIST (irradiation frequencies, alternating on/off resonance)
; (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/f1")

;use gradient ratio: gp 1

```

```
; 40
```

```
;for z-only gradients:
```

```
;gpz1: 40%
```

```
;gpz2: 20%
```

```
;use gradient files:
```

```
;gpnam1: SINE.100
```

```
;$Id: $
```

pseudo 2D Variante mit w19-Wasserunterdrückung ohne Spinlocksequenz

```
;std19sp2d_2.bc
```

```
;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry
```

```
;University of Hamburg, Germany
```

```
;email: bernd_meyer@sgi1.chemie.uni-hamburg.de
```

```
;avance-version
```

```
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
```

```
;presaturation by shaped pulses
```

```
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list
```

```
;using different memory buffers for on- and off-resonance irradiation
```

```
;water suppression by wtergate, use p3919gp to optimize parameters
```

```
;define 1H on channel f2 in edasp
```

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

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

```
1 ze
```

```
10u st0
```

```
2 20u p11:f1
```

```
d7 fq1:f2 st
```

```
3 p11:sp1:f2
```

```
d11
```

```
lo to 3 times l7
```

```
p1 ph1
```

```
50u UNBLKGRAD
```

```
p16:gp1
```

```
d16 p118:f1
```

```
p28*0.231 ph3
```

```
d19*2
```

```
p28*0.692 ph3
```

```
d19*2
```

```
p28*1.462 ph3
```

```
d19*2
```

```
p28*1.462 ph4
```

```
d19*2
```

```
p28*0.692 ph4
```

```
d19*2
```

```
p0*0.231 ph4
```

```
46u
```

```
p16:gp2
```

```
d16
```

```
4u BLKGRAD
```

```
go=2 ph31
```

```
30m wr #0 if #0
```

```
exit
```

```
ph1=0 2
```

```
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
```

```
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
```

```
ph31=0 0 2 2
```

```
*****Power Level*****
```

```
;
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
```

```
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
```

```
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
```

```
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
```

```
;
```

```
;
```

```
*****Pulse*****
```

```
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
```

```
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
```

```
; use for fine adjustment
```

```
;
```

```
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
```

```
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
```

```
;
```

```
;
```

```
*****Delays*****
```

```
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

```
;d7 : additional delay (if necessary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
```

```
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
```

```
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
```

```
;d19: delay for binomial water suppression
```

```
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
```

```
; d19 should be around 150-220 usec.
```

```
;
```

```
;
```

```
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
```

```
;
```

```
;
```

```
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
```

```
; O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ)
```

```
; on frequency list f1.
```

```
;NBL = number of memory buffers with TD size = 2 for two irradiation frequencies
```

```
;td1 = NBL = 2
```

```
;this pulse program produces a ser file (PARMOD = 2D)
```

```
;NS" = NS*2+DS"
```

```
;DS" = DS/2
```

```
;use gradient ratio gp1 : gp2
```

```
; 20 20
```

```
;
```

V. Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

gemäß Gefahrstoffliste, Richtlinie 67/548/EWG, Anhang I

Substanzname (Abkürzung)	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid (Ac ₂ O)	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril (MeCN)	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25.62	53-45
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	-
Ammoniumpersulfat (APS)	Xn, O	8-22-36/37/38-42/43	2-22-24-26
Ampicillin Natriumsalz	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
2,2'-Azino-bis(2-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) diammonium-Salz (ABTS)	-	-	-
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)	Xi	5/36/37/38	26-36
Chitin	-	-	-
Borsäure	-	-	-
Chloroform (CHCl ₃)	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
a-Cyano-4-hydroxycimtsäure (CCA)	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
L-Cystein	Xn	22	-
Dichlormethan (DCM)	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
N,N'-Diisopropylethylamin (DIPEA)	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
Ethanol	F	11	7-16
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	C	20/21/22-34-42/43	26-36/37/39-45
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Xn	22-36/37/38	26-36
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	T	61-E20/21-36	53-45
Essigsäure (HOAc)	C	10-35	23.2-26-45
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	-
Glycin	-	-	24/25
Hydrazinhydrat	T, N	45-10-23/24/25-34-43-50/53	53-45-60-61
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	-	-	24/25
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	-	-	-
Kanamycinsulfat	T	61	26-36/37/39-45
Methanol (MeOH)	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45

Natrium	F, C	14/15-34	(1/2)5*-8-43-45
Natriumacetat	-	-	24/25
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat	-	-	-
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Xn	22-36/38	26-36
Natronlauge	C	35	26-37/39-45
Natriumsulfat	-	-	-
Ni-NTA Agarose	Xn	10-22-40-42/43	13-26-36-46
Piperidin (Pip)	F, T	11-23/24-34	(1/2)-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
2-(2-Pyridinyldithio)- ethanaminhydrochlorid (PDEA)	Xn	21/22	36/37/38
Salzsäure konz.	C	34-37	26-36/37/39-45
Sinapinsäure (SA)	Xi	36/37/38	26-37/39
<i>N,N,N'</i> - Tetramethylethylendiamin (TEMED)	F, C	11-20/22	16-26-36/37/39-45
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Triethylamin (TEA)	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39- 45
Trifluoressigsäure (TFA)	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan (TIPS)	Xi	10-36/37/38	26-36
Wasserstoffperoxid	Xn	5-8-20/22-35	17-26-28-36/37/39-45
Zitronensäure	Xi	36	24/25

Literaturverzeichnis

1. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. Morb Mortal Wkly Rep **30**, 250-2 (1981).
2. UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2005. Joint United Nations Program on HIV/AIDS (2005).
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., Safai, B., and et, a.l. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science **224**, 500-3 (1984).
5. Wainberg, M.A. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. AIDS **18** Suppl 3, S63-8 (2004).
6. Azevedo-Pereira, J.M., Santos-Costa, Q., and Moniz-Pereira, J. HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. Curr HIV Res **3**, 3-16 (2005).
7. Geretti, A.M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. Curr Opin Infect Dis **19**, 1-7 (2006).
8. Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Mpoudi Ngole, E., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F. *et al.* Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. Science (2006).
9. Haseltine, W.A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB J **5**, 2349-60 (1991).
10. Wyatt, R. and Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science **280**, 1884-8 (1998).
11. Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature **312**, 763-7 (1984-1985).
12. Janeway, C. and Travers, A. Immunology. Elsevier/Spektrum, (2002).
13. Moore, J.P., Kitchen, S.G., Pugach, P., and Zack, J.A. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses **20**, 111-26 (2004).
14. Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., de Goede, R.E., van Steenwijk, R.P., Lange, J.M., Schattenkerk, J.K., Miedema, F., and Tersmette, M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. J Virol **66**, 1354-60 (1992).
15. Smyth, R.J., Yi, Y., Singh, A., and Collman, R.G. Determinants of entry cofactor utilization and tropism in a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary isolate. J Virol **72**, 4478-84 (1998).
16. Lusso, P. HIV and the chemokine system: 10 years later. EMBO J **25**, 447-56 (2006).
17. Wang, W.K., Chen, M.Y., Chuang, C.Y., Jeang, K.T., and Huang, L.M. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. J Microbiol Immunol Infect **33**, 131-40 (2000).
18. Bukrinskaya, A.G. HIV-1 assembly and maturation. Arch Virol **149**, 1067-82 (2004).
19. Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J.E., Markowitz, M., Moore, J.P., Perelson, A.S., and Ho, D.D. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. Lancet **354**, 1782-5 (1999).
20. Bartlett, J.G. and Moore, R.D. Improving HIV therapy. Sci Am **279**, 84-7, 89 (1998).
21. McCune, J.M. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. Nature **410**, 974-9 (2001).

22. Nowak, M.A., Anderson, R.M., Boerlijst, M.C., Bonhoeffer, S., May, R.M., and McMichael, A.J. HIV-1 evolution and disease progression. *Science* **274**, 1008-11 (1996).
23. Turville, S., Wilkinson, J., Cameron, P., Dable, J., and Cunningham, A.L. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol* **74**, 710-8 (2003).
24. Burleigh, L., Lozach, P.Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* **80**, 2949-57 (2006).
25. Gallay, P. Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect* **6**, 617-22 (2004).
26. Saphire, A.C., Bobardt, M.D., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P.A. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol* **75**, 9187-200 (2001).
27. McDougal, J.S., Kennedy, M.S., Sligh, J.M., Cort, S.P., Mawle, A., and Nicholson, J.K. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382-5 (1986).
28. Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., and Sodroski, J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-83 (1996).
29. National Institutes of Health. NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Division of NIAID.
30. Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., and Moore, J.P. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**, 184-7 (1996).
31. Freed, E.O., Myers, D.J., and Risser, R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4650-4 (1990).
32. Weiss, C.D. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Rev* **5**, 214-21 (2003).
33. Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T., and Krausslich, H.G. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* **79**, 1581-94 (2005).
34. Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N., and Gregory, T.J. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**, 10373-82 (1990).
35. Zhu, X., Borchers, C., Bienstock, R.J., and Tomer, K.B. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* **39**, 11194-204 (2000).
36. Kornfeld, R. and Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-64 (1985).
37. McMichael, A.J. and Hanke, T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med* **9**, 874-80 (2003).
38. 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**, 648-59 (1998).
39. Huang, C.C., Tang, M., Zhang, M.Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R.L., Dimitrov, D.S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I.A., Wyatt, R., and Kwong, P.D. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**, 1025-8 (2005).
40. 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).
41. Lindner, M. Synthese und Analyse von V3-Peptiden aus dem gp120 des HIV-1. Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg (2003).
42. Wang, W.K., Dudek, T., Zhao, Y.J., Brumblay, H.G., Essex, M., and Lee, T.H. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A **95**, 5740-5 (1998).
43. Suphaphiphath, P., Thitithanyanont, A., Paca-Uccaralertkun, S., Essex, M., and Lee, T.H. Effect of amino acid substitution of the V3 and bridging sheet residues in human immunodeficiency virus type 1 subtype C gp120 on CCR5 utilization. *J Virol* **77**, 3832-7 (2003).
 44. de Parseval, A., Bobardt, M.D., Chatterji, A., Chatterji, U., Elder, J.H., David, G., Zolla-Pazner, S., Farzan, M., Lee, T.H., and Galloway, P.A. A highly conserved arginine in gp120 governs HIV-1 binding to both syndecans and CCR5 via sulfated motifs. *J Biol Chem* **280**, 39493-504 (2005).
 45. Korber, B.T., MacInnes, K., Smith, R.F., and Myers, G. Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 6730-44 (1994).
 46. Hartley, O., Klasse, P.J., Sattentau, Q.J., and Moore, J.P. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 171-89 (2005).
 47. LaRosa, G.J., Weinhold, K., Profy, A.T., Langlois, A.J., Dreesman, G.R., Boswell, R.N., Shadduck, P., Bolognesi, D.P., Matthews, T.J., Emini, E.A., and et, a.l. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant: further clarifications. *Science* **253**, 1146 (1991).
 48. LaRosa, G.J., Davide, J.P., Weinhold, K., Waterbury, J.A., Profy, A.T., Lewis, J.A., Langlois, A.J., Dreesman, G.R., Boswell, R.N., Shadduck, P., and et, a.l. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant: corrections and clarifications. *Science* **251**, 811 (1991).
 49. LaRosa, G.J., Davide, J.P., Weinhold, K., Waterbury, J.A., Profy, A.T., Lewis, J.A., Langlois, A.J., Dreesman, G.R., Boswell, R.N., Shadduck, P., and et, a.l. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* **249**, 932-5 (1990).
 50. Dojahn, J. Kombinatorische Synthese und Untersuchung von V3-Peptid- und Glycopeptidbibliotheken als potentielle HIV Impfstoffe. 2002. Faculty of Science, Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg.
 51. Kwong, P.D. The 447-52D antibody: hitting HIV-1 where its armor is thickest. *Structure* **12**, 173-4 (2004).
 52. Stanfield, R.L., Gorny, M.K., Williams, C., Zolla-Pazner, S., and Wilson, I.A. Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure* **12**, 193-204 (2004).
 53. Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., and Landau, N.R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* **185**, 621-8 (1997).
 54. Fouchier, R.A. and Schuitemaker, H. Molecular determinants of human immunodeficiency virus type I phenotype variability. *Eur J Clin Invest* **26**, 175-85 (1996).
 55. Clevestig, P., Pramanik, L., Leitner, T., and Ehrnst, A. CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol* **87**, 607-12 (2006).
 56. McCaffrey, R.A., Saunders, C., Hensel, M., and Stamatatos, L. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J Virol* **78**, 3279-95 (2004).
 57. Polzer, S., Dittmar, M.T., Schmitz, H., Meyer, B., Muller, H., Krausslich, H.G., and Schreiber, M. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* **11**, 11-9 (2001).
 58. Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M.I., Goudsmit, J., and Paxton, W.A. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* **276**, 13433-41 (2001).
 59. Nakayama, E.E., Shioda, T., Tatsumi, M., Xin, X., Yu, D., Ohgimoto, S., Kato, A., Sakai, Y., Ohnishi, Y., and Nagai, Y. Importance of the N-glycan in the V3 loop of HIV-1 envelope protein for CXCR-4- but not CCR-5-dependent fusion. *FEBS Lett* **426**, 367-72 (1998).

60. Tost J. Synthese von N-Typ Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins gp120 und Untersuchung ihrer Korezeptorspezifität. Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg (2004).
61. Huennefeld, B. Untersuchung der Bindungseigenschaften von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich der HIV-1 Glycoproteins gp120 an ihren Korezeptor CCR5. 2006. Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg.
62. Castro, H.C., Loureiro, N.I., Pujol-Luz, M., Souza, A.M., Albuquerque, M.G., Santos, D.O., Cabral, L.M., Frugulhetti, I.C., and Rodrigues, C.R. HIV-1 reverse transcriptase: a therapeutic target in the spotlight. *Curr Med Chem* **13**, 313-24 (2006).
63. O'Brien, W.A. 3rd. Saquinavir/Ritonavir: its evolution and current treatment role. *AIDS Read* **16**, 38-44; discussion 43 (2006).
64. Rusconi, S., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., and Supuran, C.T. New advances in HIV entry inhibitors development. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**, 339-55 (2004).
65. 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).
66. Poveda, E., Briz, V., and Soriano, V. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev* **7**, 139-47 (2005).
67. Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595-9 (1998).
68. Arakaki, R., Tamamura, H., Premanathan, M., Kanbara, K., and Ramanan, S. T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *J. Virol.* **73**, 1719-23 (1999).
69. Murakami, T., Zhang, T.Y., Koyanagi, Y., Tanaka, Y., and Kim, J. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **73**, 7489-96 (1999).
70. O'Hara, B.M. and Olson, W.C. HIV entry inhibitors in clinical development. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 523-8 (2002).
71. 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).
72. 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. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-5 (1996).
73. Palani, A., Shapiro, S., Clader, J.W., Greenlee, W.J., Cox, K., Strizki, J., Endres, M., and Baroudy, B.M. Discovery of 4-[(Z)-(4-bromophenyl)-(ethoxyimino)methyl]-1'-[(2,4-dimethyl-3-pyridinyl)carbonyl]-4'-methyl-1,4'-bipiperidine N-oxide (SCH 351125): an orally bioavailable human CCR5 antagonist for the treatment of HIV infection. *J Med Chem* **44**, 3339-42 (2001).
74. Hartley, O., Gaertner, H., Wilken, J., Thompson, D., Fish, R., Ramos, A., Pastore, C., Dufour, B., Cerini, F., Melotti, A., Heveker, N., Picard, L., Alizon, M., Mosier, D., Kent, S. *et al.* Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16460-5 (2004).
75. Neffe, A.T. and Meyer, B. A peptidomimetic HIV-entry inhibitor directed against the CD4 binding site of the viral glycoprotein gp120. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 2937-40 (2004).
76. Balzarini, J., Van Laethem, K., Hatse, S., Froeyen, M., Peumans, W., Van Damme, E., and Schols, D. Carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV GP120: a new therapeutic concept to hit the achilles heel of HIV. *J Biol Chem* **280**, 41005-14 (2005).
77. Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Res* (2006).
78. Meadows, D.C. and Gervay-Hague, J. Current Developments in HIV Chemotherapy.

- ChemMedChem 16-29 (2006).
79. Medico International. Global Health Watch 2005-2006 . Zed Books, London/New York (2005).
 80. Breitling, F. and Dübel, S. Rekombinante Antikörper. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg; Berlin (1997).
 81. Brekke, O.H. and Sandlie, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 52-62 (2003).
 82. Burton, D.R. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* **2**, 706-13 (2002).
 83. Weiner, L.M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother* **29**, 1-9 (2006).
 84. Gura, T. Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target. *Nature* **417**, 584-6 (2002).
 85. Robbins, J.B., Schneerson, R., and Szu, S.C. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J Infect Dis* **171**, 1387-98 (1995).
 86. Check, E. AIDS vaccines: back to 'plan A'. *Nature* **423**, 912-4 (2003).
 87. Korber, B. *et al.* HIV Molecular Immunology Database. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR 00-1757., <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology> (2005).
 88. Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, P.W., Robinson, J., Van Ryk, D., Wang, L. *et al.* HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-82 (2002).
 89. Yuan, W., Bazick, J., and Sodroski, J. Characterization of the multiple conformational States of free monomeric and trimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins after fixation by cross-linker. *J Virol* **80**, 6725-37 (2006).
 90. Billich, A. AIDS VAX VaxGen. *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 214-21 (2004).
 91. Flynn, N.M., Forthal, D.N., Harro, C.D., Judson, F.N., Mayer, K.H., and Para, M.F. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* **191**, 654-65 (2005).
 92. Rodriguez-Chavez, I.R., Allen, M., Hill, E.L., Sheets, R.L., Pensiero, M., Bradac, J.A., and D'Souza, M.P. Current advances and challenges in HIV-1 vaccines. *Curr HIV/AIDS Rep* **3**, 39-47 (2006).
 93. Stiegler, G. and Katinger, H. Therapeutic potential of neutralizing antibodies in the treatment of HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* **51**, 757-9 (2003).
 94. Joos, B., Trkola, A., Kuster, H., Aceto, L., Fischer, M., Stiegler, G., Armbruster, C., Vcelar, B., Katinger, H., and Gunthard, H.F. Long-term multiple-dose pharmacokinetics of human monoclonal antibodies (MAbs) against human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 (Mab 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1773-9 (2006).
 95. Zhu, P., Liu, J., Bess, J. Jr, Chertova, E., Lifson, J.D., Grise, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* (2006).
 96. Burton, D.R., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14943-8 (2005).
 97. Zolla-Pazner, S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* **4**, 199-210 (2004).
 98. Burton, D.R., Desrosiers, R.C., Doms, R.W., Koff, W.C., Kwong, P.D., Moore, J.P., Nabel, G.J., Sodroski, J., Wilson, I.A., and Wyatt, R.T. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**, 233-6 (2004).
 99. Gorny, M.K. and Zolla-Pazner, S. Human Monoclonal Antibodies that Neutralize HIV-1. HIV Immunology and HIV/SIV Vaccine Databases Los Alamos National Laboratory 37-51 (2003).
 100. Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, W., Trkola, A., Purtscher, M., Gruber, G., Tauer, C., Steindl, F., Jungbauer, A., and *et al.* Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 359-69 (1994).

101. Nyambi, P.N., Mbah, H.A., Burda, S., Williams, C., Gorny, M.K., Nadas, A., and Zolla-Pazner, S. Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol* **74**, 7096-107 (2000).
102. Gorny, M.K., Moore, J.P., Conley, A.J., Karwowska, S., Sodroski, J., Williams, C., Burda, S., Boots, L.J., and Zolla-Pazner, S. Human anti-V2 monoclonal antibody that neutralizes primary but not laboratory isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 8312-20 (1994).
103. Burton, D.R., Barbas, C.F. 3rd, Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M., and Lerner, R.A. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10134-7 (1991).
104. Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R., and Wilson, I.A. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**, 1155-9 (2001).
105. Moulard, M., Phogat, S.K., Shu, Y., Labrijn, A.F., Xiao, X., Binley, J.M., Zhang, M.Y., Sidorov, I.A., Broder, C.C., Robinson, J., Parren, P.W., Burton, D.R., and Dimitrov, D.S. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6913-8 (2002).
106. Calarese, D.A., Scanlan, C.N., Zwick, M.B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Roux, K.H., Kelly, J.W., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Katinger, H., Burton, D.R. *et al.* Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **300**, 2065-71 (2003).
107. Calarese, D.A., Lee, H.K., Huang, C.Y., Best, M.D., Astronomo, R.D., Stanfield, R.L., Katinger, H., Burton, D.R., Wong, C.H., and Wilson, I.A. Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13372-7 (2005).
108. Scanlan, C.N., Pantophlet, R., Wormald, M.R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I.A., Katinger, H., Dwek, R.A., Rudd, P.M., and Burton, D.R. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**, 7306-21 (2002).
109. Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., Oxenius, A., Weber, R., Stiegler, G., Vcelar, B., Katinger, H., Aceto, L. *et al.* Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* **11**, 615-22 (2005).
110. Gorny, M.K., Stamatatos, L., Volsky, B., Revesz, K., Williams, C., Wang, X.H., Cohen, S., Staudinger, R., and Zolla-Pazner, S. Identification of a new quaternary neutralizing epitope on human immunodeficiency virus type 1 virus particles. *J Virol* **79**, 5232-7 (2005).
111. Lusso, P., Earl, P.L., Sironi, F., Santoro, F., Ripamonti, C., Scarlatti, G., Longhi, R., Berger, E.A., and Burastero, S.E. Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* **79**, 6957-68 (2005).
112. Li, Y., Svehla, K., Mathy, N.L., Voss, G., Mascola, J.R., and Wyatt, R. Characterization of antibody responses elicited by human immunodeficiency virus type 1 primary isolate trimeric and monomeric envelope glycoproteins in selected adjuvants. *J Virol* **80**, 1414-26 (2006).
113. Wang, L.X. Toward oligosaccharide- and glycopeptide-based HIV vaccines. *Curr Opin Drug Discov Devel* **9**, 194-206 (2006).
114. Sharon, M., Kessler, N., Levy, R., Zolla-Pazner, S., Gorlach, M., and Anglister, J. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure* **11**, 225-36 (2003).
115. Gorny, M.K., Xu, J.Y., Karwowska, S., Buchbinder, A., and Zolla-Pazner, S. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. *J Immunol* **150**, 635-43 (1993).
116. Binley, J.M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M.B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., Petropoulos, C.J., and Burton, D.R. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1

- monoclonal antibodies. *J Virol* **78**, 13232-52 (2004).
117. Zolla-Pazner, S., Zhong, P., Revesz, K., Volsky, B., Williams, C., Nyambi, P., and Gorny, M.K. The cross-clade neutralizing activity of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 1254-8 (2004).
 118. Dezube, B.J., Doweiko, J.P., Proper, J.A., Conway, B., Hwang, L., Terada, M., Leece, B.A., Ohno, T., and Mastico, R.A. Monoclonal antibody hNM01 in HIV-infected patients: a phase I study. *J Clin Virol* 31 Suppl 1, S45-7 (2004).
 119. Ohno, T., Terada, M., Yoneda, Y., Shea, K.W., Chambers, R.F., Stroka, D.M., Nakamura, M., and Kufe, D.W. A broadly neutralizing monoclonal antibody that recognizes the V3 region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10726-9 (1991).
 120. Eda, Y., Takizawa, M., Murakami, T., Maeda, H., Kimachi, K., Yonemura, H., Koyanagi, S., Shiosaki, K., Higuchi, H., Makizumi, K., Nakashima, T., Osatomi, K., Tokiyoshi, S., Matsushita, S., Yamamoto, N. *et al.* Sequential Immunization with V3 Peptides from Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Produces Cross-Neutralizing Antibodies against Primary Isolates with a Matching Narrow-Neutralization Sequence Motif. *J Virol* **80**, 5552-62 (2006).
 121. Eda, Y., Murakami, T., Ami, Y., Nakasone, T., Takizawa, M., Someya, K., Kaizu, M., Izumi, Y., Yoshino, N., Matsushita, S., Higuchi, H., Matsui, H., Shinohara, K., Takeuchi, H., Koyanagi, Y. *et al.* Anti-V3 Humanized Antibody KD-247 Effectively Suppresses Ex Vivo Generation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Affords Sterile Protection of Monkeys against a Heterologous Simian/Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* **80**, 5563-70 (2006).
 122. Gorny, M.K., Xu, J.Y., Karwowska, S., Buchbinder, A., and Zolla-Pazner, S. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. *J Immunol* **150**, 635-43 (1993).
 123. Ohlin, M., Hinkula, J., Broliden, P.A., Grunow, R., Borrebaeck, C.A., and Wahren, B. Human MoAbs produced from normal, HIV-1-negative donors and specific for glycoprotein gp120 of the HIV-1 envelope. *Clin Exp Immunol* **89**, 290-5 (1992).
 124. Laman, J.D., Schellekens, M.M., Abacioglu, Y.H., Lewis, G.K., Tersmette, M., Fouchier, R.A., Langedijk, J.P., Claassen, E., and Boersma, W.J. Variant-specific monoclonal and group-specific polyclonal human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised with synthetic peptides from the gp120 third variable domain. *J Virol* **66**, 1823-31 (1992).
 125. Ling, H., Usami, O., Xiao, P., Gu, H.X., and Hattori, T. The N-terminal of the V3 loop in HIV type 1 gp120 is responsible for its conformation-dependent interaction with cell surface molecules. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 213-8 (2004).
 126. Skinner, M.A., Ting, R., Langlois, A.J., Weinhold, K.J., Lyerly, H.K., Javaherian, K., and Matthews, T.J. Characteristics of a neutralizing monoclonal antibody to the HIV envelope glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* **4**, 187-97 (1988).
 127. VanCott, T.C., Bethke, F.R., Polonis, V.R., Gorny, M.K., Zolla-Pazner, S., Redfield, R.R., and Birx, D.L. Dissociation rate of antibody-gp120 binding interactions is predictive of V3-mediated neutralization of HIV-1. *J Immunol* **153**, 449-59 (1994).
 128. Schonning, K., Bolmstedt, A., Novotny, J., Lund, O.S., Olofsson, S., and Hansen, J.E. Induction of antibodies against epitopes inaccessible on the HIV type 1 envelope oligomer by immunization with recombinant monomeric glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 1451-6 (1998).
 129. Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D., and Shaw, G.M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-12 (2003).
 130. Polzer, S., Dittmar, M.T., Schmitz, H., and Schreiber, M. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **304**, 70-80 (2002).
 131. Gorny, M.K., VanCott, T.C., Hioe, C., Israel, Z.R., Michael, N.L., Conley, A.J., Williams, C., Kessler, J.A. 2nd, Chigurupati, P., Burda, S., and Zolla-Pazner, S. Human monoclonal

- antibodies to the V3 loop of HIV-1 with intra- and interclade cross-reactivity. *J Immunol* **159**, 5114-22 (1997).
132. Hioe, C.E., Xu, S., Chigurupati, P., Burda, S., Williams, C., Gorny, M.K., and Zolla-Pazner, S. Neutralization of HIV-1 primary isolates by polyclonal and monoclonal human antibodies. *Int Immunol* **9**, 1281-90 (1997).
 133. Haynes, B.F., Ma, B., Montefiori, D.C., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Sutherland, L.L., Scarce, R.M., Denton, C., Xia, S.M., Korber, B.T., and Liao, H.X. Analysis of HIV-1 subtype B third variable region peptide motifs for induction of neutralizing antibodies against HIV-1 primary isolates. *Virology* **345**, 44-55 (2006).
 134. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **85**(14), 2149-4. 63.
 135. Pearson, D. and Blanchette, M. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **30**, 2739-42 (1989).
 136. Wellings, D.A. and Atherton, E. Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol* **289**, 44-67 (1997).
 137. Korr, R., Trzeciak, A., and Bannwarth, W. new coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **30**, 1927-30 (1989).
 138. Fukae, K., Yamamoto, N., Hatakeyama, Y., and Kajihara, Y. Chemoenzymatic synthesis of diverse asparagine-linked alpha-(2,3)-sialyloligosaccharides. *Glycoconj J* **21**, 243-50 (2004).
 139. Pratt, M.R. and Bertozzi, C.R. Synthetic glycopeptides and glycoproteins as tools for biology. *Chem Soc Rev* **34**, 58-68 (2005).
 140. Sharon, N. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations 1985. *Eur J Biochem* **159**, 1-6 (1986).
 141. Meyer, S. Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des gp120 aus dem HIV. Dissertation Universität Hamburg (1999).
 142. Kohler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-7 (1975).
 143. Groves, M.A. and Osbourn, J.K. Applications of ribosome display to antibody drug discovery. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 125-35 (2005).
 144. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-7 (1985).
 145. Kehoe, J.W. and Kay, B.K. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev* **105**, 4056-72 (2005).
 146. Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**, 1105-16 (2005).
 147. R. Bredehorst. recombinant filamentous phage. 2006. 2006.
 148. McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-4 (1990).
 149. Barbas, C.F. 3rd, Kang, A.S., Lerner, R.A., and Benkovic, S.J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7978-82 (1991).
 150. Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., and Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-8 (1991).
 151. Duenas, M. and Borrebaeck, C.A. Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Biotechnology (N Y)* **12**, 999-1002 (1994).
 152. Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W., and Roovers, R.C. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **4**, 1-20 (1998).
 153. Waterhouse, P., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., and Winter, G. Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res* **21**, 2265-6 (1993).
 154. Turbadar, T. Complete Absorbtion of Light by Thin Metal Films. *Proc Phys Soc* **73**, 40 (1959).

155. Kretschmann, E. and Raether, H. Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons excited by light. *Z Naturf* **230**, 2135 (1968).
156. Otto, A. Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmonenschwingungen. *Phys Stat Sol* **26**, 99-101 (1968).
157. Otto, A. Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection. *Zeitschrift für Physik* **216**, 398-400 (1968).
158. Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I., and et, a.l. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620-7 (1991).
159. Pattnaik, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. *Appl Biochem Biotechnol* **126**, 79-92 (2005).
160. Myszka, D.G., Morton, T.A., Doyle, M.L., and Chaiken, I.M. Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophys Chem* **64**, 127-37 (1997).
161. Nieba, L., Krebber, A., and Pluckthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-65 (1996).
162. Ober, R.J. and Ward, E.S. The choice of reference cell in the analysis of kinetic data using BIAcore. *Anal Biochem* **271**, 70-80 (1999).
163. Mayer, M. and Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Intl Ed* **38**, 1784-1788 (1999).
164. 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).
165. Kalk, A. and Berendsen, H.J.C. Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins. *J magn res* **24**, 343-66 (1976).
166. 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).
167. Claasen, B., Axmann, M., Meinecke, R., and Meyer, B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin alpha(IIb)beta3 in native platelets than in liposomes. *J Am Chem Soc* **127**, 916-9 (2005).
168. Meyer, S. Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des gp120 aus dem HIV. 99. Faculty of science, Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg.
169. Gomez, C.E., Lopez-Campistrous, A.E., and Duarte, C.A. An immunoassay with bovine serum albumin coupled peptides for the improved detection of anti V3 antibodies in HIV-1 positive human sera. *J Virol Methods* **71**, 7-16 (1998).
170. Gorny, M.K., Revesz, K., Williams, C., Volsky, B., Louder, M.K., Anyangwe, C.A., Krachmarov, C., Kayman, S.C., Pinter, A., Nadas, A., Nyambi, P.N., Mascola, J.R., and Zolla-Pazner, S. The v3 loop is accessible on the surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *J Virol* **78**, 2394-404 (2004).
171. Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., and et, a.l. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* **13**, 3245-60 (1994).
172. Hendrickson, W.A., Pahler, A., Smith, J.L., Satow, Y., Merritt, E.A., and Phizackerley, R.P. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2190-4 (1989).
173. Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J., and Salemme, F.R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**, 85-8 (1989).
174. Pieper, D. Herstellung von gp120 V3-Loop Fusionsprotein sowie D26 Antikörper. 2006. Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg.
175. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, Washington, DC (1991).
176. Martin C.R. Andrew C.R. Martin's Bioinformatics Group at UCL. 2006.

177. SIB. Expert Protein Analysis System Proteomics Server of the Swiss Institute of Bioinformatics. 2006.
178. Mach, H., Middaugh, C.R., and Lewis, R.V. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem* **200**, 74-80 (1992).
179. Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23 (1995).
180. Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6444-8 (1993).
181. Atwell, J.L., Breheney, K.A., Lawrence, L.J., McCoy, A.J., Kortt, A.A., and Hudson, P.J. scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng* **12**, 597-604 (1999).
182. MacKenzie, C.R., Hirama, T., Deng, S.J., Bundle, D.R., Narang, S.A., and Young, N.M. Analysis by surface plasmon resonance of the influence of valence on the ligand binding affinity and kinetics of an anti-carbohydrate antibody. *J Biol Chem* **271**, 1527-33 (1996).
183. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory. HIV Sequence Database. 2006.
184. Pavlinkova, G., Colcher, D., Booth, B.J., Goel, A., and Batra, S.K. Pharmacokinetics and biodistribution of a light-chain-shuffled CC49 single-chain Fv antibody construct. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 267-75 (2000).
185. Howell, S., Kenmore, M., Kirkland, M., and Badley, R.A. High-density immobilization of an antibody fragment to a carboxymethylated dextran-linked biosensor surface. *J Mol Recognit* **11**, 200-3 (1998).
186. Malmberg, A.C., Duenas, M., Ohlin, M., Soderlind, E., and Borrebaeck, C.A. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. *J Immunol Methods* **198**, 51-7 (1996).
187. Duenas, M., Malmberg, A.C., Casavilla, R., Ohlin, M., and Borrebaeck, C.A. Selection of phage displayed antibodies based on kinetic constants. *Mol Immunol* **33**, 279-85 (1996).
188. Gorny, M.K., Xu, J.Y., Gianakakos, V., Karwowska, S., Williams, C., Sheppard, H.W., Hanson, C.V., and Zolla-Pazner, S. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3238-42 (1991).
189. Nieba, L., Krebber, A., and Pluckthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-65 (1996).
190. Skinner, M.A., Ting, R., Langlois, A.J., Weinhold, K.J., Lyerly, H.K., Javaherian, K., and Matthews, T.J. Characteristics of a neutralizing monoclonal antibody to the HIV envelope glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* **4**, 187-97 (1988).
191. Cavacini, L., Duval, M., Song, L., Sangster, R., Xiang, S.H., Sodroski, J., and Posner, M. Conformational changes in env oligomer induced by an antibody dependent on the V3 loop base. *AIDS* **17**, 685-9 (2003).
192. Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., and Barbas, C.F. 3rd. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol* **254**, 392-403 (1995).
193. Dey, B., Del Castillo, C.S., and Berger, E.A. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by sCD4-17b, a single-chain chimeric protein, based on sequential interaction of gp120 with CD4 and coreceptor. *J Virol* **77**, 2859-65 (2003).
194. The Medical Research Council. Protocol for the use of the Griffin.1 phagemid library. Cambridge, United Kingdom.
195. Gottlieb, H.E., Kotlyar, V., and Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* **62**, 7512-7515 (1997).
196. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
197. Ausubel, F.M. and Brent, R. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience,

- (2005).
198. Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-6 (1986).
 199. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7 (1977).
 200. Claasen, B. Synthese und Charakterisierung von peptidischen Liganden des zellulären, humanen Prionproteins, Dissertation, Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg (2005).

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

- Mirko Lindner -

Hamburg, den 6. Januar 2007

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name Mirko Lindner
Geburtsort/-datum Hamburg, 14.12.1977

AUSBILDUNG

seit 11/2003 Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, betreut durch Prof. Dr. B. Meyer. Thema: Selektion und Charakterisierung von HIV-1 V3-spezifischen monoklonalen Antikörperfragmenten

03/2003 - 09/2003 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, betreut durch Prof. Dr. B. Meyer. Thema: Synthese und Analyse von V3-Peptiden aus dem gp120 des HIV-1

2000 - 2003 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg, Diplom: 25.09.2003 (Note: sehr gut)

1998 - 2000 Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg, Vordiplom 11.09.2000 (Note: sehr gut)

1997 - 1998 Zivildienst, Lebenshilfe e.V., Schenefeld

1988 - 1997 Gymnasium Schenefeld, Stadt Schenefeld (Abitur, 1.5)

1984 - 1988 Gorch Fock Grundschule, Stadt Schenefeld

ANSTELLUNGSVERHÄLTNISSE

seit 12/2006 Mitarbeiter in der analytischen Entwicklung, A&M Stabtest, 50126 Bergheim

11/2004 - 09/2006 Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum in Organischer Chemie, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

11/2003 - 10/2004 Mitarbeiter des DFG Sonderforschungsbereiches 470, Projekt B2

BERUFSBEZOGENE AKTIVITÄTEN

11/2003 - 09/2006 Betreuung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers

2003/2004/2005 Posterbeiträge bei Seminaren des Sonderforschungsbereiches 470

11/2003 Bruker NMR Benutzertagung, Ettlingen

MEIN DANK GILT

meinen Eltern,
die mir alles ermöglichten und mich bei allem unterstützten

meinen Schwestern Birka und Laura

Birte
für die wunderschönen Jahre

Dr. Edzard Spillner
für die fachliche Komplettunterstützung durch praktische Anweisungen bis hin zu wertvollen Anregungen im Laufe meines Schwerpunktpraktikums sowie der gesamten Dissertation. Ein Dank auch für die weiterführenden Forschungsarbeiten mit Unterstützung der Praktikanten Doro, Mandy und Felix sowie Thorsten Mix

Prof. Dr. R. Bredehorst
für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig sein zu können und seiner Arbeitsgruppe für die vielen Hilfestellungen

Dr. Thomas Kühnemund
für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung in und außerhalb des Labors

meinen Schwerpunktpraktikanten Joachim Albers und Michael Goldflam
für die geleisteten Beiträge zur vorliegenden Arbeit

Dennis Wilhelm
für die schöne Zeit vom Grundpraktikum bis ins Labor 11, lustige Umtrünke und das *Know How* in Bezug auf alles was mit Synthese zu tun hat

Marco Axmann, Atilla Çoksezen, Thomas Hackl und Dirk Rehders
für wissenschaftliche Gespräche und die richtige Wellenlänge

Birgit Claasen und Katharina Wallach
für ihren unermüdlichen Einsatz für das Gemeinwohl der Arbeitsgruppe

Ilona Grüneberg
für die unzähligen sauberen Kolben und schöne Gespräche

Jan Christoph Westermann
für sein breites Wissen, Anekdoten und zusammen mit Boris Kröplien
für die Rechneradministration Phase I

Winrich Scherres und Robin Job
für die zeitintensive Rechneradministration Phase II

für das Korrekturlesen der Arbeit:
Atilla Çoksezen, Thomas Hackl, Thomas Kühnemund, Svenja Scheid, Jan Christoph Westermann
und Dennis Wilhelm

sowie allen anderen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe B. Meyer für die Gerätebetreuung, das Fachwissen oder die angenehme Arbeitsatmosphäre: Lars Fischer, Christian Flügge, Martin Hollinger, Britta Hünnefeld, Kolja Klein, Boris Kröplien, Robert Meinecke, Sonja Meyer, Axel Neffe, Karolina Poc, Vera Leitmann, Anna Struck, Svenja Scheid, Jutta Tost.

