

Einfluss der Glycosylierung auf
Struktur und Bindungsverhalten
der dritten variablen Loop des
HIV-1 Glycoproteins GP120

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Christian Flügge
aus Hamburg

Hamburg, 2008



Universität Hamburg

Einfluss der Glycosylierung auf Struktur und Bindungsverhalten der dritten variablen Loop
des HIV-1 Glycoproteins GP120

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christian Flügge
aus Hamburg

Hamburg, 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 25.04.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2002 bis Januar 2007 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Chris Meier, durchgeführt.

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

Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	AIDS (Aquired Immune Deficiency Syndrome)	1
1.2	Beschreibung des HI-Virus	2
1.3	Mechanismus der HIV-Infektion	4
1.4	Die HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4	7
1.5	Glycoproteine - Aufbau und Funktion	10
1.6	Das virale Glycoprotein 120 des HIV	13
1.7	Die V3-Loop des GP120 des HIV	15
1.8	Therapieansätze	18
2	Methoden.....	21
2.1	Peptid- und Glycopeptidsynthese.....	21
2.1.1	Festphasenpeptidsynthese	21
2.2	Charakterisierung von Peptiden	26
2.2.1	Massenspektrometrie.....	26
2.2.2	NMR-Spektroskopie.....	27
2.3	Oberflächenplasmonenresonanz - SPR	28
2.3.1	SPR-Messungen mit Zellen.....	32
3	Problemstellung.....	34
4	Ergebnisse und Diskussion.....	36
4.1	Synthese des <i>N</i> γ-Asparagin Bausteins 3 (<i>N</i> -Acetylglucosamin).....	36
4.2	Enzymatische Synthese von komplex Typ Oligosacchariden.....	39
4.3	Synthese des <i>N</i> γ-Asparagin Bausteins 11 (komplex Typ Nonasaccharid).....	52
4.4	Synthese von Peptiden und Glycopeptiden.....	60
4.4.1	Synthese des nicht glycosylierten cyclisierten V3-Peptids 12	63
4.4.2	Synthese des cyclisierten glycosylierten V3-Peptids 14	67
4.4.3	Synthese des linearen nicht glycosylierten V3-Peptids 16	72
4.4.4	Synthese des linearen glycosylierten V3-Peptids 17	74
4.4.5	Versuche der Peptidkettenverlängerung von Verbindung 17	78
4.5	NMR-spektroskopische und konformative Untersuchungen der synthetischen Peptide- und Glycopeptide	80
4.5.1	NMR-spektroskopischer Vergleich des cyclischen V3-Peptids 12 und des cyclischen glycosylierten V3-Peptids 14	80
4.5.2	NMR-spektroskopischer Vergleich der linearen V3-Peptids 16 und des linearen glycosylierten V3-Peptids 17	84
4.5.3	NMR-spektroskopischer Vergleich des cyclischen V3-Peptids 12 und des linearen Peptids 16	86
4.5.4	NMR-spektroskopischer Vergleich des cyclischen V3-Glycopeptids 14 und des linearen V3-Glycopeptids 17	89

Inhaltsverzeichnis

4.6	SPR-Bindungsstudien der synthetisierten Verbindungen 12 , 14 und 17	92
4.6.1	SPR-Ergebnisse des zyklischen nicht glycosylierten V3-Peptids 12	93
4.6.2	SPR-Ergebnisse des cyclischen glycosylierten V3-Peptids 14	96
4.6.3	Biacore Ergebnisse des linearen glycosylierten V3-Peptids 17	98
4.6.4	Vergleich der SPR-Ergebnisse der Verbindungen 14 , 15 und 17	100
5	Zusammenfassung.....	104
6	Summary	107
7	Experimenteller Teil.....	109
7.1	Verwendete Chemikalien	109
7.2	Verwendete Geräte, Software und Materialien	110
7.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften	112
7.4	Synthese des <i>N</i> γ -Asparagin Bausteins 3 (<i>N</i> -Acetylglucosamin)	118
7.5	Synthese des <i>N</i> γ -Asparagin Bausteins 11 (komplex Typ Nonasaccharid).....	121
7.6	Synthese des nicht glycosylierten cyclischen V3-Peptids 12	131
7.7	Synthese des glycosylierten cyclischen V3-Peptids 14	134
7.8	Synthese des nicht glycosylierten linearen V3-Peptids 16	137
7.9	Synthese des glycosylierten linearen V3-Peptids 17	140
7.10	Versuch der Kettenverlängerung des glycosylierten linearen V3-Peptids 17	142
7.11	Enzymatische Modifikationen des komplex Typ Nonasacchrids 5	147
7.12	SPR-Bindungsstudien.....	150
8	Sicherheitshinweise und Toxikologie	153
9	Literaturverzeichnis.....	155

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-, zweidimensional
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CDx	<i>Cluster of Differentiation</i>
CV	<i>Column Volume</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dhbt-OH	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GHOST	<i>Green Flourescent Human Osteosarcoma</i>
GP	Glycoprotein
HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HOS	<i>Human Osteosarcoma</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
K _D	thermodynamische Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
M	Molar, mol/L
m/z	Masse/Ladung
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

Abkürzungsverzeichnis

MS	Massenspektrometrie
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement And Exchange Spectroscopy</i>
PAL	<i>Peptide Amide Linker</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
Pfp	Pentafluorphenyl
PND	<i>Principal Neutralizing Domain</i>
PS	<i>Polystyrene Support</i>
Py	Pyridin
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
R _t	<i>Retention Time</i>
RU	<i>Resonance Unit</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SPPS	<i>Solid Phase Peptid Synthesis</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
WATERGATE	<i>Water Suppression By Gradient Tailored Excitation</i>

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

Kohlenhydrate

Kohlenhydrat	Abkürzung
6-Desoxy-L-Galactopyranose / L-Fucose	Fuc
α -/ β -D-Galactopyranose / Galactose	Gal
<i>N</i> -Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucopyranose / <i>N</i> -Acetylglucosamin	GlcNAc
α -/ β -D-Mannopyranose / Mannose	Man
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	Sia

1 Einleitung

1.1 AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)

In den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts traten in den westlichen Industrienationen erstmals rätselhafte Todesfälle auf, denen der völlige Zusammenbruch des menschlichen Immunsystems vorherging.¹ 1981 beschrieb der Mediziner Michael Gottlieb im wöchentlichen Gesundheitsreport der US-Gesundheitsbehörde *Centers of Disease Control* (CDC) eine Häufung einer seltenen Form der Lungenentzündung bei homosexuellen Männern.² Im weiteren Verlauf der Krankheit bildeten sich bei den Patienten sehr selten auftretende Kaposi-Sarkome und es kam zur Ausbildung von demenzartigen Symptomen. Im Jahre 1982 wurde zunächst eine durch sexuelle Kontakte übertragene Krankheit unter homosexuellen Männern angenommen, die zunächst als *Gay Related Immune Deficiency* (GRID) bezeichnet wurde.³ Im Laufe des Jahres 1982 zeigte sich jedoch, dass die Krankheit auch unter Hämophilen, Empfängern von Blut und heterosexuellen Drogenabhängigen auftrat. Da diese Fakten neben der sexuellen auch eine parenterale Übertragung belegten, benannte man diese rätselhafte Krankheit im August 1982 in AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) um.⁴ Anfangs nur vereinzelt in der homosexuellen Szene diverser Großstädte beobachtet, hat sich AIDS zu einer globalen Pandemie entwickelt. 1983 wurde der Erreger von AIDS entdeckt und als HIV (*Human Immuno Deficiency Virus*) bezeichnet (Kapitel 1.2). Anfang 2006 waren nach Hochrechnungen der WHO ca. 39 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert, zu denen jährlich ca. 4 Millionen Neuinfizierte hinzukommen.⁵

Die zurzeit am stärksten betroffene Region ist der südliche Teil des afrikanischen Kontinents (Abbildung 1-1). In naher Zukunft wird jedoch von einer explosionsartigen Zunahme der Infektionsrate im ostasiatischen Raum und in Russland ausgegangen. Die Steigerung in diesen Gebieten ist durch demographische Faktoren (z.B. Landflucht) gut vorhersagbar. Die hohen Infektionsraten in den betroffenen Regionen gefährden sowohl soziale als auch wirtschaftliche Strukturen, da primär jüngere Personen betroffen sind. In einigen afrikanischen Staaten liegt die Rate der HIV-Infektionen in der Gruppe der 20- bis 25-Jährigen bei bis zu 75 %.⁵ Zur Verfügung stehende Therapien bzw. Therapeutika sind mit hohen Kosten von bis zu 10.000 US\$ pro Jahr und Patient verbunden und überaus zeitintensiv. Daher ist die Entwicklung neuer, billiger Therapiemethoden oder präventiver Therapieansätze für die betroffenen Nationen außerordentlich wichtig.

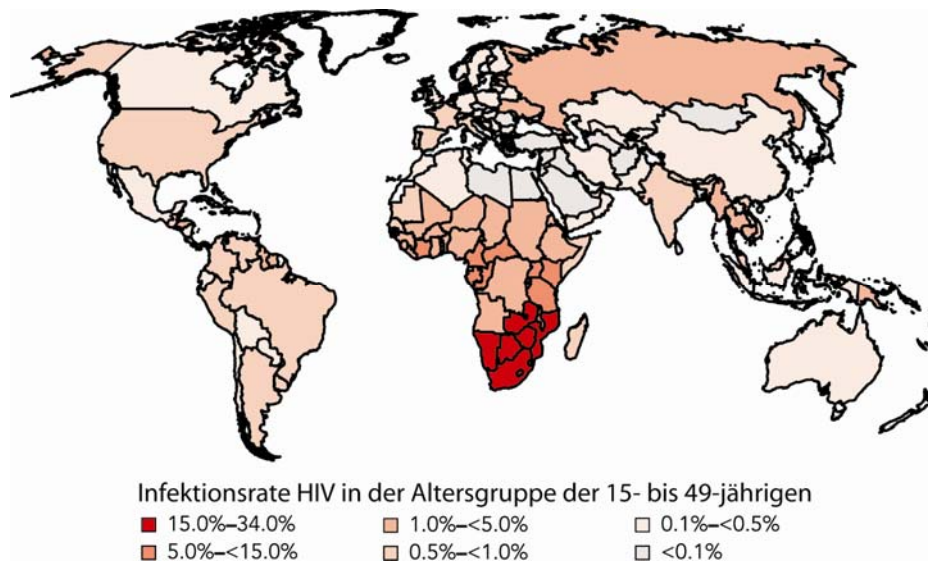


Abbildung 1-1: Schematische Übersicht der weltweiten HIV-Infektionsrate in der Altersgruppe der 15 bis 49-Jährigen im Jahre 2005.⁵

1.2 Beschreibung des HI-Virus

Im Jahre 1983 wurde das HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) von Luc Montagnier und Robert Gallo unabhängig voneinander zeitgleich entdeckt.^{4,6} Das Krankheitsbild AIDS war zu diesem Zeitpunkt relativ selten und daher weitgehend unbekannt. Im Allgemeinen liegen zwischen einer HIV-Infektion und dem Ausbruch der eigentlichen Immunschwächekrankheit AIDS mehrere Jahre, in denen eine infizierte Person keinerlei Symptome aufweist. Eine Infektion mit HIV erfolgt ausschließlich über sexuelle Kontakte und direkte Blutübertragung (z. B. Bluttransfusion).

Das HIV gehört zur Gruppe der Lentiviren, die sich durch außergewöhnlich lange Inkubationszeiten auszeichnen.⁷ Es tritt weltweit in verschiedenen Stämmen auf, die z. Zt. in zwei Hauptstämme unterteilt werden. Die Hauptstämme werden aufgrund ihres genetischen Unterschiedes, der bis zu 40 % ausmachen kann, in HIV-1 und HIV-2 unterteilt. Beide Virenhauptstämme treten wiederum in vielfältigen Variationen, sogenannten Subtypen auf. Die überwiegende Anzahl der weltweiten HIV-Infektionen gehen auf Subtypen des HIV-1 zurück, die M (major)-, O (outlier)- und N (new)-Gruppen unterteilt werden. Die Subtypen der M-Gruppe sind hauptverantwortlich für die weltweite Verbreitung der HIV-Infektion, wohingegen die Subtypen der O-Gruppe lediglich regional auf den afrikanischen Kontinent begrenzt in Erscheinung treten. Die M-Gruppe lässt sich aufgrund ihrer genetischen Merkmale in neun weitere Untertypen einteilen. Diese werden mit den Buchstaben A-I bezeichnet. Das Auftreten einzelner Subtypen ist wiederum regional auf bestimmte Kontinente begrenzt.

Lentiviren und somit auch das HIV gehören zur Klasse der Retroviren. HIV bildet ca. 100 nm große Virenpartikel. Im Inneren ist ein Capsid eingebettet, das aus ca. 2000 Molekülen des

Capsidproteins P24 gebildet wird und das virale Genom enthält.^{8;9} Die Erbinformation des HIV liegt in Form zweier ssRNA-Stränge vor, die durch direkte Assoziation mit dem Nucleosidcapsidprotein P7 stabilisiert werden. Die ssRNA wird durch die viruseigene Reverse Transkriptase zu Beginn eines jeden Replikationszyklus in DNA umgeschrieben. Dabei arbeitet die Reverse Transkriptase des HIV ca. zehnmal ungenauer als vergleichbare Enzyme in anderen Viren.¹⁰ Durch diese Ungenauigkeit erklärt sich die hohe Mutationsrate des HIV, da permanent neue Virenvarianten exprimiert werden. Die Mutationsrate erschwert die Entwicklung von Impfstoffen bzw. Therapeutika erheblich und macht es dem humanen Immunsystem unmöglich, eine HIV-Infektion erfolgreich zu bekämpfen.

Die Membran des HIV besteht aus einer klassischen Lipiddoppelschicht, in welche die Rezeptoren eingebettet sind. Der wichtigste Rezeptor ist ein Komplex der Glycoproteine GP41 und GP120, der proteolytisch aus dem zunächst exprimierten Glycoprotein GP160 gebildet wird. Der GP41/GP120-Komplex ist aus Trimeren von Heterodimeren aufgebaut. Es liegen ca. 14 (+/- 7) dieser Komplexe auf der Oberfläche eines Virus vor.¹¹ Der GP41/GP120-Komplex ist maßgeblich für die Bindung des HIV an die Wirtszelle verantwortlich.¹²

Mittlerweile ist bekannt, dass fast jedes Säugetier eine eigene Unterart des HIV ausbilden kann. Die bekannteste und wichtigste Unterart ist das SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*), das ausschließlich Schimpansen befällt und daher im Verdacht steht, der Ausgangspunkt des humanen HI-Virus zu sein. Theorien gehen davon aus, dass eine Übertragung über die Artenbarriere durch den Verzehr von rohem Affenfleisch verursacht wurde.¹³

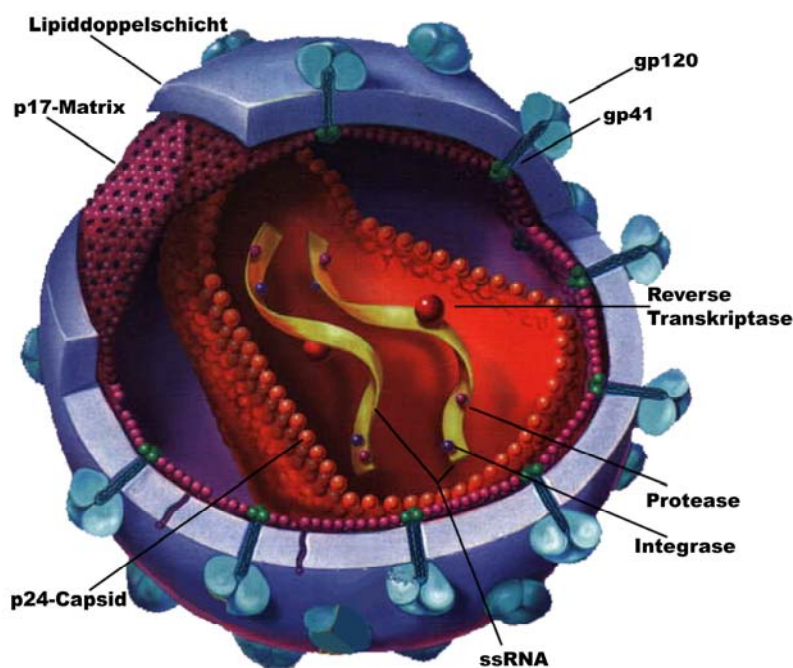


Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau des HIV.

1.3 Mechanismus der HIV-Infektion

Das HIV infiziert Lymphozytenzellen des humanen Immunsystems. Primär betroffen sind T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.¹⁴ Um eine Infektion zu ermöglichen, ist eine Interaktion des HIV mit zwei Rezeptoren auf der Membranoberfläche der angegriffenen Zelle erforderlich.

Der primäre Angriffspunkt des HIV ist der CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche der humanen Zelle.¹⁴⁻¹⁶ CD4 ist ein Membranprotein, das speziell auf der Zelloberfläche von T-Helferzellen zu finden und essentiell für das humane Immunsystem ist.¹⁷ Es ist ein stabförmiges, antennenartiges Molekül, das eine Masse von 55 kDa aufweist und zur Immunglobulin-Superfamilie gezählt wird. CD4 dient sowohl HIV-1, HIV-2 und SIV als Primärrezeptor.¹³ Das HIV benötigt zur erfolgreichen Infektion der humanen Zelle einen weiteren Rezeptor auf der Oberfläche der zu infizierenden Zelle. Dieser Korezeptor gehört zur Familie der Chemokinrezeptoren. Primär wird einer der Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 zur Bindung genutzt. Folglich gelten CXCR4 und CCR5 als die wichtigsten Korezeptoren der HIV-Infektion.¹² Es sind jedoch ebenfalls Wechselwirkungen mit anderen Chemokinrezeptoren bekannt (z.B. CXCR5).¹⁸ Die Korezeptoren unterscheiden sich je nach angegriffenem Zelltyp.

Die initiale Bindung des HIV an humane Zellen erfolgt über das virale Glycoprotein GP120. Die Bindung des viralen GP120 erfolgt dabei an das CD4-Rezeptormolekül der humanen Zelle. Röntgenstrukturdaten belegen, dass das CD4/GP120-Bindungsepitop diskontinuierlich und auf sechs peptidische Abschnitte des GP120 verteilt ist.^{19;20} Nach Anlagerung des GP120 an CD4 kommt es der Theorie nach zu einer räumlichen Umlagerung des GP120. Dies führt zu einer Exposition eines sekundären Bindungsepitops, das die Bindung an einen Chemokinrezeptor (den Korezeptor) ermöglicht.^{21;22} Durch diese Interaktion kommt es zu einer Destabilisierung des CD4/GP120-Komplexes, die vermutlich in einer Konformationsänderung des GP41 resultiert. Diese Konformationsänderung bewirkt die Präsentation einer hydrophoben Fusionsdomäne, die am N-Terminus ein Fusionspeptid aufweist, das in die Membran der Zielzelle inseriert wird. Abbildung 1-3 zeigt schematische den Ablauf der Bindung des HIV an die humane Zelle.

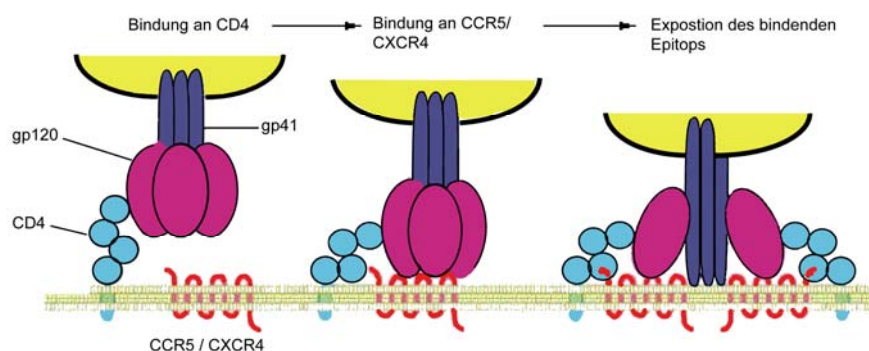


Abbildung 1-3: Initiale Bindung des GP120 an die humane Zelle.

Nach erfolgreicher Insertion folgt die Fusion der Membranen von Virus und Wirtszelle.^{23;24} Jedes der drei beteiligten GP41-Moleküle weist zwei helicale Bereiche auf (N-Helix und C-Helix). Wie in Abbildung 1-4 gezeigt, bilden drei N-Helices eine *coiled core*-Struktur, um die sich die drei C-Helices antiparallel formieren und ein Bündel bilden. Dieses Bündel wird als *Trimer-of-hairpin* bezeichnet und stellt eine Zwischenstufe in der noch nicht vollständig aufgeklärten Membranverschmelzung dar.²⁵⁻²⁷

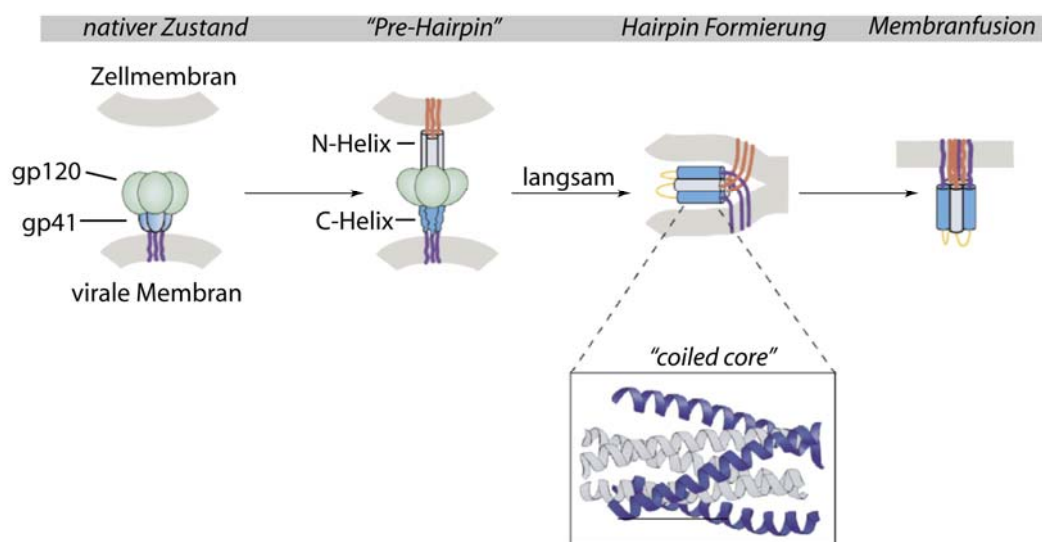


Abbildung 1-4: Das „Trimer-of-hairpins“ Konzept.

Neuerdings wird für den Eintritt des HI-Virus in die humane Zelle bzw. die Membranfusion ein weiterer möglicher Mechanismus diskutiert.²⁸ Dieser Mechanismus beruht auf dem Prozess der rezeptorvermittelten Endocytose, in dessen Verlauf das HIV von der angegriffenen Zelle „aufgenommen“ wird. Wie Abbildung 1-5 zeigt, konnte dieses für das HIV *in vitro* bereits beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass Chemokinrezeptoren eine solche Internalisierung (Endocytose) im Rahmen der Immunantwort katalysieren. Bei diesem Vorgang wird die extrazelluläre Substanz (das Antigen) zunächst von der Immunzelle gebunden und nach anschließender Einstülpung der Membran in die Immunzelle geleitet. In der normalen Immunantwort findet ein Verdau des Antigens statt, dem eine anschließenden Präsentation von spezifischen Antigenfragmenten auf der Oberfläche der Immunzelle folgt. Durch die Präsentation der Antigenfragmente ist das Immunsystem standardmäßig in der Lage, Antikörper gegen das Antigen bilden zu können. Diese Reaktion scheint bei einer HIV-Infektion jedoch auszubleiben.

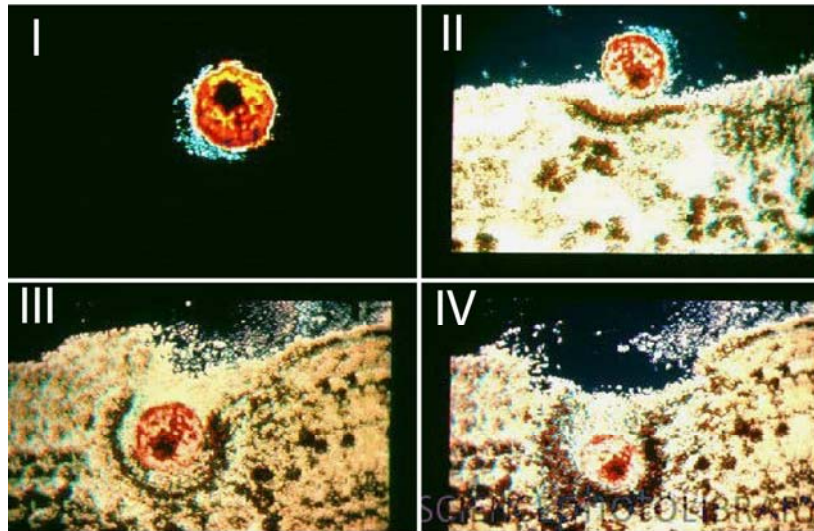


Abbildung 1-5: Transmissionselektronenmikroskop(TEM) Aufnahmen der endocytotischen Aufnahme eines HI-Virus in eine T-Helfer-Zelle.²⁹

Nach der Fusion der Membranen gelangen die Virenkompartimente in die infizierte Zelle und der virale Reproduktionszyklus beginnt (Abbildung 1-6). In der Zelle wird zunächst die virale ssRNA mit Hilfe der viralen Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die virale DNA wird in den Zellkern transportiert und anschließend durch die virale Integrase in das Genom der Wirtszelle inseriert. Die virale genetische Information wird nun im Rahmen der Zellteilung ebenfalls repliziert. Im integrierten Zustand kann die virale Information unerkannt in der Wirtszelle verbleiben.

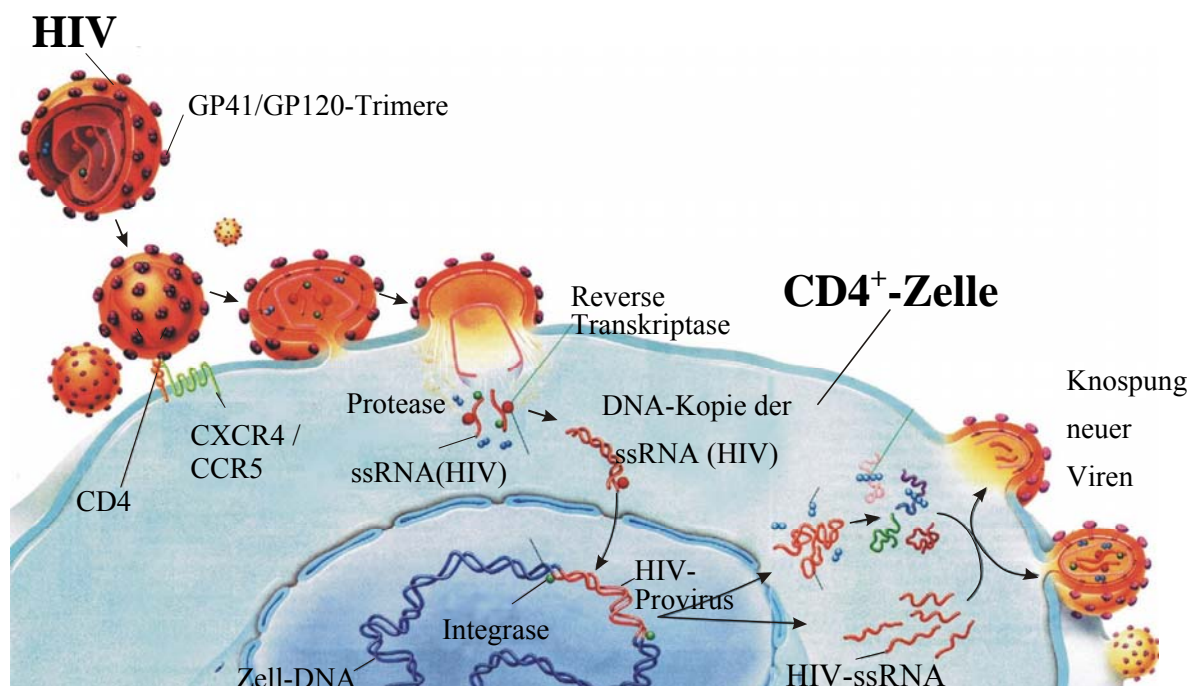


Abbildung 1-6: HIV-Replikationszyklus.

Die Replikation und Expression der insertierten viralen DNA und posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise die Glycosylierung des GP120 erfolgen durch biochemische Prozesse innerhalb der Wirtszelle. Virale Helferproteine tragen durch die Produktion aller benötigten viralen Komponenten zur Neubildung neuer Viren bei. Durch die Zusammenlagerung aller Virenkomponenten (*assembly*) schnüren sich neue Virenpartikel von der Wirtszelloberfläche ab und reifen zu neuen infektiösen Viren. Da die Virenmembran von der Wirtszelle stammt und viele wirtseigene Strukturen enthält, ist eine Erkennung dieser neuen Viren für das humane Immunsystem unmöglich. HIV weist innerhalb der Blutbahn eine Halbwertszeit von sechs Stunden auf, infizierte $CD4^+$ -Lymphozyten eine Halbwertszeit von zwei Tagen.³⁰ Infizierte $CD4^+$ -Lymphozyten produzieren täglich ca. 10^{10} Virionen.³¹ Da die infizierte Zelle fast ausschließlich neue Viren produziert, stirbt sie schnell ab, und steht für ihre Aufgabe in der humanen Immunreaktion nicht mehr zur Verfügung. Da ausschließlich Zellen des Immunsystems betroffen sind, ist ein Zusammenbruch der Immunantwort unvermeidbar.

In der frühen Phase einer HIV-Infektion kommt es häufig zu grippeähnlichen Symptomen. Es ist zu beobachten, dass der Virentiter im Blut der infizierten Person schnell stark ansteigt, während die Anzahl der $CD4^+$ -T-Zellen im Blut stark abnimmt. Nach dieser zunächst sehr akuten Phase nimmt der Virentiter im Blut schnell ab, da das humane Immunsystem temporär in der Lage ist, die HIV-Infektion zu bekämpfen. Da sich im Zuge der Abnahme des Virentiters ebenfalls die $CD4^+$ -T-Zellanzahl normalisiert, geht es dem betroffenen Patienten intermediär besser. Die genetische Information des HIV vermag jedoch über viele Jahre in den infizierten Zellen und deren Nachkommen in Ruhestellung zu überdauern. In dieser asymptomatischen „Ruhephase“ von bis zu 15 Jahren sind meist keine oder nur schwache Krankheitssymptome zu beobachten. Während dieser Phase sind im Blut keine Viren nachweisbar, obwohl ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Neuproduktion von Viren und der Immunantwort besteht. Im späteren Verlauf der HIV-Infektion kommt es zu einem schnellen Anstieg des Virentiters in Verbindung mit einer starken Abnahme von $CD4^+$ -T-Zellen. Durch den kontinuierlichen Verlust dieser T-Zellen kommt es zu einer massiven Schwächung des Immunsystems, das schließlich seine Aufgaben nicht mehr wahrnehmen kann. Die Hauptfolge ist der Verlust jeglicher Immunantwort, so dass sogar harmlose Krankheitserreger nicht mehr bekämpft werden können, dass es schließlich zum Tod der infizierten Person kommt. Diese Phase des Krankheitsverlaufes wird als symptomatisches Stadium der HIV-Infektion bezeichnet und stellt letztendlich die Krankheit AIDS dar. Wird die HIV-Infektion im Verlauf der Krankheit nicht therapiert, versterben an dieser tödlichen Krankheit innerhalb von 15 Jahren ca. 70 % der Patienten an den Folgen.³²

1.4 Die HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4

HIV nutzt als Korezeptor G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die zu der Familie der 7-Helixtransmembranproteine gehören.³³ Dies sind Chemokinrezeptoren, die mit sieben

transmembranen α -Helices in der Zellmembran verankert sind. Die Familie der GPCRs setzt sich aus ca. 200 verschiedenen Membranproteinen zusammen, deren natürliche Funktion in der Leitung von Leukozyten zu Entzündungsorten besteht. Sie bewirken Chemotaxis in Richtung der ausgeschütteten Chemokine (*chemoattractant cytokines*).^{34;35} Cytokine sind kleine aus 65-75 Aminosäuren bestehenden Proteine, deren Nomenklatur sich aus ihrer Aminosäuresequenz ableitet und die in zwei Hauptgruppen unterteilt werden.³⁶ Die erste Hauptgruppe wird als CC- oder β -Chemokin bezeichnet, die zwei direkt nebeneinander liegende Cysteinreste in der Aminosäuresequenz aufweist. Liegt zwischen diesen beiden Cysteinresten eine beliebige Aminosäure wird die Bezeichnung CXC- oder α -Chemokin gewählt.³⁷ Die Chemokinrezeptoren werden gemäß den von ihnen gebundenen Chemokinen als CC- und CXC-Rezeptoren bezeichnet. Die genauen Bedeutungen und *in vivo* Funktionen der Chemokinrezeptoren im humanen Immunsystem sind bisher weitgehend unbekannt.

1996 wurde mit CXCR4 der erste vom HIV-1 genutzte Chemokinrezeptor identifiziert, der primär auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten präsentiert wird.³⁸ Der natürliche Ligand von CXCR4 ist das CXC-Chemokin SDF-1. Als zweiter Korezeptor des HIV wurde CCR5 identifiziert, der primär in der Membran von Makrophagen vorliegt. Die natürlichen Liganden von CCR5 sind die Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β .^{39;40}

Die Korezeptoren CXCR4 und CCR5 sind für die HIV-Infektion *in vivo* maßgeblich von Bedeutung. Sie können von jedem heute bekannten HIV-Stamm genutzt werden.⁴¹⁻⁴³

Nach der Entdeckung des HIV wurden zunächst unterschiedliche Replikationseigenschaften der Viren in Blutproben von verschiedenen Patienten *in vitro* beobachtet. Dieses zeigte sich besonders im jeweils infizierten Zelltyp und einer dadurch offensichtlich unterschiedlichen Replikationskinetik. Viren, die von Makrophagen (Korezeptor CCR5) exprimiert wurden, zeichneten sich durch eine relativ langsame Replikationsrate aus, während Viren, die von T-Lymphozyten (Korezeptor CXCR4) exprimiert wurden, eine sehr hohe Replikationsrate aufwiesen. Zunächst wurde daher zwischen M-tropen und T-tropen Virenstämmen unterschieden.⁴⁴⁻⁴⁷

Diese Unterscheidung wurde erst später mit dem eigentlichen Krankheitsverlauf in Zusammenhang gebracht. Im frühen Stadium der Krankheit dominieren CCR5-nutzende M-trope Virenstämmen, die primär Makrophagen infizieren.⁴⁸ M-trope Virenstämmen werden auch als R5-Stämme bezeichnet. Nach einer Abnahme des Virentiters unterhalb der Nachweisgrenze für die Medizin bildet sich jedoch ein anderer dominierender Phänotyp des Virus heraus. Dieser Phänotyp stellt die CXCR4 nutzenden bzw. T-tropen Virenstämmen dar. T-trope Virenstämmen werden auch als X4-Stämme bezeichnet. Der Ausbruch der Krankheit AIDS steht in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten dieser T-tropen Virenstämmen. Es existieren ebenfalls Virenstämmen, die sowohl CCR5 als auch CXCR4 als Korezeptor nutzen können. Diese werden als R5X4-Stämme bezeichnet und besitzen die Fähigkeit, den genutzten Korezeptor schnell wechseln zu können. Diese Fähigkeit wird als viraler Tropismus

bezeichnet. Der virale Tropismus scheint in engem Zusammenhang mit der Glycosylierung des HIV-Rezeptors GP120 zu stehen.^{49;50}

CCR5 und CXCR4 sind strukturell ähnliche Chemokinrezeptoren, die aus sieben transmembranständigen Helices aufgebaut sind (Abbildung 1-7). Es wird angenommen, dass die zweite extrazelluläre Loop (ECL2), die Glycosylierung von CCR5 bzw. CXCR4 und drei sulfatierte Tyrosine im N-Terminus für die Korezeptorbindung des entsprechenden Virenstammes mitverantwortlich sind.⁵¹⁻⁵³ Abbildung 1-7 zeigt eine schematische Übersicht der Unterschiede zwischen CXCR4 und CCR5. CXCR4 weist gegenüber CCR5 als Hauptunterschied zwei Glycosylierungsstellen auf, eine im N-Terminus und eine in der ECL2. CCR5 weist lediglich eine Glycosylierungsstelle im C-Terminus auf. Die unterschiedlichen Glycosylierungsmuster der extrazellulären Loops haben großen Einfluss auf die Funktionalität der beiden Korezeptoren. Eine Entfernung der Glycanstrukturen des CXCR4 ermöglicht die Bindung an R5-Virenstämme während die Bindung an X4-Virenstämme nicht beeinflusst wird.⁵² Darüber hinaus scheint die relative Gesamtladung der ECL2 eine Bedeutung für die T- bzw. M-tropen Virenstämme zu besitzen. Verändert man die relative Gesamtladung der ECL2 des CXCR4, ist eine Bindungsverschlechterung an X4-trope Virenstämme zu beobachten.

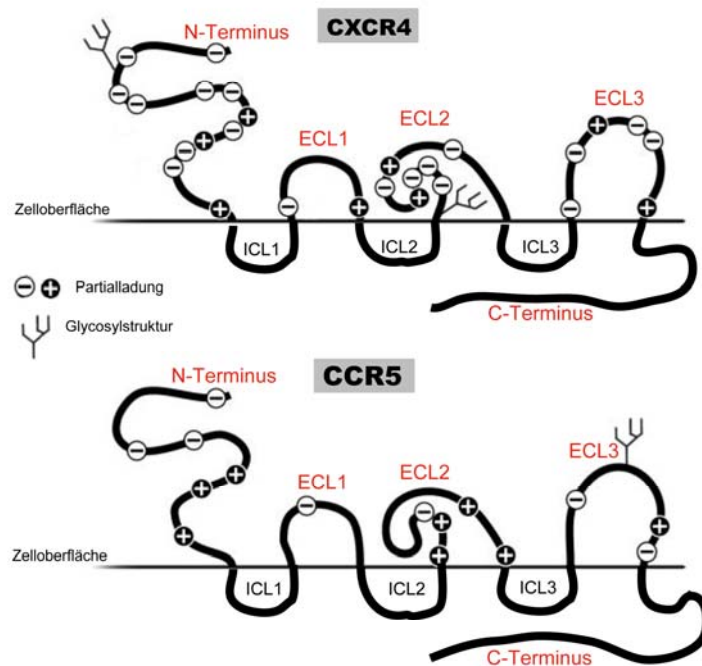


Abbildung 1-7: Schematische Übersicht der Unterschiede zwischen CCR5 und CXCR4.

CCR5 ist aus sieben transmembranständigen Helices (TMs) aufgebaut. Drei Helices (ECLs) und der N-Terminus liegen extrazellulär vor, während drei weitere Helices (ICLs) und der C-Terminus intrazellulär vorliegen. Der extrazelluläre N-Terminus des CCR5 weist ein bis

drei sulfatierte Tyrosine auf, denen eine besondere Bedeutung beigemessen wird. Ist die Sulfatierung durch genetische Einflüsse verringert oder gestört, wird die Rezeptoraktivität von CCR5 deutlich reduziert. Darüber hinaus wird angenommen, dass die zweite extrazelluläre Loop (ECL2) des CCR5 für die Bindung des Virus eine hohe Bedeutung aufweist. Durch sie scheint die Ausbildung der bindungsaktiven Konformation des Korezeptors verursacht zu werden, während die anderen ECLs das eigentliche Bindungsepitop bilden.⁵⁴⁻⁵⁶

Für M-trope HIV-1-Virenstämme wird CCR5 als Korezeptor außerordentlich wichtig angesehen, da es Menschen mit einer genetischen Besonderheit gibt, die HIV zwar ausgesetzt waren, aber nicht infiziert wurden. Die genetische Besonderheit äußert sich in einem der CCR5-Allele die eine 32-Basenpaare Deletion aufweisen ($\Delta 32$ -Deletion). Dadurch wird eine verkürzte Form des Korezeptors exprimiert, der dadurch nicht mehr vollständig auf der Zelloberfläche präsentiert werden kann. Denen zu Beginn der Infektion fast ausschließlich vorliegenden M-tropen Virenstämmen fehlt somit der notwendige Korezeptor auf den humanen Makrophagen, um den Fortgang der Infektion zu ermöglichen.^{57,58}

1.5 Glycoproteine - Aufbau und Funktion

Glycoproteine stellen in höheren Zellen und Pflanzen eine weit verbreitete und wichtige Naturstoffklasse dar. Glycoproteine dienen z.B. als strukturelle Bestandteile der Zelle (Strukturproteine), Komponenten der Zellsignalprozesse (Membran- und Signalproteine) und als Hormone.^{59,60} Es sind viele weitere Funktionen bekannt und es besteht die Theorie, dass mehr Glycoproteine als reine Proteine ohne Kohlenhydratseitenketten in der Natur vorkommen.^{61,62} Glycoproteine stehen im Mittelpunkt der aktuellen Forschung, da deren Kohlenhydratstrukturen wichtige Funktionen übernehmen. Es sind beispielsweise über 30 genetisch bedingte Krankheiten bekannt, die durch fehlerhafte Glycosylierung ausgelöst werden.⁶² Die außerordentlich wichtige räumliche Konformation von Glycoproteinen in ihrer aktiven Form wird durch den Kohlenhydratanteil stabilisiert und beeinflusst. Dieser Anteil vermag darüber hinaus ein Glycoprotein vor proteolytischen Angriffen zu schützen. Die Glycosylierung von Proteinen ist ebenfalls außerordentlich wichtig für zahlreiche Aspekte und Funktionen des Immunsystems.⁶¹ Glycoproteine sind Aminosäureketten, an denen an bestimmten Positionen Kohlenhydratstrukturen kovalent gebunden sind. Diese Strukturen werden *in vivo* als posttranslationale Modifikation an Asparagin-, Serin-, Threonin-, Hydroxylysin-, Hydroxyprolin- und Cystein-Reste gebunden. Je nach Art der glycosydischen Bindung zwischen dem reduzierenden Ende der Kohlenhydratseitenketten und der funktionellen Gruppe der Aminosäure im Protein unterscheidet man drei Arten von Glycoproteinen.^{61,63}

In der häufigsten Klasse der *O*-Typ-Glycoproteine liegt der Kohlenhydratrest über das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette gebunden vor.⁶³ Seltener können die Kohlenhydrate auch entsprechend an Hydroxylysin oder Hydroxyprolin gebunden vorliegen. *O*-Typ-Glycoproteine werden posttranslational im endoplasmatischen Retikulum glycosyliert

und im Golgi-Apparat fertiggestellt.⁶² Die kovalent gebundenen Oligosaccharidreste bauen sich aus den Monosaccharidkomponenten GalNAc, Gal, Fuc, GlcNAc und NeuNAc auf und tragen teilweise Sulfatgruppen. Ein Charakteristikum der natürlich vorkommenden O-Glycoproteine ist die extreme Mikroheterogenität. Eine Einteilung der O-Glycoproteine erfolgt über die Klassifizierung nach bestimmten nichtspezifischen Kohlenhydratsequenzen (*core*-Regionen). Abbildung 1-8 zeigt die z. Zt. bekannten sechs bis acht *core*-Typen (abhängig von der Definition) der O-Typ-Glycoproteine.

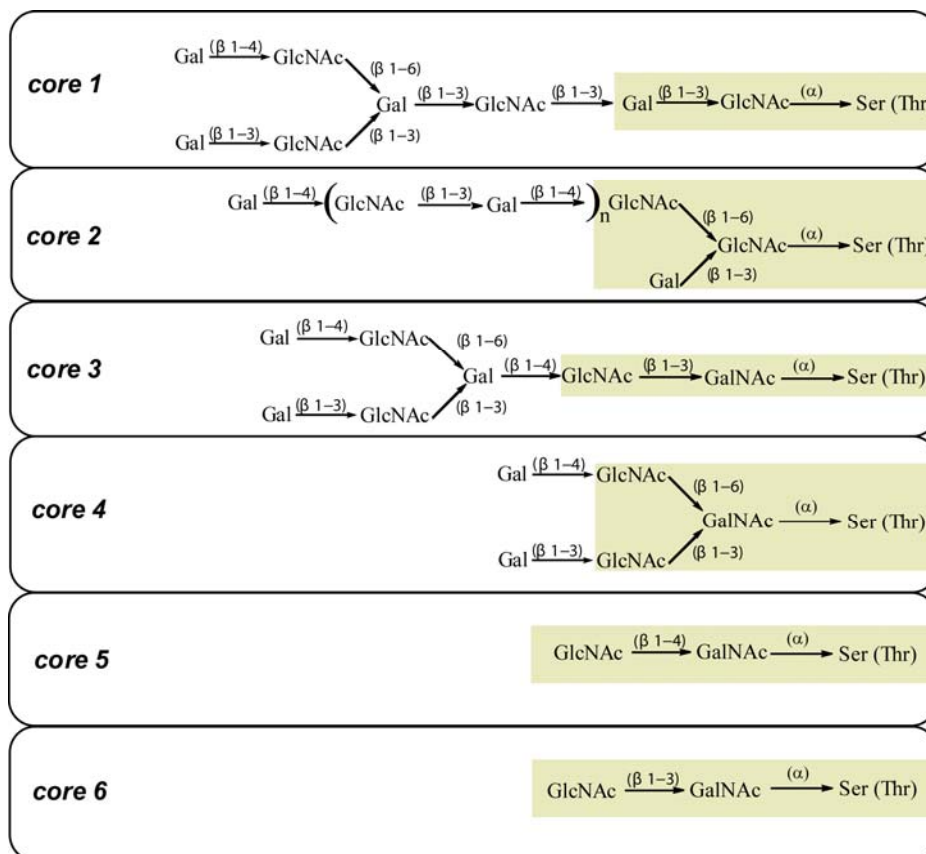


Abbildung 1-8: Übersicht der core-Typen der O-Typ Glycoproteine.

N-Typ-Glycoproteine treten weniger häufig auf als O-Typ-Glycoproteine, sind biologisch allerdings außerordentlich relevant. Bei N-Typ-Glycoproteinen ist der Kohlenhydratrest kovalent an den Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette gebunden (N-glycosidische Bindung). N-Typ-Glycoproteine werden ebenfalls posttranslational im endoplasmatischen Retikulum glycosyliert. Sie werden jedoch zunächst alle mit einem einheitlichen Oligosaccharidvorläufer verknüpft und anschließend im Golgi-Apparat modifiziert.⁶⁴ Die Einteilung der N-Typ Glycoproteine erfolgt anhand der an die Seitenkette des Proteins gebundene Kohlenhydratstruktur. Man unterscheidet drei Typen, die in Abbildung 1-9 wiedergegeben sind.

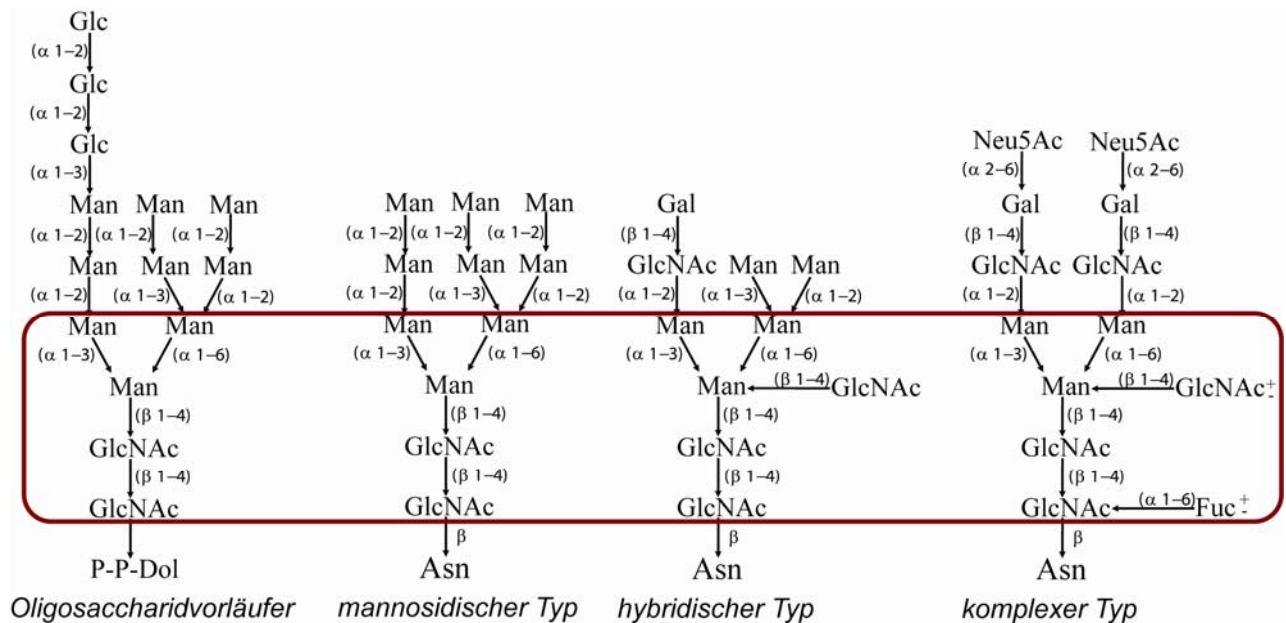


Abbildung 1-9: Übersicht der core-Typen der N-Typ Glycoproteine.

Allen gemeinsam ist, im Gegensatz zu den O-Glycoproteinen, ein als *core*-Struktur bezeichnetes Pentasaccharid.⁶⁵ Diese Kernstruktur ist aus zwei β -1,4 verknüpften GlcNAc-Einheiten aufgebaut, an die eine β -1,4 verknüpfte Mannose-Einheit gebunden ist. An dieser Mannose-Einheit liegt je eine α -1,3 verknüpfte und eine α -1,6 verknüpfte Mannoseeinheit vor.⁶⁶ Die Bindung zwischen dem Amidstickstoff des Asparagins und der ersten Einheit der *core*-Struktur, einem GlcNAc, liegt immer in β -Konfiguration vor. Die Klassifizierung in (hoch-)mannosidischen, hybriden und komplexen Typ erfolgt anhand der von dieser *core*-Struktur abzweigenden weiteren Strukturen. Diese Abzweigungen werden als antennäre Verzweigungen bezeichnet. Je nach Komplexizität der Kohlenhydratstruktur können diese Verzweigungen viele Dutzend Verästelungen aufweisen. Die *core*-Struktur weist als hochkonserviertes Motiv eine wichtige Bedeutung auf, deren Funktion jedoch noch nicht aufgeklärt wurde.

N-Typ Glycoproteine unterliegen einer Restriktion im Einbau eines N-Glycans. Es muss eine bestimmte Sequenzabfolge innerhalb der Aminosäurekette vorliegen, damit im Golgi-Apparat eine kovalente Bindung zwischen einem Kohlenhydrat und der Seitenkette eines Asparagins geknüpft wird. Diese Sequenzabfolge ist N-X-S/T-Y, wobei im Zusammenhang mit Threonin an Stelle des X jede Aminosäure außer Prolin erlaubt ist.^{67;68} Im Zusammenhang mit Serin darf X nicht die Aminosäuren Tryptophan, Asparaginsäure und Glutamin darstellen.⁶⁹ Darüber hinaus kann es sich bei Y um jede Aminosäure außer Prolin handeln.^{67;68} Anhand der Sequenzabfolge der Aminosäuren lassen sich bereits Aussagen über potentielle Glycosylierungsstellen innerhalb eines Glycoproteins treffen.

Die am wenigsten verbreitete Klasse der Glycoproteine sind die relativ seltenen S-Typ Glycoproteine. Hier liegt der Kohlenhydratrest über ein Schwefelatom gebunden in der Seitenkette eines Cysteins vor. Über S-Typ Glycoproteine ist wenig bekannt.

Da in vielen Glycoproteinen *O*-, *N*- und *S*-Glycosylierungen nebeneinander auftreten sind die Anzahl und die Variationen der Glycoproteine extrem vielfältig.⁷⁰

1.6 Das virale Glycoprotein 120 des HIV

Der Kontakt des HIV mit der humanen Zelle wird über das virale Glycoprotein 120 (GP120) eingeleitet. Es weist eine Masse von 120 kDa auf und ist je nach HIV-Stamm aus 470 bis 500 Aminosäuren aufgebaut. GP120 gehört zur Klasse der *N*-Typ Glycoproteine und beinhaltet 24 bis 26 potentielle *N*-Typ-Glycosylierungsstellen.^{63;71} 50 % der Masse des GP120 entfallen auf den Anteil der Glycosylstrukturen, die sowohl dem komplexen als auch dem hochmannosischen Typ angehören.⁷²

Die Aminosäuresequenz des GP120 resultiert in einer Tertiärstruktur, die durch neun Disulfidbrücken bestimmt wird. Der in Abbildung 1-10 gezeigte Aufbau des GP120 zeigt fünf hypervariable Loops (*variable loops* V1-V5), die durch fünf hochkonservierte Abschnitte (*constant* C1-C5) miteinander verbunden sind.⁷³ Den variablen Loops des GP120 kommen dabei besondere Aufgaben zu. Sie sind verantwortlich für die eigentlichen viralen Eigenschaften des HIV. Durch die replikationsbedingte Varianz weisen die variablen Abschnitte in ihrer Sequenz Deletionen und Insertionen auf, was zu hohen Sequenzabweichungen zwischen verschiedenen HIV-Stämmen führt (bis zu 25 %).

Antikörperstudien zeigen, dass die variablen Bereiche des GP120 an der Oberfläche der nativen tertiären Struktur exponiert sind, während die konservierten Abschnitte den zentralen Kernbereich bilden.⁷⁴ Die variablen exponierten Abschnitte werden dabei teilweise von *N*-Glycanen in ihrer Struktur vor einer möglichen Erkennung durch humane Antikörper geschützt.^{19;75}

1998 gelang es erstmals, GP120 in Kontakt mit CD4 röntgenkristallographisch zu untersuchen. Der von Kwong *et al.* kristallisierte Komplex ermöglichte erstmals ein detaillierteres Verständnis des räumlichen Aufbaus und der Bindung des CD4 an GP120.^{19;20} Der untersuchte ternäre Komplex stellt allerdings nur ein modifiziertes GP120 in Kontakt mit einem CD4-Fragment und einem Antikörper F_{ab}-Fragment dar. GP120 ist in der Röntgenstruktur N- und C-terminal um 52 bzw. 19 Aminosäuren verkürzt, die variablen Bereiche V1, V2 und V3 fehlen vollständig und alle *N*-Glycanstrukturen sind enzymatisch bis auf das terminale *N*-Acetylglucosamin entfernt worden. In dieser Röntgenkristallstruktur bildet das GP120 eine innere und äußere Domäne aus, die durch ein viersträngiges Faltblatt (*bridging sheet*) miteinander verbunden sind. Das für die Bindung CD4/GP120 verantwortliche Epitop liegt in der Röntgenkristallstruktur diskontinuierlich auf sechs regional voneinander getrennten konstanten Abschnitten des GP120 vor.⁷⁶

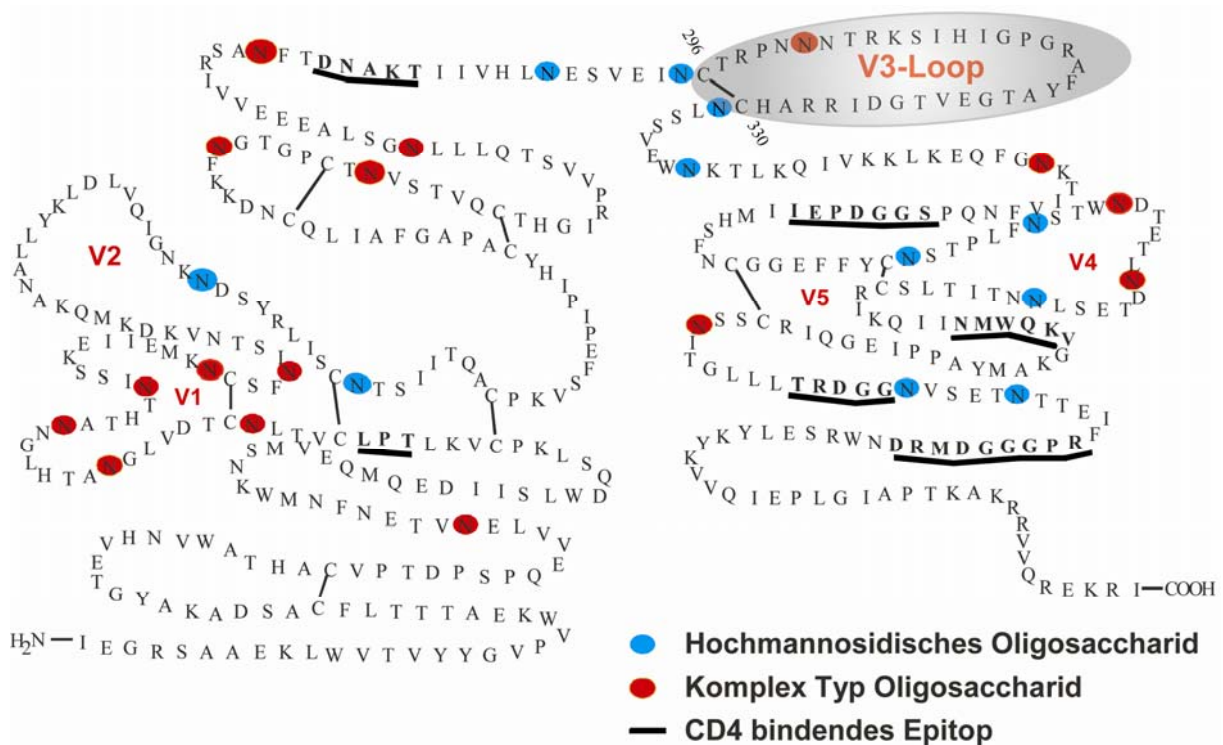


Abbildung 1-10: Schematische Übersicht des GP120.

2006 gelang es Huang *et al.*, GP120 in Kontakt mit CD4 und einem Antikörper zu kristallisieren. Die grundlegenden Ergebnisse in Bezug auf GP120 konnten bestätigt werden, jedoch waren in dieser Struktur die variablen Loops ebenfalls enthalten. Hierdurch konnte die Bedeutung der V3-Loop für die Infektiosität, die Korezeptornutzung und den viralen Tropismus hervorgehoben werden. In der Arbeit von Huang *et al.* fehlt jedoch ebenfalls die hochkonservierte *N*-Glycan-Struktur an Position N301 (Glycosylstruktur g15) innerhalb der V3-Loop des GP120.⁷⁷

GP120 weist allein durch Aminosäuresubstitutionen innerhalb der variablen Loops V1 bis V5 eine enorme Variabilität in seiner Sequenz auf, die durch das Glycosylierungsmuster jedoch noch erhöht wird. Die Funktion des hohen Kohlenhydratanteils steht seit Jahren im Blickpunkt der wissenschaftlichen Arbeit und wird kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten scheinen zu belegen, dass die Kohlenhydratstrukturen essentiell für die Bindung des GP120 an die Korezeptoren und den viralen Tropismus sind, während andere Arbeiten den Schluss nahe legen, dass die Kohlenhydrate lediglich für die korrekte strukturelle Faltung des Proteins verantwortlich sind.⁷⁸ Neuere Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die Kohlenhydratstrukturen ebenfalls eine Schutzfunktion für das GP120 besitzen, indem ein *glycan-shield* bestimmte Bereiche des GP120 vor der Erkennung durch das humane Immunsystem schützt. Eine Veränderung der Glycosylierung des GP120 scheint eine „Demaskierung“ der peptidischen Epitope und eine verbesserte Erkennung durch das humane Immunsystem zur Folge zu haben.^{79;80}

Exprimiert man GP120 rekombinant ohne die nativen Glycosylstrukturen erhält man eine GP120-Variation, die nicht mehr in der Lage ist, an CD4 zu binden.^{81;82} Aus diesem Ergebnis wurde gefolgert, dass die nativen Glycosylstrukturen essentiell für den Erhalt der Funktion des GP120 sind. Dies gilt jedoch nur für die Entfernung aller Glycosylstrukturen, da Punktmutationen *in vivo* nur zum Verlust einer Glycosylierungsstelle im GP120 führen, dies jedoch keine Auswirkung auf die Infektiosität des GP120 hat.^{83;84} Entfernt man jedoch enzymatisch die terminalen Sialylsäurereste der Kohlenhydratstrukturen des GP120 resultiert eine deutlich verringerte Antikörperbildung des humanen Immunsystems in der ersten Phase der Infektion.⁸⁵ Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch mannosespezifische Lektine, die eine Interaktion mit den Kohlenhydraten des hochmannosischen Typs eingehen, die Infektion von CD4⁺-T-Zellen vollständig unterbunden werden konnte.⁸⁶ Interessanterweise bindet enzymatisch vollständig deglycosyliertes GP120 weiterhin an CD4 in gleichem Maße wie die native Form.⁸⁷

Es konnte festgestellt werden, dass bestimmte Glycosylierungsstellen sehr starken Einfluss auf die Infektiosität des Virus aufweisen. Eine Entfernung der *N*-Glycane im V1-, V2- und V3-Bereich des GP120 resultiert in einer stark verminderten Replikationsfähigkeit von T-tropen HIV-1 Stämmen.⁸⁸ Entfernt man die Glycosylstrukturen im CD4-bindenden konstanten Bereich des GP120 ist eine abgeschwächte Bindung zum CD4 zu beobachten.⁸⁹

Eine der stärksten Beeinflussungen erfolgt jedoch durch Entfernung der hochkonservierten Glycosylierungsstelle g15 an Position N301 innerhalb der V3-Loop (Abbildung 1-11). Ein Fehlen der Glycosylierungsstelle an dieser Position erhöht die Neutralisierung des HIV durch Antikörper um den Faktor 100.⁹⁰ Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Glycosylierungsstelle innerhalb der V3-Loop ebenfalls für den viralen Tropismus mitverantwortlich ist. Entfernt man g15 ergibt sich eine ausschließliche Bindung an CXCR4, während CCR5 nicht mehr gebunden wird.^{49;50;91;92} Um jedoch präzisere Aussagen über den Einfluss der Glycosylstrukturen innerhalb des GP120 treffen zu können, sind weitere Untersuchungen im Bereich der Bindungsstudien und Konformationsanalyse erforderlich.

1.7 Die V3-Loop des GP120 des HIV

Der V3-Loop des GP120 wird ein starker Einfluss auf die Eigenschaften des jeweiligen Virenstammes zugeschrieben.⁹³ Sie ist von entscheidender Bedeutung für die eigene Replikation des Virus und den HIV-Entry über die Korezeptoren, da die Deletion der V3-Loop nicht-replikationsfähige Viren zur Folge hat.⁹⁴ Die V3-Loop ist aus 31 bis 39, im Regelfall 35, Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 1-11) und wird durch zwei disulfidverbrückte Cysteine geschlossen. Die Disulfidbrücke ist von großer Bedeutung für die räumliche Struktur der V3-Loop und des GP120.⁹⁵ Innerhalb der V3-Loop befindet sich eine hochkonservierte *N*-Typ-Glycosylierungsstelle des komplexen Typs. Diese Glycosylierungsstelle scheint großen Einfluss auf Infektiosität, den viralen Tropismus und die räumliche Struktur der V3-Loop zu besitzen.⁹⁶ Die benachbarten Glycosylierungsstellen

sind vom hochmannosidischen Typ. Es existieren Virenstämme mit Deletionen und Insertionen innerhalb der V3-Loop, die jedoch relativ selten sind.⁹⁷

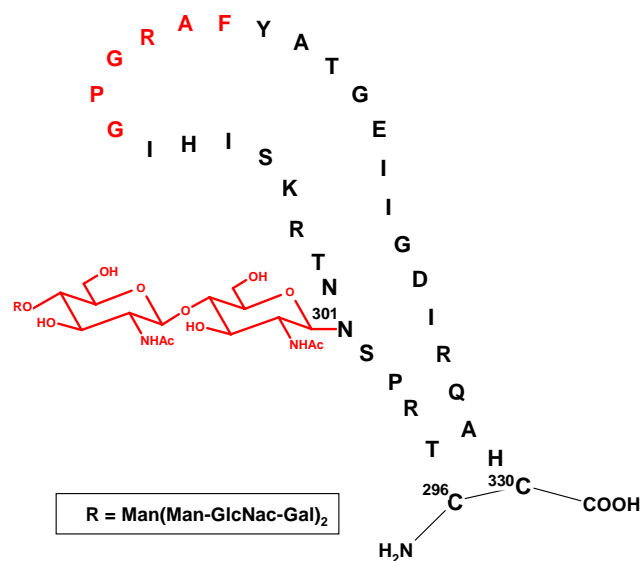


Abbildung 1-11: Schematische Übersicht der V3-Loop (Nummerierung bezogen auf die Sequenz von GP120).

Der Austausch der V3-Sequenz eines R5-tropen Virus gegen die Sequenz eines X4-tropen Virus resultiert in einem X4-tropen Virenstamm. Durch den Austausch der V3-Loop ist demnach der virale Tropismus direkt beeinflussbar. Es ist ebenfalls möglich, die V3-Sequenz innerhalb eines Virenstammes gegen die Sequenzen der Chemokinliganden SDF-1 und MIP-1 α zu ersetzen, was zu einer Infektion CXCR4- bzw. CCR5-tragender Zellen führt.⁹⁸ Die Interaktion zwischen HIV und Korezeptor wird erheblich durch einzelne Aminosäuren beeinflusst, die innerhalb der V3-Sequenz liegen.⁹⁹ Eine Mutation des Arginins an Position 298 (bezogen auf GP120) innerhalb der Loop, das in direkter Nachbarschaft zum glycosylierten Asparagin liegt, führt beispielsweise zu einer starken Reduktion der Infektiosität.¹⁰⁰

Erkenntnisse der letzten Jahre belegen eine direkte Interaktion zwischen der V3-Loop und CCR5 bzw. CXCR4 und den jeweiligen Einfluss der Glycosylierung auf diese Interaktion. Die V3-Loop steht im Verdacht, den Virus vor einer Erkennung durch das humane Immunsystem zu schützen.¹⁰¹ Neueste Studien deuten jedoch darauf hin, dass neben der V3-Loop auch die erste und zweite hypervariable Loop in direktem Zusammenhang mit der Funktion der V3-Loop stehen und indirekt an der Korezeptorbindung und dem viralen Tropismus beteiligt sind.¹⁰²

Die V3-Loop kann grob in drei Bereiche eingeteilt werden. Der erste Bereich ist die relativ konstante Basis (*base*), mit der die V3-Loop in die innere Domäne des GP120 eingebettet ist. Den zweiten Bereich stellt der flexible Stammbereich (*stem*) dar, mit dem die Loop aus der inneren Domäne des GP120 herausragt und dem dritten Bereich, bei dem es sich um die

Spitze der V3-Loop handelt. Die Spitze (*tip* oder *crown*) bildet eine Ausnahme, da es sich um die zentral gelegene kurze hochkonservierte Sequenz GPGRAPHAF handelt. Diese kann jedoch je nach Subtyp ebenfalls leicht variieren. Die Spitze der V3-Loop wird in der Literatur oft als „Haarnadel“ bezeichnet, da es sich hier um ein *turn*-Motiv (β -*turn*) handelt („ β -*hairpin tip*“). Das *turn*-Motiv stellt einen signifikanten strukturellen Bereich dar und hat entscheidenden Einfluss auf die Tertiärstruktur des GP120.⁹⁶ Da gegen das GPGRAPHAF-Motiv zu Beginn einer Infektion vom humanen Immunsystem Antikörper gebildet werden, wird es auch als Prinzipiell Neutralisierende Domäne (PND) bezeichnet.^{103;104} Die gebildeten Antikörper sind jedoch nicht in der Lage, die humanen Zellen langfristig vor einer Infektion zu bewahren. Dennoch wird dem GPGRAPHAF-Motiv eine entscheidende Rolle in der Interaktion mit den humanen Zellen zugeschrieben, da es maßgeblich an der Korezeptorbindung beteiligt ist.⁸⁵ NMR-Studien haben gezeigt, dass Antikörper, die gegen GPGRAPHAF gebildet wurden, auch andere Regionen der V3-Loop erkennen und die Interaktion zwischen GP120, CD4 und CCR5 blockieren können.^{105;106}

Ein zweiter hochkonservierter Bereich liegt in unmittelbarer Nähe des N-Terminus der V3-Loop. Dieser Bereich beinhaltet eine hochkonservierte *N*-Typ-Glycosylierungsstelle, die fast den gleichen räumlichen Raum beansprucht wie die Loop selbst. Die Bedeutung dieser Region ist weitestgehend ungeklärt. Das *N*-Glycan an dieser Position scheint jedoch entscheidenden Einfluss auf die Infektiosität und den viralen Tropismus zu besitzen.^{49;54;92} Die räumliche Struktur der V3-Loop konnte aufgrund der Röntgenkristallstruktur von Kwong *et al.* nicht aufgelöst werden, da sie im kristallisierten Komplex fehlte.^{19;107}

Die neuere von Huang *et al.* vorgestellte Röntgenkristallstruktur der V3-Loop trägt ebenfalls kein *N*-Glycan, lässt allerdings den Schluss zu, dass die V3-Loop über zwei Bereiche mit dem sulfatierten N-Terminus und der ECL2 des CCR5 interagiert. Diese Struktur legt nahe, dass die V3-Loop wie ein „molekularer Haken“ aus dem GP120/CD4-Komplex herausragt und zunächst eine Interaktion der Basis der V3-Loop mit dem sulfatierten N-Terminus des Rezeptors stattfindet. Anschließend bindet die Spitze der V3-Loop an die ECL2 des Rezeptors (Abbildung 1-12). Experimentelle Daten konnten diese Theorie untermauern.^{108;109} Dieser Mechanismus könnte einen nachhaltigen Einfluss auf die Struktur nach sich ziehen, der eine Internalisierung des Virus erst ermöglicht.

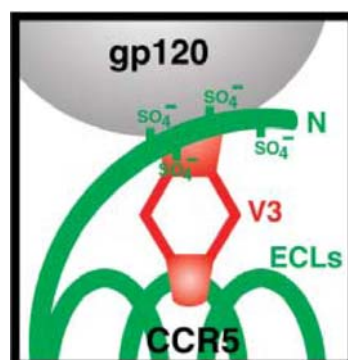


Abbildung 1-12: V3-Loop in Kontakt mit CCR5.

Es wird zurzeit kontrovers diskutiert, ob die Gesamtladung der V3-Loop, die je nach Sequenz zwischen +2 und +10 liegt, ebenfalls Einfluss auf die Infektiosität haben könnte. Es besteht die Vermutung, dass das hohe elektrostatische Potential die Interaktion mit der humanen Zellmembran verstärken kann (Abbildung 1-8).^{54;110}

1.8 Therapieansätze

Die hohe Mutationsrate des HIV und die dadurch resultierende große Anzahl von Virenstämmen innerhalb eines infizierten Patienten verhindert eine erfolgreiche Bekämpfung einer HIV-Infektion durch das eigene Immunsystem. Darüber hinaus verhindert die Schwächung des Immunsystems im Verlauf der Infektion eine erfolgreiche Immunantwort des Körpers. Durch die hohe Anzahl HIV-infizierter Personen weltweit ist die Entwicklung von Anti-HIV-Therapeutika in den Mittelpunkt vieler Forschungsprojekte gerückt. Die Forschungen zielen dabei auf unterschiedliche Abschnitte des HIV-Replikationszyklus ab. Grundsätzlich können zwei Angriffspunkte zur Behandlung gewählt werden: Die Behandlung nach einer bereits erfolgten Infektion der Zelle oder einem Schutz der Zelle vor einer Infektion durch das Virus (Impfung, Blockierung der genutzten Oberflächenrezeptoren, etc.) Die zurzeit gängigste Behandlungsmethode stellt die hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) dar.¹¹¹ Die eingesetzten Medikamente sind Inhibitoren der viralen Enzyme Reverse Transkriptase und Protease. Sie setzen nach einer bereits erfolgten Infektion an und zielen auf den Replikationszyklus des HIV in der schon infizierten Zelle ab. Diese Behandlungsform wird als Kombinationstherapie durchgeführt, da durch die gleichzeitige Verabreichung unterschiedlicher Therapeutika der Bildung resistenter Virenstämme entgegengewirkt werden soll. Es stehen vier Gruppen dieser Therapeutika zur Verfügung. Es handelt sich um drei aus der Klasse der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RTIs): die nukleosidanalogen RTIs (NRTIs), die nukleotidanalogen RTIs (NtRTIs) und die nichtnukleosidanalogen RTIs (NNRTI). Die NtRTIs stellen dabei eine Weiterentwicklung der NRTIs dar und sind zurzeit die aktuellsten Therapeutika aus der Klasse der RTIs.¹¹² Als vierte Gruppe der HAART-Therapeutika stehen darüber hinaus Proteaseinhibitoren zur Verfügung. Eine vollständige Vernichtung des Virus innerhalb des infizierten Organismus kann durch diese Behandlungsform allerdings nicht erreicht werden. Es ist jedoch möglich, Lebenserwartung und Lebensqualität der Infizierten zu erhöhen. Diese Behandlungsform wirkt nur gegen sich aktiv replizierende Viren und nach Absetzen der Medikamente steigt der Virentiter im Blut relativ schnell wieder an. Da diese Behandlung mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist und eine lebenslange Medikamentengabe erfordert, ist die Weiterentwicklung der HAART-Therapie sehr wichtig. Aufgrund der hohen Infektionsrate und der guten Verfügbarkeit in Dritte-Welt-Ländern werden jedoch in verstärktem Maße HAART-Therapeutika in diesen Regionen angewendet. Durch den Einsatz dieser Medikamente konnten bereits Erfolge in der weltweiten Bekämpfung von AIDS erzielt werden.⁵

Die zweite Behandlungsmöglichkeit setzt an der Fusion zwischen Virus und Zelle bzw. der Einbringung der viralen genetischen Information in die angegriffene Zelle an. Diese Klasse der Therapeutika wird als Fusion- bzw. *Entry*-Inhibitoren bezeichnet. Hier können grundsätzlich drei Schritte im Replikationszyklus des HIV als Ansatzpunkte genutzt werden. Die initiale Bindung des Virus über GP120 an CD4 auf der humanen Zelle, die Bindung des CD4/GP120-Komplexes an den jeweiligen Korezeptor und die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran.¹¹³ Den ersten Angriffspunkt stellt die Bindung zwischen GP120 und CD4 dar. Da eine generelle Blockierung des CD4-Rezeptors im Menschen vermutlich schwerwiegende Nebenwirkungen hätte, liegt der Fokus in diesem Bereich auf einer Blockierung des viralen GP120. Durch die außerordentlich hohe Mutationsrate des HIV und die damit verbundene Variabilität des jeweiligen GP120 ergeben sich jedoch vielschichtige Probleme. Es befinden sich zurzeit jedoch einige Medikamente dieser Klasse in klinischen Studien wie z.B. BMS-488043, PRO 140, PRO 542 etc.¹¹

Es werden ebenfalls bereits Therapeutika für den zweiten Angriffspunkt, die sekundäre Bindung des GP120 an die Korezeptoren CCR5 bzw. CXCR4, klinisch getestet.¹¹⁴ Bei diesen Therapeutika handelt es sich sowohl um Medikamente, die den jeweiligen Korezeptor als auch GP120 blockieren. Hier stehen insbesondere Antikörper gegen die V3-Loop des GP120 im Blickpunkt neuerer Untersuchungen.¹¹⁵ Obwohl die natürlichen Liganden von CXCR4 und CCR5 antivirale Aktivität zeigen, ist ihr Einsatz als Therapeutika nicht ratsam, da sie starke Nebenwirkungen besitzen.¹¹⁶ Die Blockierung des Korezeptors CCR5 jedoch scheint in diesem Zusammenhang die aussichtsreichste Perspektive zu sein. Ein kleiner Prozentsatz der Weltbevölkerung trägt innerhalb des CCR5-Rezeptors eine natürliche Deletion. Daher besitzen diese Menschen keinen funktionellen CCR5 Rezeptoren, was sich jedoch nicht negativ auf ihre Gesundheit auswirkt.⁵⁷ Da das HIV jedoch in der Lage, ist seinen viralen Tropismus zu ändern, steht die Entwicklung kombinanter Wirkstoffe im Vordergrund, die sowohl CCR5 als auch CXCR4 blockieren können. In diesem Zusammenhang wird versucht, den viralen Infektionsmechanismus nicht mehr nur auf CCR5 bzw. CXCR4-Ebene zu bekämpfen und die Korezeptoren als „Schrankenwärter“ für eine Infektion zu sehen. Die neuesten Ansätze zielen vielmehr darauf ab, die Faktoren einer HIV-Infektion in einem größeren Rahmen zu betrachten. Offensichtlich existieren redundante Infektionsdetails, die noch nicht aufgeklärt sind.¹¹⁷ Daher werden verstärkt Anstrengungen im Bereich des Einsatzes von Antikörpern gegen eine HIV-Infektion unternommen.

Der dritte Angriffspunkt stellt die Fusion der viralen und der zellulären Membran dar. Die Unterdrückung dieses Schrittes konnte bereits mit peptidischen Konstrukten erreicht werden. Diese Konstrukte leiten sich vom GP41 ab und substituieren die C- oder N-terminale Region des GP41. Sie verhindern so konformationelle Änderungen, die für eine erfolgreiche Membranfusion erforderlich sind. Es sind bereits Medikamente von unterschiedlichen Herstellern erhältlich.¹¹ Es handelt sich hierbei beispielsweise um T20 (Fuzeon[®]). T20 stellt ein 36er Peptid dar, welches dem C-Terminus des GP41 entspricht und hohe antivirale

Aktivität aufweist. Auch in diesem Zusammenhang stehen mehrere Medikamente in klinischen Testphasen. Es wird ebenfalls an der Entwicklung von Antikörpern gegen GP41 gearbeitet.^{11;118}

Obwohl kontrovers über die Möglichkeit einer Schutzimpfung vor dem HI-Virus diskutiert wird und in der Vergangenheit wiederholt versucht wurde, einen Impfstoff zu entwickeln, ist in absehbarer Zeit kein Impfstoff in Sicht. Die WHO und die UN setzen daher verstärkt auf die Aufklärung vor den Gefahren und den Ursachen einer HIV-Infektion in den betroffenen Regionen.⁵

2 Methoden

2.1 Peptid- und Glycopeptidsynthese

Für die Peptidsynthese werden heutzutage drei Methoden angewandt, bei denen die Aminosäuren in vorgegebener Reihenfolge über eine Peptidbindung, miteinander verknüpft werden. In Kapitel 2.1.1 wird die rein chemische Methode nach Merrifield näher erläutert. Die beiden anderen Methoden sind der enzymatische Aufbau unter Verwendung von Peptidasen, sowie die vor allem für Proteine angewandte, in Expressionssystemen durchgeführte, gentechnologische Synthese.^{119;120}

2.1.1 Festphasenpeptidsynthese

Ziel der chemischen Peptidsynthese ist die wiederholte Ausbildung von Peptidbindungen. Sie wird entsprechend der Sequenz des Peptids zwischen der Carboxylfunktion einer und der Aminofunktion einer anderen Aminosäure geknüpft. Da Aminosäuren bi- oder trifunktionelle Moleküle sind, müssen zur selektiven Verknüpfung der Aminosäuren Bedingungen gefunden werden, bei denen immer nur die gewünschten Funktionalitäten reagieren können. Durch den Einsatz von Schutzgruppen kann dies bewerkstelligt werden. Ferner muss beachtet werden, dass die zu reagierende Carboxylfunktion in eine reaktivere Aktivesterfunktion überführt werden muss, um die Knüpfung der Peptidbindung unter angemessen milden Bedingungen durchzuführen. Dies kann durch den Einsatz von Aktivatoren ermöglicht werden.

Durch die Entwicklung der Festphasensynthese von R. B. Merrifield (Nobelpreis 1984) wurde eine Automation der Peptidsynthese ermöglicht.¹²¹ Im Gegensatz zur biologischen Syntheserichtung werden bei der Festphasensynthese die Aminosäuren vom C- zum N-Terminus miteinander verknüpft. Die wachsende Peptidkette ist durch einen *Linker* an ein funktionalisiertes Polystyrolharz als feste Phase gebunden. Die Fixierung des Reaktionsproduktes an die Festphase ermöglicht das Arbeiten mit hohen Überschüssen und die Entfernung nicht reagierter Komponenten durch einfaches Waschen. Nach der Synthese kann das Peptid je nach Wahl des *Linkers* carboxyterminal als freie Säure oder als Säureamid vom Polystyrolharz abgespalten werden. Die Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren können durch die Wahl des *Linkers* unter geeigneten Abspaltbedingungen entfernt werden oder erhalten bleiben.

Die Synthese eines Peptids stellt sich als die wiederholte Durchführung verschiedener Entschützungs-, Aktivierungs- und Kupplungsreaktionen dar. Da die Kupplungsschritte trotz Optimierung nie quantitativ verlaufen, werden nach jeder Bindungsknüpfung noch frei vorliegenden Aminogruppen in einem *capping*-Schritt durch Acetylierung für weitere Reaktionen blockiert. Etwaige Deletionen in der Primärsequenz werden so verhindert. Der Ablauf einer Festphasenpeptidsynthese ist in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt.

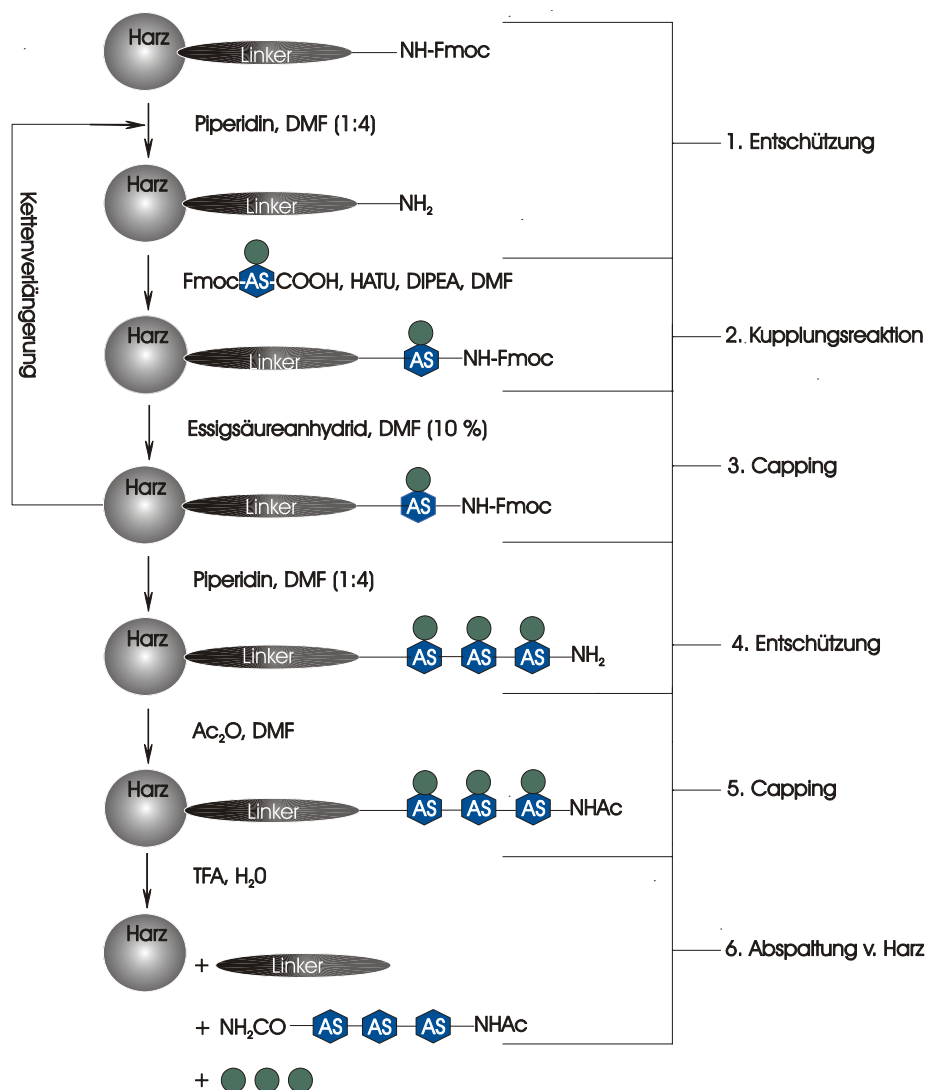


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.

Als Schutzgruppe der Aminofunktion wird häufig die 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) genutzt. Die Rohausbeute der einzelnen Kupplungsschritte lässt sich anhand des unter milden basischen Bedingungen (Piperidin/DMF 1:4) abspaltbaren Methylenefluorens photometrisch verfolgen.¹²² Als Seitenkettenschutzgruppen werden z.B. Trt-, Pbf-, *t*Bu- und Boc-Gruppen eingesetzt, die sich mit wasserhaltiger TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan (TIPS) als *scavenger* entfernen lassen. Dabei dient TIPS als Hydridionendonator und reagiert mit den während der Abspaltung gebildeten Carbokationen. Durch das Abfangen der Carbokationen werden unerwünschte Nebenreaktionen mit dem Peptid an der Festphase unterbunden.¹²³

Da die Carboxylfunktion der zu kuppelnden Aminosäure nicht reaktiv genug für eine freie Kupplung unter milden Bedingungen ist, muss diese aktiviert werden. Für die Aktivierung der Carboxylfunktion stehen verschiedene Aktivatoren zur Verfügung. Es handelt sich hierbei

primär um DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid), TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat) und HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat). Während in der Vergangenheit meist DCC als Aktivator genutzt wurde, haben sich heute die Aktivatoren TBTU und HATU etabliert.^{124;125} Sie bieten eine Reihe entscheidender Vorteile, wie hohe Ausbeuten, kurze Kupplungszeiten, gute Kupplungseffektivität bei sterisch gehinderten Aminosäuren und geringe Racemisierung.⁴⁷ Abbildung 2-2 zeigt die Strukturformeln der Aktivatoren HATU und TBTU und den vorgeschlagenen Mechanismus der Aktivierung am Beispiel von TBTU. Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Bindungsbildung ist jedoch bisher nicht aufgeklärt.

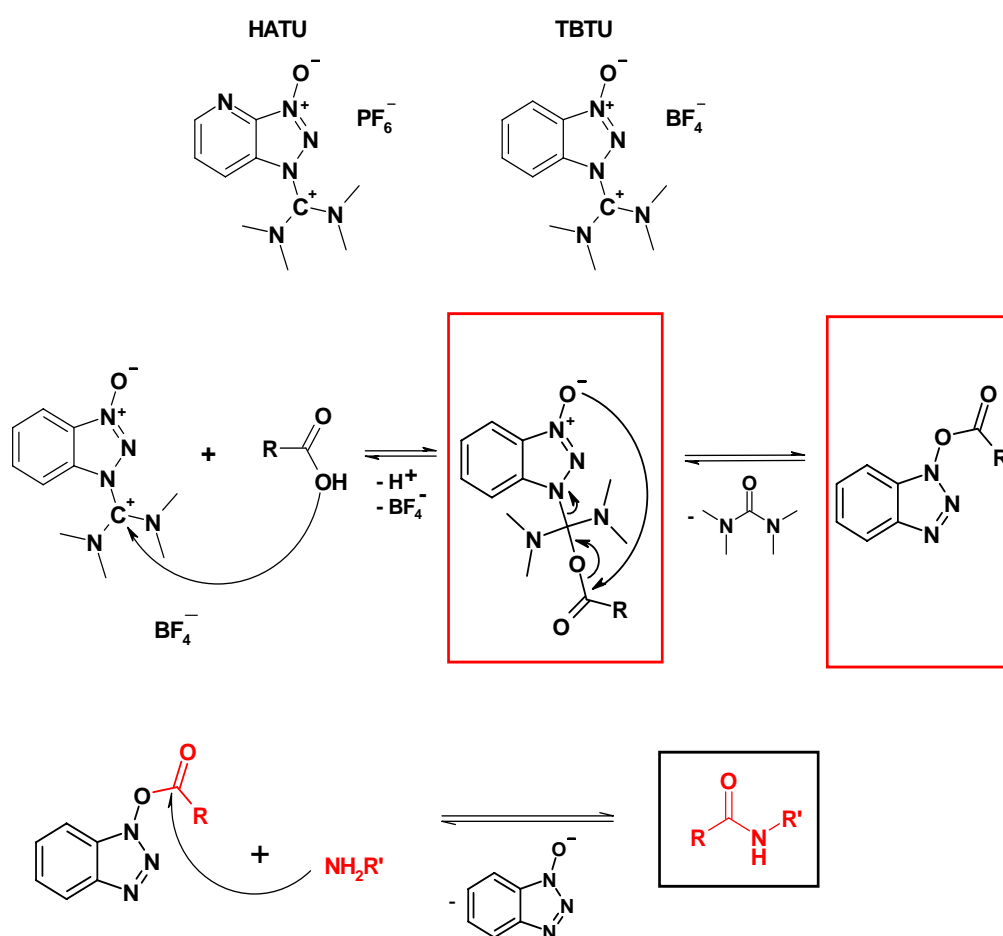


Abbildung 2-2: Die Aktivatoren HATU und TBTU und der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktionen durch TBTU. Hervorgehoben sind der Angriff der freien Aminofunktion des am Harz befindlichen Peptids an der aktivierten Säurefunktion der zu kuppelnden Aminosäure und der resultierende Aktivester.

Eine weitere Möglichkeit der Synthese von Peptiden bzw. Glycopeptiden stellt der Einsatz von bereits vor der eigentlichen Kupplung synthetisierten Aktivestern dar.¹²⁶⁻¹²⁸ Hierbei wird die α -Carboxylfunktion mittels eines Aktivators zum jeweiligen Aktivester umgesetzt und das

Produkt isoliert. Die aktivierte Aminosäure wird anschließend mit der Aminofunktion einer ungeschützten Aminosäure oder einem Glycosylamin umgesetzt. Als Aktivesterkomponente stehen Pentafluorphenyl (Pfp) oder aber 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (Dhbt) zur Verfügung (Abbildung 2-3). Die Aktivestermethode hat den Vorteil, dass sterisch anspruchsvolle Kupplungen im Vergleich zum Einsatz von TBTU/HATU mit einer höheren Ausbeute durchgeführt werden können, obwohl die durchschnittliche Ausbeute einer Peptidkupplung geringer ist. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, einzelne Kupplungen ohne komplexe Schutzgruppenstrategie durchzuführen, da lediglich die Carboxylfunktion aktiviert ist. Nachteilig an dieser Methode ist jedoch, dass sich die Aktivester der Aminosäuren im Laufe der Zeit während der Lagerung unter Rückbildung der Edukte zersetzen können. Die Zersetzung kann ebenfalls durch den Einfluss von Feuchtigkeit katalysiert werden. Darüberhinaus liegen die Kosten deutlich über denen der Kupplung mittels TBTU/HATU. Eine korrekte Lagerung und Handhabung ist bei dieser Methode von entscheidender Bedeutung.¹²⁸

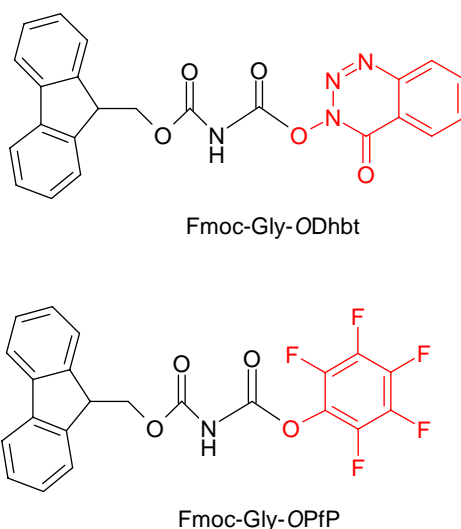


Abbildung 2-3: Die α -Aktivester der Aminosäure Glycin: *Fmoc-Gly-ODhbt* und *Fmoc-Gly-OPfp*.

In jüngster Zeit gewinnt in der Festphasenpeptidsynthese auch zunehmend der Einsatz von Mikrowellenreaktoren an Bedeutung. Der generelle Ablauf der Festphasensynthese bleibt beim Einsatz von Mikrowellen zwar gleich, durch die punktuelle massive Zufuhr von Energie kann der Zeitaufwand der jeweiligen Kupplungsschritte jedoch um bis zu Faktor 10, unter teilweise erhöhten Ausbeuten, verkürzt werden.¹²⁹

Für die Darstellung von Glycopeptiden mittels Festphasensynthese stehen zwei Synthesestrategien zur Verfügung. Die erste ist die konvergente Synthese, bei der die Glycosylierung erst nach vollendeter Synthese in das Peptid eingebaut wird.^{130;131} Die zweite

Strategie ist die sequentielle Synthese, bei der glycosylierte Aminosäuren als Bausteine während der Synthese in die wachsende Peptidkette eingebaut werden.¹³²

Bei der konvergenten Synthese werden durch Allylschutzgruppen orthogonal geschützte Aspartate an der Position der gewünschten Glycosylierung in die Aminosäurekette eingefügt. Eine selektive Entschützung ermöglicht nach durchgeführter Peptidsynthese den Einbau eines Glycosylamins an der gewünschten Position. Die konvergente Synthese hat jedoch den großen Nachteil, dass sich Peptide häufig bereits am Harz falten und eine ungünstige räumliche Konformation einnehmen. Eine nachträgliche Kupplung eines Glycosylamins kann demnach sterisch gehindert oder sogar ganz unterbunden werden. Der Vorteil liegt in der geringen einzusetzenden Menge des aufwändig zu synthetisierenden Kohlenhydrats, das häufig nur in geringen Mengen vorliegt.

Bei der sequentiellen Methode, auch Bausteinsynthese genannt, wird ein glycosylierter Aminosäurebaustein in die wachsende Peptidkette eingebaut. Der Hauptvorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, selektiv und mehrfach (auch differentiell) glycosylieren zu können. Der Einbau erfolgt unter Einsatz der gängigen Schutzgruppen für Kohlenhydrate, die nach erfolgter Synthese leicht zu entfernen sind. Die Nachteile dieser Methode sind der nicht zu umgehende Ausbeuteverlust durch die nicht quantitativ verlaufenden folgenden Kupplungen und die Anwesenheit der empfindlichen Glycosylstruktur bei allen folgenden Syntheseschritten. Ein weiteres Problem ist die zu beobachtende teilweise sehr starke Ausbeuteabnahme der Kupplung direkt nach einer Glycosylierungsstelle.

Ein Problem sowohl der konvergenten als auch der sequentiellen Synthese ist das Auftreten der intramolekularen Aspartimidbildung, die durch basenkatalysierte Abstraktion des Aspartylamid-Protons und anschließendem nukleophilen Angriff auf die β -Carboxylgruppe erfolgt.¹³³ Der gebildete Succinimidring ist thermodynamisch außerordentlich stabil und unterbindet eine Kettenverlängerung.

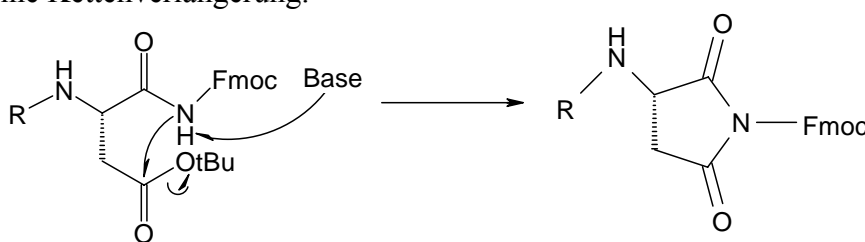


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Aspartimidbildung

Die Synthese der glycosylierten Aspartatbausteine kann auf zwei Arten erfolgen. Die erste Methode stellt die Synthese mittels eines Glycosylamins und Asparaginsäure dar. Die Asparaginsäure ist hierbei bis auf die Seitenkettencarboxylgruppe vollständig geschützt, die Aktivierung erfolgt mittels TBTU. Das Glycosylamin wird durch Aminierung des anomeren C-Atoms des ungeschützten Kohlenhydrates erhalten. Die Hydroxyfunktionen der Glycosylstruktur am gebildeten Asparaginbaustein werden abschließend acetyliert, um den

Schutz des Zuckers während der nachfolgenden Syntheseschritten zu gewährleisten. Anschließend wird die *t*Bu-geschützte α -Carboxylfunktion des Bausteins entfernt, um einen Einbau zu ermöglichen.

Die zweite Methode stellt die Knüpfung eines Glycosylamins mit einem Aktivester der geschützten Asparaginsäure dar. Auch bei dieser Syntheseform wird die verwendete Asparaginsäure bis auf die Seitenkettencarboxylfunktion geschützt eingesetzt. Diese wird jedoch vor der Kupplung mit Dhbt-OH zu einem Aktivester umgesetzt. Anschließend werden Glycosylamin und der Aktivester zusammengegeben und bilden den gewünschten Asparaginbaustein. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Vermeidung des Einsatzes von TBTU, das durch seine hohe Reaktivität viele Nebenreaktionen verursachen kann.

Die Bildung disulfidverbrückter cyclischer Peptide und Glycopeptide kann auf zahlreichen Wegen erfolgen.¹³⁴ Man kann hier die enzymatischen und die rein chemischen Methoden unterscheiden. Die chemischen Methoden gehen von zwei Cysteinen aus, die während der Synthese geschützt vorliegen und vor dem Cyclisierungsschritt simultan oder nacheinander entschützt werden, um eine Disulfidbrücke auszubilden. Die Cyclisierung kann dabei sowohl am Harz als auch in Lösung erfolgen und wird durch Oxidationsmittel katalysiert. Als Oxidationsmittel stehen Luftsauerstoff, DMSO, Iod etc. zur Verfügung. Die schrittweise Entschützung mit anschließender Cyclisierung hat sich durchgesetzt, da in stark verdünnten Lösungen gearbeitet werden kann.¹³⁵ Dies ermöglicht eine sukzessive Knüpfung der jeweiligen Disulfidbrücke und verhindert eine Polymerisation der vorhandenen Cysteine. Die Cyclisierung direkt am Harz wird primär für kleinere Peptide / Glycopeptide angewandt. Da immer stärker davon ausgegangen wird, dass Disulfidbrücken großen Einfluss auf Struktur und Bindungseigenschaften von Peptiden und Glycopeptiden besitzen, werden auch verstärkt enzymatische Möglichkeiten der Disulfidbrückenbildung untersucht.¹³⁶

2.2 Charakterisierung von Peptiden

2.2.1 Massenspektrometrie

Da Verbindungen mit hohen Molekularmassen schlecht in die Gasphase übergehen und zur Fragmentierung neigen, finden die klassischen massenspektroskopischen Methoden in der heutigen Peptidanalytik bzw. Charakterisierung kaum Anwendung.

Die MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight*)- und die ESI (*Electron Spray Ionisation*)-Massenspektrometrie stellen zwei Methoden dar, die eine schonende Ionisierung der Analyten gewährleisten. Diese Ionisierung verhindert eine Fragmentierung der zu untersuchenden Substanz.¹³⁷

Die ESI-MS stellt ein homogenes Ionisationsverfahren dar, in der die Probe aus einer Lösung in einem elektrischen Feld versprüht wird.¹³⁸ Bei dieser Methode können neben einfach geladenen auch mehrfach geladene Molekülonen auftreten. Das Auftreten der mehrfach geladenen Molekülonen kann über das Vorzeichen der Ionisierung beeinflusst werden, da die

ESI-MS sowohl im positiven als auch im negativen Modus gemessen werden kann.¹³⁹ So treten beispielsweise bei Peptiden je nach Anzahl der geladenen Seitenketten häufig mehrfach geladenen Molekülonen auf. Das Masse-Ladungsverhältnis kann zum Beispiel mit Hilfe eines Quadrupols oder Hexapols detektiert werden. Die ESI-MS ermöglicht über die Intensität der Signale quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der Probenlösung. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht in der Kopplung zwischen ESI-MS und HPLC (LC/MS), so dass Substanzgemische zunächst chromatographisch aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen direkt detektiert werden können. Neuerdings werden zunehmend gekoppelte ESI-Systeme für die Analytik eingesetzt, da diese ESI-MS/MS Systeme die Charakterisierung komplexer Substanzgemische bei einer hohen Auflösung erlauben.

Die MALDI-TOF-MS stellt ein Verfahren mittels Cokristallisation und anschließender Ionisation dar. Das zu untersuchende Substanzgemisch wird zunächst mit einer so genannten Matrix als Cokristallat auf einen Probenträger aufgebracht. Als Matrix stehen beispielsweise 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CCA) zur Verfügung. Ein Laser verdampft die Matrixmoleküle beim Auftreffen schlagartig. Dabei werden die Probenmoleküle mitgerissen, während die Ionisation der Probenmoleküle durch Ladungstransfer erfolgt. Die Detektion erfolgt mittels der zurückgelegten Flugstrecke der ionisierten Moleküle im Verhältnis zur Flugzeit („*Time of Flight*“).^{139;140} Die MALDI-TOF-MS ermöglicht die Detektion kleinster Substanzmengen im attomol-Bereich (10^{-18} mol) innerhalb kürzester Zeit. Da die Cokristallisation zwischen Analyt und Matrix nicht homogen erfolgt, können bei der MALDI-TOF-MS nur qualitative Aussagen über die Zusammensetzung des vermessenen Produktgemisches getroffen werden. Dies wird durch die teilweise sehr unterschiedlichen Ionsierungseigenschaften der Probenmoleküle noch verstärkt.

2.2.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung und Charakterisierung von Peptiden und Glycopeptiden in Lösung und somit unter nahezu physiologischen Bedingungen.¹⁴¹

Die eindimensionale NMR-Spektroskopie eignet sich hervorragend, um schnell und äußerst präzise kleine Moleküle zu charakterisieren. Im Falle größerer und komplexerer Moleküle, insbesondere bei Biomolekülen, treten jedoch starke Signalüberlagerungen auf, die eine Auswertung quasi unmöglich machen. Daher finden auf dem Gebiet der Charakterisierung von Biomolekülen zweidimensionale NMR-spektroskopische Methoden Anwendung, die eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Resonanzen eines Biomoleküls zulassen. Die wichtigsten Methoden für Peptide und Glycopeptide werden nachfolgend erläutert.¹⁴²

Das TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)-Experiment erlaubt die Zuordnung der NMR-chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäurespinsysteme eines Peptids. Die NH-Spuren eines Peptids eignen sich am Besten zur Charakterisierung, da sie bei Messung in H_2O gut dispergiert und von den übrigen Signalen separiert vorliegen. So ist es möglich, über die NH-Spuren fast alle Protonen der einzelnen Aminosäuren den Signalen zuzuordnen. Im

Idealfall ist auf einer Spur das gesamte Spinsystem der jeweiligen Aminosäure detektierbar. Die totale Korrelation der gekoppelten Spins wird durch Anlegen eines Spinlockfeldes erreicht. Spinlockzeit, Kopplungskonstanten des Spinsystems und die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen beeinflussen die Effektivität des Prozesses.

Das NOESY (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*)-Experiment erlaubt die sequentielle Zuordnung eines Peptids. Es liefert Kreuzsignale von einer Aminosäure zur benachbarten (z.B.: $\text{NH}_{\text{Aminosäure } n}$ zu $\text{H}\alpha_{\text{Aminosäure } n-1}$, Abbildung 2-5).

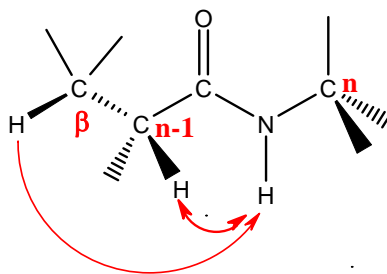


Abbildung 2-5: Darstellung sequentieller NOE-Kontakte zweier benachbarter Aminosäuren am Peptidrückgrat.

Bei der durch den Raum stattfindenden dipolaren Spin-Kopplung findet ein Magnetisierungstransfer zwischen zwei räumlich nahen Kernen (2-5 Å) statt, was einen Einfluss auf ihr Relaxationsverhalten ausübt.¹⁴³ Hierbei ist es unerheblich, ob die Spins zusätzlich über skalare Kopplung in Verbindung stehen. Diese Kreuzrelaxation führt zum Phänomen des *Nuclear-Overhauser-Effekts* (NOE).¹⁴⁴ Der räumliche Abstand der beiden Kopplungspartner hat somit direkten Einfluss auf die Intensität im NOESY-Spektrum. Eine Analyse der Signale erlaubt eine Aussage über die Sekundärstrukturen von Peptiden.

In der Kohlenhydratanalytik finden neben den bereits beschriebenen NMR-Verfahren auch nachfolgend genannte NMR-Experimente Anwendung. Das HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)-Experiment liefert eine zweidimensionale Darstellung chemischer Verschiebungen zwischen direkt miteinander verbundenen ^1H - und X-Kernen. Hierbei wird als X-Kern hauptsächlich ^{13}C bzw. ^{15}N genutzt.¹⁴⁵

Das HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)-Experiment liefert hierzu komplementäre Erkenntnisse, da hierbei die Kopplung zwischen ^1H - und X-Kernen über zwei oder mehr Bindungen dargestellt wird.¹⁴⁶

2.3 Oberflächenplasmonenresonanz - SPR

Die Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) ist ein physikalisches Phänomen, deren Anwendung es ermöglicht, biomolekulare Interaktionen zu untersuchen. SPR ermöglicht z.B. die zeitnahe Messung von Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren und die Bestimmung von Bindungsaffinitäten

Die physikalischen Grundlagen dieses optischen Messsystems wurden bereits 1959 von Turbadar beschrieben und von Otto, Kretschmann und Raether entscheidend weiterentwickelt.^{147;148} SPR hat den Vorteil, dass keinerlei *labeling* der Bindungspartner notwendig ist und somit die Moleküleigenschaften nicht beeinflusst werden. Obwohl ein Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert werden muss, bietet die Methode darüber hinaus den Vorteil, in wässrigen Systemen unter nahezu physiologischen Bedingungen Bindungsereignisse zu detektieren.⁶⁷

Die Grundlage der Oberflächenplasmenresonanz besteht aus der Totalreflexion von monochromatischem, linear polarisiertem Licht an einer reflektierenden Grenzschicht zwischen zwei optisch unterschiedlich dichten Medien (Abbildung 2-6). An dieser Grenzschicht entsteht durch Totalreflexion eine evaneszierende Welle, die jenseits der Grenzfläche exponentiell abnimmt. Falls die Grenzfläche mit einem dünnen Metallfilm eines leitenden aber nicht magnetischen Metalls (z. B. Gold) beschichtet ist, kommt es bei einem spezifischen Reflexionswinkel zu einer Wechselwirkung zwischen evaneszierender Welle und den Oberflächenplasmonen der Metallschicht. Der Reflexionswinkel ist vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängig. Die auftretende Resonanz führt zu einer Intensitätsverringerung des reflektierten Lichts bei einem spezifischen Totalreflexionswinkel. Findet ein Bindungsereignis statt, ändert sich dadurch die Lichtintensität, was wiederum über eine optische Einheit detektiert werden kann. Gemessen wird jedoch die Änderung des Winkels der Totalreflexion.¹⁴⁷ Diese Detektion findet in einer Messzelle statt, in der eine Wand die Oberfläche des Messchips darstellt. Auf der Oberfläche dieses Chips liegt einer der Bindungspartner immobilisiert vor, während der andere Bindungspartner in einem Lösungsmittel vorbeigeleitet wird. Kommt es auf der Oberfläche der Messzelle zu einem Bindungsereignis, reichert sich dort der gelöste Bindungspartner an. Dies bedeutet eine Massenzunahme auf der Chipoberfläche, was zu einer Änderung des Brechungsindex in der Lösung an der Oberfläche der Messzelle führt. Dies wiederum beeinflusst die evaneszierende Welle, was eine Intensitätsabschwächung des Lichts bei einem bestimmten Winkel zur Folge hat. Diese Abschwächung der Intensität wird in Form von *Resonance Units* (RU) angegeben.

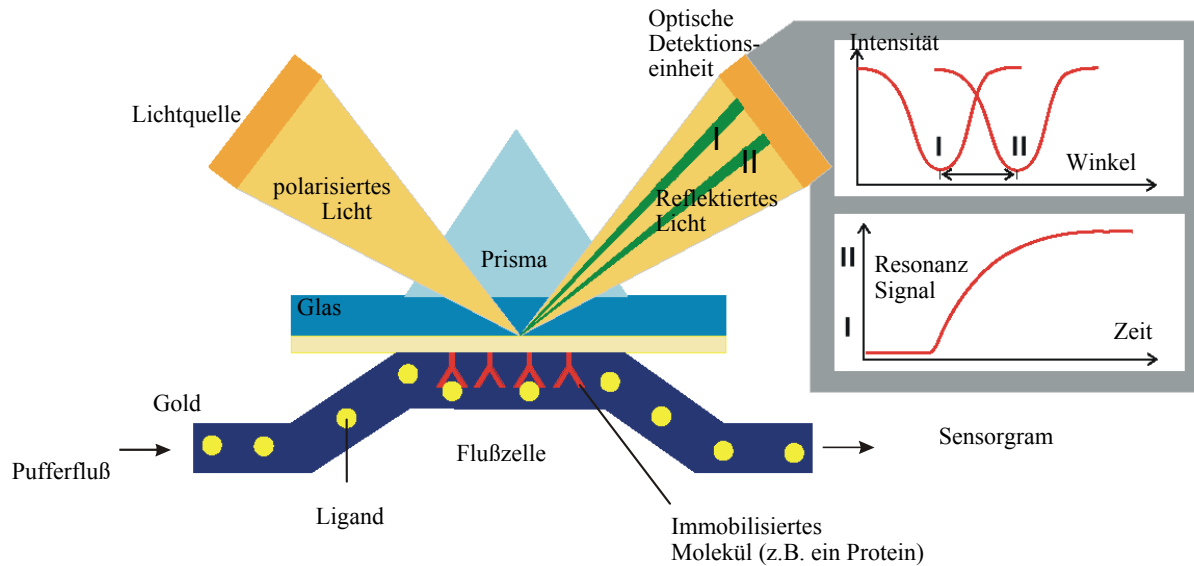


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des SPR-Experiments.

SPR ist außerordentlich empfindlich und bietet die Möglichkeit, Massenänderungen von wenigen Pikogramm (1 pg entspricht ca. 1 RU) auf der Chipoberfläche zu detektieren, was einer Winkeländerung von ca. 0.0001° entspricht. Niedermolekulare Verbindungen mit Molmassen unter 10 kDa können an immobilisierten Proteinen selbst bei Dissoziationskonstanten im mM-Bereich untersucht werden. Es ist aber auch möglich Wechselwirkungen mit größeren Bindungspartnern wie Bakterien, Viren und Zellen zu untersuchen.¹⁴⁹⁻¹⁵¹

Je nach Problemstellung stehen unterschiedliche Immobilisierungsverfahren zur Verfügung.¹⁵² Die am häufigsten genutzten CM-Messchips bestehen aus einem Glasplättchen mit aufgedampfter Goldschicht. Auf der Goldschicht befindet sich eine über Linker fixierte carboxymethylierte Dextranmatrix. Die Immobilisierung erfolgt über eine Aminkupplung. Die Carboxylfunktionen der Dextranmatrix werden durch Zugabe von *N*-Hydrosuccinimid (NHS) und *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) in Aktivester überführt, an die der zu immobilisierende Bindungspartner kovalent unter Ausbildung einer Amidbindung gebunden wird. Alle nicht belegten aber aktivierten Carboxylfunktionen werden abschließend mit Ethanolamin umgesetzt und damit inaktiviert.

Abbildung 2-7 zeigt ein idealisiertes SPR-Experiment. Die Darstellung zeigt die drei verschiedenen Phasen: Assoziation, Dissoziation und Regeneration. In der ersten Phase beginnt die Komplexbildung durch die Zugabe des Bindungspartners in den Laufpuffer. Durch die Massenzunahme auf der Chipoberfläche kommt es zur Erhöhung des SPR-Resonanzsignals. Nach einer gewissen Zeit flacht die Kurve jedoch ab und erreicht einen Maximalwert im Gleichgewichtszustand, da fast alle Bindungsstellen auf der Oberfläche des Chips mit dem Liganden besetzt sind. Dieser Zustand der Sättigung wird auch als *steady state*

bezeichnet. Ist die Injektion abgeschlossen und im Laufpuffer kein Ligand mehr vorhanden, beginnt die Dissoziation des Komplexes. Dies hat eine Abnahme der Masse auf der Chipoberfläche zur Folge und somit auch des SPR-Resonanzsignals. Bei sehr langsamer Reaktionskinetik bzw. starker Bindung kann die Dissoziation sehr viel Zeit beanspruchen. Daher wird die Chipoberfläche durch eine geeignete Regenerationsmethode für die nächste Messung von Liganden befreit. Dies kann unter anderem durch Zugabe von Detergentien (beispielsweise SDS) oder Veränderungen des pH-Werts erreicht werden. Die vollständige Regeneration der Oberfläche vor Beginn einer erneuten Messung ist außerordentlich wichtig, da die Chipoberfläche ansonst mit jeder Messung weiter belegt werden würde. Die Messergebnisse wären nicht reproduzierbar, da es einen hohen Intensitätsverlust für folgende Messungen nach sich ziehen würde.

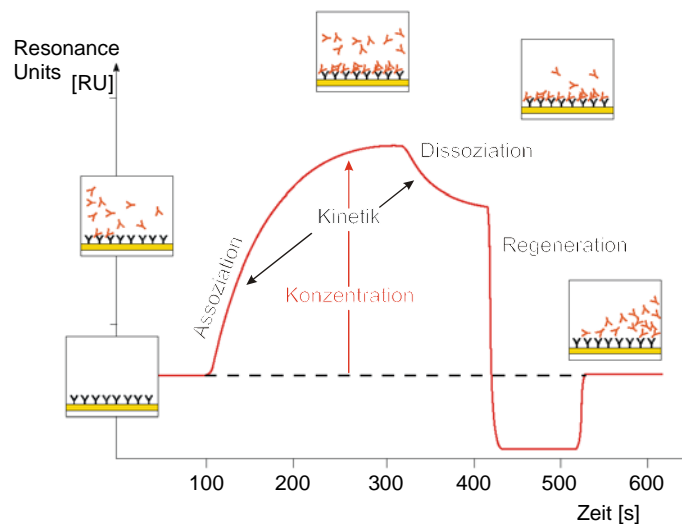


Abbildung 2-7: Schematische idealisierte Darstellung eines SPR-Experiments.

Die erhaltenen Messdaten über den erreichten Gleichgewichtszustand bzw. den Sättigungswert erlauben einen quantitativen Vergleich der Bindungsgeigenschaften verschiedener Bindungspartner. Der Kurvenverlauf des aufgenommenen Sensorgramms erlaubt im Fall einer nicht zu schnellen Reaktionskinetik die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{on} und der Dissoziation k_{off} . Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziationsreaktion K_D ergibt sich aus dem Quotienten von k_{on} und k_{off} .¹⁵³

$$K_D = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[P] * [L]}{[P * L]}$$

Gleichung 1: Formel für die Berechnung der Dissoziationskonstante.

Da sehr schnelle Austauschprozesse mit Hilfe dieser einfachen Formel nicht mehr auswertbar sind, bestimmt man die Dissoziationskonstante und damit die Gleichgewichtskonstante über

die Messung von Konzentrationsreihen. Dieser Weg ist ebenfalls notwendig, falls mit hoher Chipbelegung und/oder niedrigen Flussraten gearbeitet wird, da die Assoziation durch die Diffusion des mobilen Bindungspartners begrenzt sein kann. Dies kann zu einer falschen Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} führen. Die Dissoziationskonstante wiederum kann durch *rebinding*-Effekte beeinflusst werden, da Analyten auch mehrfach gebunden werden können.

Die Berechnung der thermodynamischen Dissoziationskonstante ist jedoch auch ohne die Kenntniss von k_{off} möglich. In diesem Falle geht man vom *one-site-binding*-Modell aus, das ein 1:1-Bindungsmodell idealisiert. Hierfür sind Messungen der maximalen RU-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des mobilen Bindungspartners nötig. Der K_D -Wert lässt sich unter diesen Voraussetzungen gemäß Gleichung 2 bestimmen:

$$RU = \frac{RU_{max} * c[Ligand]}{K_D + c[Ligand]}$$

Gleichung 2: Formel für die Berechnung der thermodynamischen Dissoziationskonstante nach dem one-site-binding-Modell.

Bei SPR-Messungen mit löslichen Liganden wird die Konstante K nach dem *one-site-binding*-Modell gleich der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D in mol/L gesetzt. Die Berechnung des K_D -Wertes kann dann unter Zuhilfenahme der Konzentration des mobilen Bindungspartners erfolgen.

Eine Berechnung des K_D -Wertes bei Messungen mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen unter Angabe einer Einheit von Zellen/mL ist jedoch nicht möglich. SPR-Experimente mit vitalen, einen Rezeptor überexprimierenden Zellen, ermöglichen lediglich eine grobe Abschätzung des K_D -Wertes. Die Rezeptorenanzahl bzw. Rezeptordichte auf der Zelloberfläche kann sich je nach Zellgeneration erheblich unterscheiden und ist daher nicht bekannt.

2.3.1 SPR-Messungen mit Zellen

SPR eignet sich sehr gut zur Bestimmung biologischer Ligand-Rezeptor- Interaktionen.¹⁵² Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen synthetischen Peptiden bzw. Glycopeptiden lässt sich unter Zuhilfenahme von CCR5 überexprimierenden *Human Osteo Sarcoma*-Zellen (HOS-Zellen) untersuchen. Die Anzahl der auf der Oberfläche vorliegenden CCR5-Rezeptoren wird auf ca. 10^5 - 10^7 geschätzt, da sie nicht exakt bestimmt werden kann.¹⁵⁴

Im zugrunde liegenden Untersuchungssystem wird das synthetische Peptid bzw. Glycopeptid über den N-Terminus kovalent an die Chipoberfläche gebunden und die HOS-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen über die Chipoberfläche geleitet. So lässt sich eine konzentrationsabhängige Bindung beobachten, die bestenfalls in einer Sättigung der Bindung endet.

Die erhaltenen RU-Werte der SPR-Messungen können jedoch nur als Anhaltspunkt der Bindung gesehen werden, da zahlreiche Faktoren die RU-Werte entscheidend mitbeeinflussen. So kann die Anzahl der Rezeptoren auf den Zelloberflächen variieren und die vitalen Zellen mittels mehrerer Rezeptoren mit dem immobilisierten Molekül interagieren. Darüber hinaus ist es möglich, dass es lediglich zu einer Interaktion mit der der Chipseite zugewandten Seite der HOS-Zellen kommen kann, da die Flusszelle des SPR-Messgerätes relativ wenig Platz für die Zellen aufweist. Daher kann der ermittelte K_D -Wert allenfalls abgeschätzt werden. Es ist jedoch möglich, Verbindungen untereinander in ihrer Bindungsstärke zu vergleichen. Betrachtet man die Bindungseigenschaften in Abhängigkeit von der Rezeptordichte im Verhältnis zu den erhaltenen RU-Antworten, ist eine qualitative Abschätzung der Bindungseigenschaften möglich. Als Negativkontrolle können sowohl die entsprechenden Parentalzellen, als auch ein zufälliges Peptid verwendet werden.

3 Problemstellung

Die Glycosylierung von Peptiden und Proteinen besitzt eine große Bedeutung in biologischen Systemen. Der primäre Rezeptor des HIV-1, das Glycoprotein 120, weist einen außergewöhnlich hohen Glycosylierungsanteil von ausschließlich *N*-glycosidisch gebundenen Saccharideinheiten auf, der 50 % seiner Gesamtmasse ausmacht. Die Funktionen und strukturellen Einflüsse dieses hohen Glycosylierungsanteils sind größtenteils unbekannt. Es wird angenommen, dass die Glycosylierung des GP120 großen Einfluss auf die Infektiösität des HIV besitzt.^{49;50;77}

Die Interaktion zwischen der V3-Loop des Glycoproteins 120 und dem Chemokinrezeptor CCR5 humaner CD4⁺-Lymphozyten findet in einer frühen Phase der HIV-Infektion statt. Ein besseres Verständnis dieser Wechselwirkung würde Möglichkeiten der Entwicklung neuartiger Ansätze zur Inhibierung des HIV-*entrys* aufzeigen. Der Glycosylierungsstelle an Position N³⁰¹ innerhalb der V3-Loop wird im Verlauf des HIV-*entrys* eine entscheidende Bedeutung zugeordnet.^{49;50;77} Daher ist eine nähere Untersuchung des Einflusses dieser hochkonservierten *N*-Typ Glycosylierungsstelle auf die Gesamtstruktur und die Bindungseigenschaften der V3-Region notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen durch Kombination aus automatisierter und manueller Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie cyclische Peptide und *N*-Typ-Glycopeptide aus der V3-Region des GP120 synthetisiert werden. Die zugrunde liegende Aminosäuresequenz der erweiterten V3-Loop entspricht der Sequenz des Patientenisolates EB1, die bereits in vorangegangenen Arbeiten verwendet wurde.^{155;156}



Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Zielverbindungen aus dem V3-Bereich des GP120 (Sequenz: Patientenisolat EB1).

In der abgebildeten primären Aminosäuresequenz ist die Position der zu knüpfenden Disulfidbrücke rot markiert. Die blaue Markierung zeigt die Position der *N*-Typ Glycosylierung an Position 301 innerhalb der V3-Loop. Es sollen zwei Glycopeptide mit unterschiedlichen Glycosylstrukturen dargestellt werden. Diese sind *N*-Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucofuranose (GlcNAc) und ein Nonasaccharid des komplexen Types Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc. Die Wahl des Nonasaccharides erfolgt aufgrund seiner Übereinstimmung mit der nativen Glycosylstruktur innerhalb der V3-Loop. Das Nonasaccharid soll enzymatisch aus einem Glycoprotein isoliert werden. Für den Einbau der *N*-Typ Glycosylstrukturen werden die jeweiligen *N*_γ-Glycosyl-Asparagin-Bausteine synthetisiert und im Rahmen einer sequentiellen Synthese in die wachsende Peptidkette eingefügt.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Zielverbindungen erfolgt mittels MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS und NMR-Spektroskopie. Anhand NMR-spektroskopischer Untersuchungen sollen vergleichbare Aussagen über strukturelle Einflüsse der Glycosylstrukturen auf die Gesamtstruktur der Glycopeptide im Vergleich zu nicht glycosylierten Verbindungen getroffen werden. Die Beeinflussung des Bindungsverhaltens der synthetisierten Verbindungen durch die unterschiedlichen Glycosylierungen soll durch SPR-Bindungsstudien mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen untersucht werden.

Die aus diesen Studien abgeleiteten Ergebnisse und Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis des Einflusses der hochkonservierten Glycosylierung an Position N³⁰¹ auf die Struktur und das Bindungsverhalten der V3-Loop aus dem GP120 des HIV führen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Glycopeptide wurde nach der in Kapitel 2.1 vorgestellten Bausteinstrategie dargestellt.

4.1 Synthese des N_γ -[3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-Asparagin Bausteins 3

2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose ist ein preiswertes und leicht verfügbares Ausgangsmaterial, um die Synthesebedingungen für die später folgenden Synthesen von Glycosylaminosäurebausteinen des komplexen Typs testen und optimieren zu können. Dabei wurde zunächst von bereits erfolgreich durchgeführten Synthesewegen ähnlicher Glycosylaminosäurebausteine ausgegangen^{154, 155} um die Synthesen optimieren zu können. Die einzelnen Schritte wurden jedoch individuell modifiziert.

Die reine 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose lässt sich gemäß Likhosherstov *et al.*¹⁵⁷ leicht durch die Einwirkung von gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung bei 50 °C innerhalb von 48 h quantitativ in das entsprechende 2-Acetamido-1,2-didesoxy-D-glucosamin überführen. Die Reaktion kann dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittel Propanol/Ethylacetat/Wasser (6:1:3) gut verfolgt werden. Die Detektion des Produktes erfolgt durch Ninhydrin-Reagenz und ermöglicht eine schnelle Beobachtung des Reaktionsverlaufes und eine Bewertung des erfolgten Reaktionsumsatzes. Diese Substitutionsreaktion lässt sich unter den genannten Bedingungen auf viele Saccharide und Oligosaccharide anwenden.¹⁵⁷

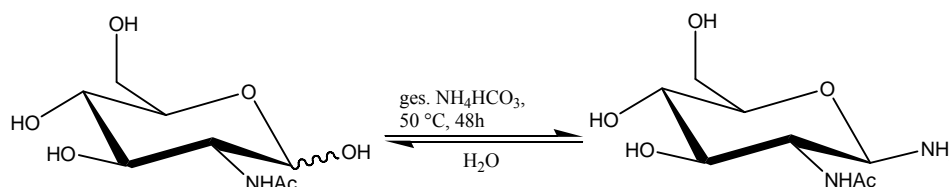


Abbildung 4-1: Darstellung von 2-Acetamido-1,2-didesoxy-D-glucosamin 1.

Da das Gleichgewicht der in Abbildung 4-1 dargestellten Reaktion in neutraler wässriger Lösung auf der Seite der Edukte liegt und keine gesättigte NH₄HCO₃-Lösung vorgelegen hätte, wurden alle nachfolgenden Schritte mit eisgekühltem Wasser durchgeführt. Nachdem mittels dünnschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung kein Edukt mehr nachgewiesen werden konnte, wurde das stark salzhaltige Rohprodukt mehrfach bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Dabei war darauf zu achten, dass das gefrorene Rohprodukt während der Trocknung nicht auftaute, was eine Rückreaktion zur 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose zur Folge gehabt hätte. Der erhaltene Rückstand wurde in so wenig Wasser wie möglich

aufgenommen und anschließend säulenchromatographisch an Biogel P-2 aufgereinigt. Eine Aufreinigung an Biogel ist empfehlenswert, um den hohen Salzanteil quantitativ abzutrennen. Eine durchgeführte Aufreinigung mittels HPLC an einer semipräparativen *RP-NH₂*-Säule lieferte kein hinreichend salzfreies Produkt. Die produktenthaltenden Fraktionen der säulenchromatographischen Aufreinigung wurden vereint und wiederum gefriergetrocknet. Produkt **1** konnte mit einer Ausbeute von 98 % erhalten werden.

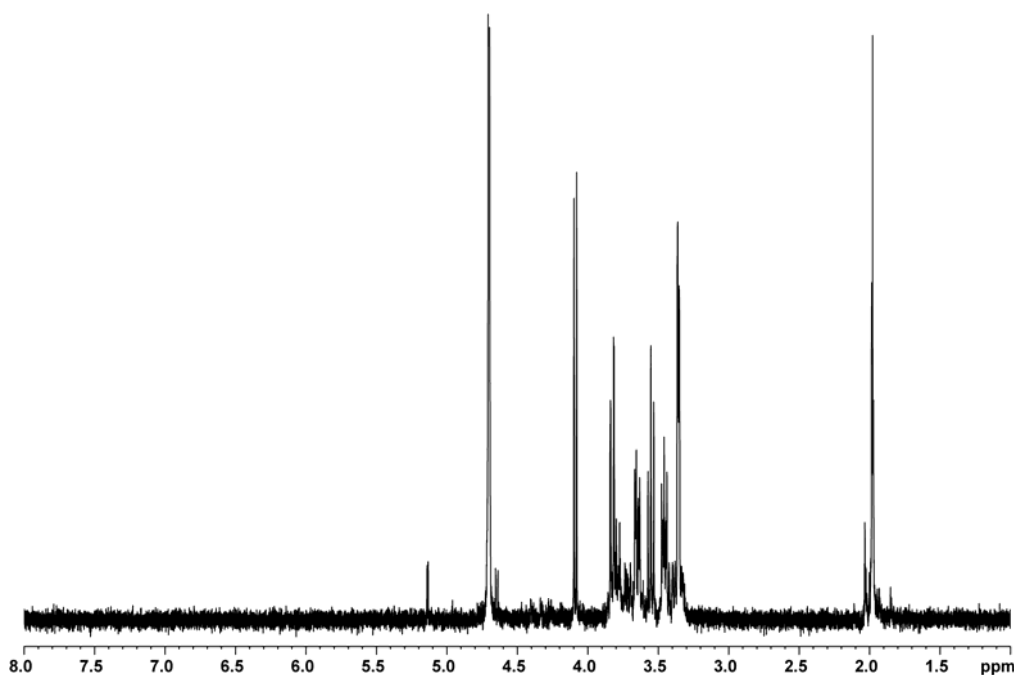


Abbildung 4-2: *¹H-NMR Spektrum des dargestellten 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosamins **1**. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in D₂O.*

Die Umsetzung des 2-Acetamido-1,2-didesoxy-D-glucosylamins **1** zum entsprechenden *N*-Glycosylaminosäurebaustein **2** wurde mit der kommerziell erhältlichen Aminosäure Asparaginsäure als entsprechend seitenkettengeschütztes Derivat (Fmoc-Asp-*Ot*Bu) durchgeführt. Da peracetylierte, an Position 1 aminierte, Saccharide eine geringere Nucleophilie aufweisen als entsprechende nicht acetylierte Verbindungen wurde auf eine Schützung des 2-Acetamido-1,2-didesoxy-D-glucosylamins verzichtet.

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass eine Umsetzung mit 0.9 Äquivalenten Fmoc-Asp-*Ot*Bu im Verhältnis zum eingesetzten 2-Acetamido-1,2-didesoxy-D-glycosylamin die besten Ausbeuteergebnisse bei minimalen Nebenreaktionen erzielt.¹⁵⁴ Für die Synthese des Glycosylbausteins **2** wurde 2-Acetamido-1,2-didesoxy-D-glycosylamin **1** mit Fmoc-Asp-*Ot*Bu in Anwesenheit des Aktivators TBTU und der Base DIPEA in DMF umgesetzt. Die Reaktionszeit betrug bei einer Temperatur von -15 °C acht Stunden. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die freien Hydroxylgruppen am Saccharidanteil des Glycosylbausteins **2** mittels Zugabe von Essigsäureanhydrid in Pyridin (Verhältnis 2:1) acetyliert. Das

Lösungsmittel wurde destillativ im Ölpumpenvakuum entfernt und das Rohprodukt erhalten. Die Schützung der freien Hydroxylgruppen des Saccharids unterbindet unerwünschte Nebenreaktionen während des späteren Einbaus des *N*-Glycosylbausteins in eine wachsende Peptidkette.

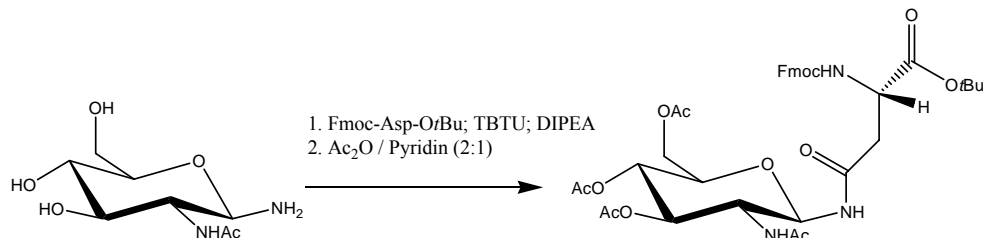


Abbildung 4-3: Umsetzung von 2-Acetamido-1,2-dideoxy-D-glycosylamin 1 zum *N*-Glycosylbaustein 2.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hilfe einer Mitteldruckanlage. Diese Methode gewährleistet eine schnellere Aufreinigung des Rohproduktes im Vergleich zur Aufreinigung mittels HPLC. Die Gesamtausbeute der Darstellung des *N*-Glycosylbausteins 2 betrug 75 %. Die Identifizierung des Produktes (MW = 739.77 g/mol) erfolgte mittels ESI-MS anhand eines Massenpeaks bei $[M+Na]^+ = 763.29$ m/z. Die eindeutige Charakterisierung wurde mittels ¹H-NMR vorgenommen.

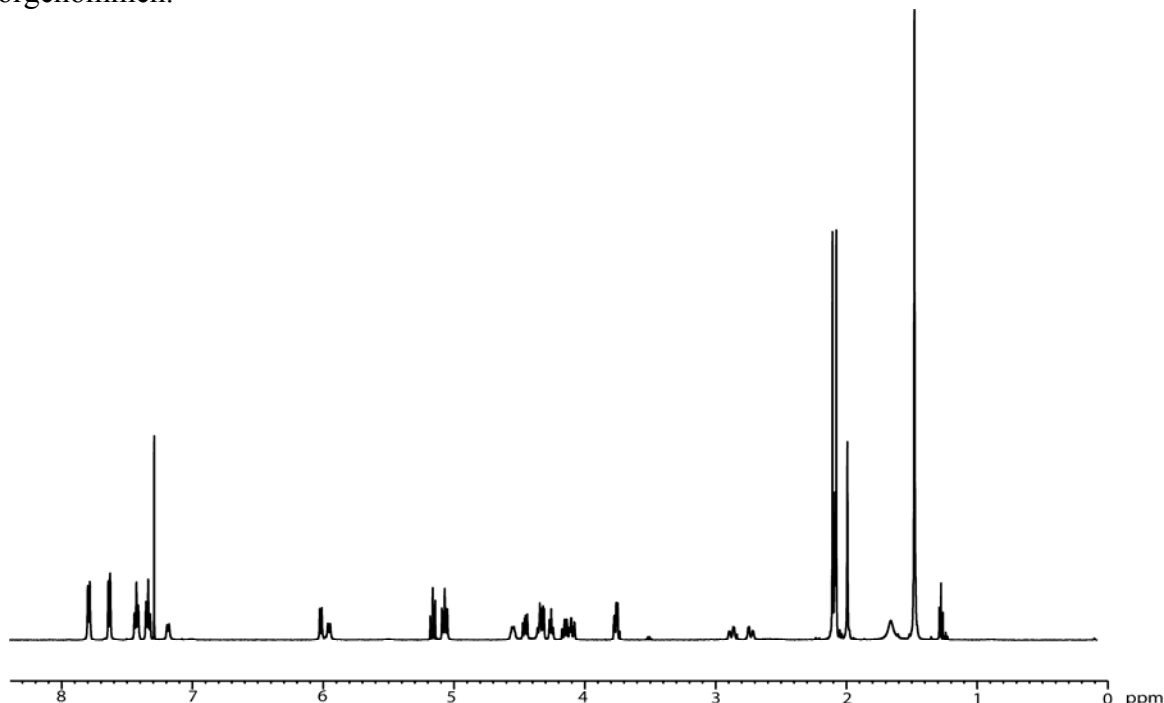


Abbildung 4-4: ¹H-NMR Spektrum des dargestellten *N*-Glycosylbausteins 2. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in CDCl₃.

Die *t*Bu-Schutzgruppe an der Carboxylfunktion der Aminosäure wurde durch neunzigminütige Umsetzung mit einem Gemisch aus TFA/Wasser (Verhältnis 19:1) quantitativ entfernt. Diese Methode hat den Vorteil einer leichten destillativen Entfernung der eingesetzten Reagenzien und des abgespaltenen Isobutens im Ölpumpenvakuum. Nach diesem Schritt war daher keine weitere Aufreinigung erforderlich.

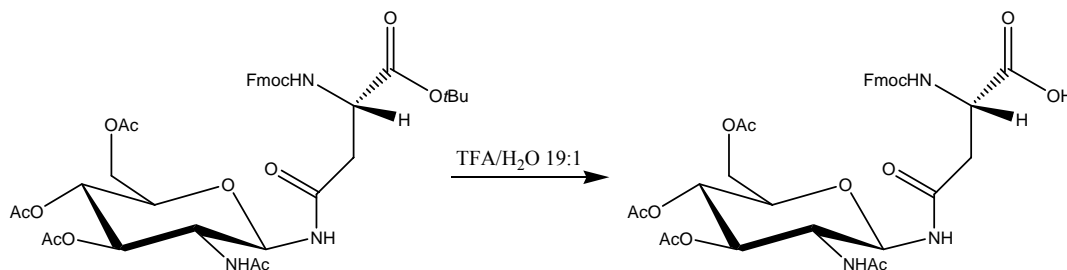


Abbildung 4-5: Abspaltung der *t*Bu-Schutzgruppe durch Einwirkung von TFA/Wasser (Verhältnis 19:1).

Die erfolgreiche Darstellung des *N*-Glycosylbausteins **2** wurde gemäß früherer Arbeiten durchgeführt und konnte nicht weiter optimiert werden.¹⁵⁴ Alternativ zu dem oben dargestellten Syntheseweg wurden in parallel durchgeführten Synthesen verschiedene kleinere Modifikationen an den eingesetzten Substanzmengen und den Reaktionsbedingungen vorgenommen. Alle Modifikationen resultierten in einer schlechteren Gesamtausbeute der Bausteindarstellung von nur 60 %. Dies bedeutete eine bis zu 15 % schlechtere Ausbeute des *N*-Glycosylbausteindarstellung mit kleinen *N*-Glycanen. Da die vorgenommenen Modifikationen keinen positiven Effekt hatten, wird in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen.

4.2 Enzymatische Synthese von komplex Typ Oligosacchariden

Die enzymatische Gewinnung hochverzweigter Oligosaccharide wurde in den vergangenen Jahren mehrfach in der Literatur beschrieben.^{62;158;159} Die Isolierung dieser Oligosaccharide aus Glycoproteinen mit Hilfe enzymatischer Methoden hat gegenüber den klassischen chemischen Methoden zahlreiche Vorteile. Der Hauptvorteil liegt in der hohen stereochemischen Spezifität der Produkte enzymatischer Isolierungen bei kaum anfallenden Nebenprodukten, die gegebenenfalls leicht abgetrennt werden können. Ein erheblicher Nachteil der klassischen Synthese von Oligosacchariden ist die Anzahl der möglichen unerwünschten Nebenprodukte. Diese steigen bei abnehmender Gesamtreaktionsausbeute exponentiell an. Die Aufreinigung der stereochemisch erwünschten Produkte und die Isolierung des Reaktionsproduktes ist daher in klassischen Synthesen sowohl ein zeitliches als auch ein Aufreinigungsproblem. Zusätzlich kann das gewünschte Produkt meist nur in geringen Mengen erhalten werden. Die Vorteile der enzymatisch katalysierten Umsetzungen

liegen in den meist erheblich höheren Ausbeuten der leichten Zugänglichkeit von aufwendigen chemischen Bindungen, wie beispielsweise der 1,3-1,6- α -mannosidischen Bindung in Oligosacchariden des komplexen Typs (Abbildung 1-9) und der guten Reproduzierbarkeit.

Die Nachteile enzymatischer Isolierungen liegen in den Kosten für rekombinant exprimierte Enzyme und ihre sehr hohe Substratspezifität. Enzyme wirken naturgemäß außerordentlich regio- und substratspezifisch, so dass jedes Enzym zunächst auf seinen praktischen Nutzen in einer Synthese hin untersucht und optimiert werden muss. Entstehende Neben- und Abbauprodukte oder beteiligte Reagenzien dürfen das Enzym nicht irreversibel blockieren oder gar denaturieren.

Ein weiterer Punkt ist die Zugänglichkeit der einzusetzenden Enzyme, da nicht alle Enzyme rekombinant exprimiert werden können. Extrahierte Enzyme haben den Nachteil häufig in geringen Mengen Proteasen zu enthalten, die im ungünstigsten Fall das umzusetzende Substrat unkontrolliert abbauen. Vor dem Einsatz eines extrahierten Enzyms ist daher unbedingt dessen Reinheitsgrad zu untersuchen, z.B. mit massenspektrometrischen Methoden. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist die Struktur des umzusetzenden Substrats bzw. des Ausgangsproteins. Das einzusetzende Glycoprotein sollte dabei Faktoren wie eine einheitliche Glycosylierung bei gleichzeitig hohem Glycosylierungsgrad erfüllen und kommerziell leicht erhältlich sein. Das Substrat sollte in einer hohen Reinheit zur Verfügung stehen und gegebenenfalls keine für das Enzym schädlichen Abbauprodukte produzieren können. Die anfallenden Abbauprodukte sollten, falls möglich, den pH-Wert der Reaktionslösung nicht zu stark beeinflussen, da Enzyme nur in einem schmalen pH-Bereich ihre optimale Umsetzungsleistung erzielen können.

Aufgrund der oben genannten Aspekte wurde Fibrinogen als Substrat ausgewählt. Fibrinogen ist ein zentrales Protein in der Blutgerinnungskaskade und liegt im Blutplasma aller höheren Säugetiere vor. Die jeweiligen Fibrinogentypen unterscheiden sich dabei primär durch ihr individuelles Glycosylierungsmuster und die Aminosäuresequenz ihrer Untereinheiten.¹⁶⁰ Rinderfibrinogen wurde als besonders geeignetes Substrat für die enzymatische Gewinnung von komplex-Typ Oligosacchariden ausgewählt.¹⁶¹ Es ist ein 340 kDa großes, im Blutplasma von Rindern vorliegendes, symmetrisch aufgebautes Glycoprotein. Rinderfibrinogen ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die durch 29 Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die beiden verbundenen Untereinheiten sind aus drei unterschiedlichen Peptidketten aufgebaut: der A α -Kette (610 Aminosäuren; MW = 63 kDa), der B β -Kette (461 Aminosäuren; MW = 56 kDa) und der γ -Kette (409 Aminosäuren, MW = 47 kDa). Rinderfibrinogen beinhaltet acht N-Typ Glycosylierungsstellen in den B β - und γ -Ketten und weist dabei ein sehr einheitliches Glycosylierungsmuster auf. Die N-Glycosylstrukturen gehören ausnahmslos der Klasse des komplexen Typs an und unterscheiden sich lediglich in der Abwesenheit einer oder beider terminaler N-Acetylneuraminsäurereste an den antennären Verzweigungen (Abbildung 1-9).^{162;163}

Um die *N*-Glycane isolieren zu können ist es zunächst notwendig, das native Glycoprotein unter Spaltung der stabilisierenden Disulfidbrücken zu denaturieren. Durch die Denaturierung des Glycoproteins wird die Zugänglichkeit des Substrates für die eingesetzten Enzyme erheblich erhöht und so die Spaltung der nativen Bindung zwischen *N*-Glycan und Protein erst ermöglicht. Die aufgespalteten Disulfidbrücken müssen an einer Neuausbildung der Bindung gehindert werden, weshalb man die betreffenden Schwefelatome der beteiligten Cysteine irreversibel methyliert. Nach einem Trypsin-Verdau des denaturierten Proteins, der es in Peptid- und Glycofragmente von 800 bis 1500 Da zerteilt, ist eine enzymatische Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung des Oligosaccharids möglich. Eine Reaktionsverfolgung bzw. die Kontrolle des Grades der enzymatischen Umsetzung ist jederzeit leicht mittels massenspektrometrischer Methoden, wie MALDI-TOF-MS oder LC-ESI-MS möglich.

Die enzymatische Isolierung des gewünschten *N*-Typ-Oligosaccharids wurde ausgehend von Rinderfibrinogen (*fraction 1*) vorgenommen. Außer den oben angegebenen Argumenten für diese Wahl weist Rinderfibrinogen ein weiteres Charakteristikum auf. Die *N*-Typ-Glycosylstruktur in Rinderfibrinogen trägt an Position 1 keine 6-L-Desoxygalactopyranose (L-Fucose), die in vorangegangenen Arbeiten wiederholt zu Schwierigkeiten bei der Synthese von *N*-Glycosylbausteinen geführt hatte.

Das eingesetzte Rinderfibrinogen wurde zunächst mit dem Detergenz Guanidiniumhydrochlorid denaturiert. Guanidiniumhydrochlorid gehört zur Klasse der chaotropen Verbindungen, die Wasserstoffbrücken-, Van-der-Waals- und Ionenbindungen brechen können. Sie vermindern den hydrophoben Effekt und wirken damit denaturierend auf Proteine, da die treibende Kraft der Proteinfaltung die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren im Wasser ist. Es führt zu einer irreversiblen Denaturierung des eingesetzten Substrats und ermöglicht so eine bessere Anlagerungsmöglichkeit für die eingesetzten Enzyme.

Nach völliger Denaturierung des eingesetzten Fibrinogens wurde eine Umsetzung mit D/L-Dithiothreitol durchgeführt, um die vorhandenen 29 intramolekularen Disulfidbrücken zu spalten. D/L-Dithiothreitol hat zusätzlich eine stabilisierende Wirkung auf das gelöste Fibrinogen, indem es die (Rück-) Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken verhindert. Eine oxidative Rückbildung einzelner Disulfidbrücken oder aber eine intermolekulare Polymerisation kann so vermieden werden. Um eine erneute Bildung von Disulfidbrücken endgültig zu unterbinden wurde Iodacetamid zur Reaktionslösung gegeben, wodurch die Sulfhydryl-Gruppen der enthaltenen Cysteine carbamidomethyliert wurden. Dies verhindert wirksam die Rückbildung der Disulfidbrücken. Für die folgenden enzymatischen Umsetzungen mussten zunächst die vorhandenen Reagenzien entfernt werden. Insbesondere das zugegebene D/L-Dithiothreitol könnte sonst eine Denaturierung des einzusetzenden Enzyms im nachfolgenden Schritt nach sich ziehen. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe eines Dialyseschlauches (*cut off* 10 kDa) unter fließendem bidestilliertem Wasser durchgeführt. Das Prinzip der Dialyse beruht auf dem Konzentrationsausgleich, so dass die eingesetzten

Chemikalien nach einem Dialysezeitraum von 72 h vom denaturierten Glycoprotein abgetrennt worden waren. Durch den Konzentrationsausgleich fiel das gelöste denaturierte Fibrinogen im Dialyseschlauch aus. Um unnötige Verdünnungen zu vermeiden wurde das Zwischenprodukt aus dem Dialyseschlauch entfernt und zunächst gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in TRIS-Puffer aufgenommen und erneut Guanidiniumhydrochlorid zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 7.6 eingestellt. Anschließend wurden 150 mg Trypsin zugegeben und bei 37 °C für 72 h inkubiert. Trypsin ist ein zur Klasse der Serin-Proteinasen gehörendes Verdauungsenzym, das zu den exo-Proteasen zählt. Es spaltet Proteine vom carboxyterminalen Ende ausgehend an seinen positiv geladenen Aminosäuren L-Lysin und L-Arginin. Durch den enzymatischen Verdau des denaturierten Glycoproteins durch Trypsin wurden Peptid- und Glycopeptidfragmente mit einer mittleren Größe von 1800 Da erhalten. Es lagen jetzt ausreichend kleine Peptid- und Glycopeptidfragmente vor, um dem im nachfolgenden Schritt zugegebenen Enzym optimale Zugänglichkeit zum Substrates zu gewährleisten. Um Verunreinigungen abzutrennen wurde die Lösung nach dem Trypsin-Verdau dialysiert (*cut off* 1 kDa) und die erhaltene Lösung gefriergetrocknet.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in Ammoniumacetatpuffer aufgenommen und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um eventuell in Lösung vorhandene biologische Verunreinigungen und Reste von enthaltenem Trypsin zu denaturieren. Die Abspaltung der Oligosaccharide von den Glycopeptidfragmenten erfolgte mittels Zugabe des Enzyms PNGaseF (*N*-Glycosidase F, rekombinant aus *E. coli*). PNGase F besitzt eine Masse von 36 kDa und weist eine Spezifität von $1.8 \cdot 10^6$ units/mg auf. Das Enzym gehört zur Klasse der Amidasen und spaltet die *N*-glycosidische Bindung zwischen der Seitenkette eines Asparaginrestes und einem *N*-Glycan. Dabei vermag es fast alle Arten von *N*-Typ Glycosylstrukturen von einem Glycoprotein abzuspalten und ist nicht auf den komplexen Typ beschränkt. Die Abspaltung der *N*-Glycane erfolgte unter strenger Kontrolle des pH-Wertes der Inkubationslösung. PNGase F vermag nur in einem schmalen pH-Bereich optimale Ergebnisse zu erzielen.

Da PNGase F einen hohen Kostenfaktor in der Isolierung des gewünschten *N*-Glycans darstellte, wurde das Enzym nach der durchgeführten Umsetzung mittels Ultrafiltration (*cut off*: 10 kDa) zurückgewonnen und für spätere Synthesen bei -20° C aufbewahrt. Die nachfolgend durchgeführten Umsetzungen mit zurückgewonnener PNGase F zeigten eine Abnahme der Enzymaktivität von bis zu 40 % gegenüber frisch eingesetztem Enzym. Das optimalste Ergebnis konnte durch eine Mischung aus zurückgewonnenem und frischem Enzym erreicht werden. Diese Mischung sollte aus 50 % zurückgewonnenem und 50 % frischem Enzym bestehen, da ein geringerer Anteil von frischer PNGaseF zu unbefriedigenden Umsetzungsergebnissen führt.

Das vom Enzym befreite, ultrafiltrierte Rohprodukt wurde nach Gefriergetrocknung in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung an einer gemischten Ionentauschersäule, um eventuell noch enthaltenes Guanidiniumhydrochlorid und

weitere Verunreinigungen abzutrennen. Nach Gefriertrocknung der produktenthaltenden Fraktionen wurde Verbindung **4** mit einer Ausbeute von 72 % erhalten. Die Ausbeuteberechnung wurde unter der Annahme von einem Prozent Glycosylierungsanteil am eingesetzten Rinderfibrinogen vorgenommen. Die Charakterisierung des erhaltenen Produktes (MW = 2206.79 g/mol) erfolgte mittels MALDI-TOF-MS durch einen Massenpeak von $[M+Na]^+ = 2229.7$ m/z.

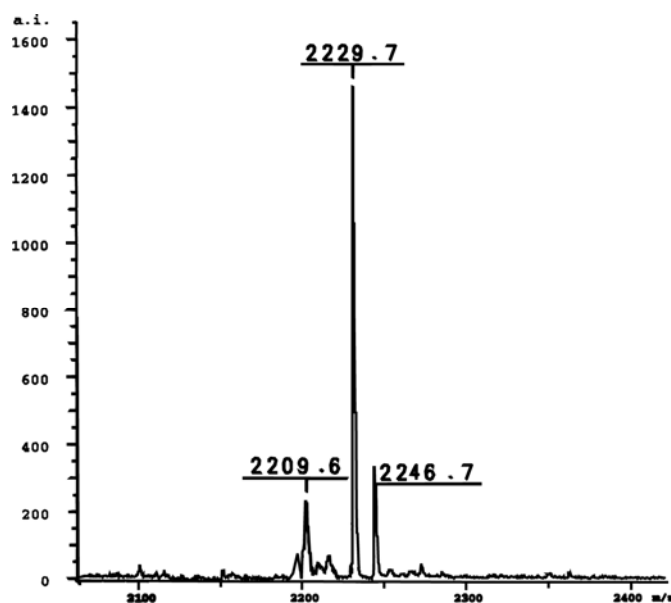


Abbildung 4-6: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **4.**

Auf eine Charakterisierung mittels NMR wurde verzichtet, da das Produkt sofort weiter umgesetzt wurde. Das erhaltene Zwischenprodukt stellt ein häufiges Gerüst von *N*-Glycanen des komplexen Types dar, bei der an beiden antennären Verzweigungen jeweils eine *N*-Acetylneuraminsäure gebunden vorliegt. Da dieses Gerüst jedoch nicht im GP120 des HIV bzw. in dessen dritten variablen Loop vorliegt, wurde auf den Versuch einer Synthese eines entsprechenden *N*-Glycosylbausteins verzichtet.

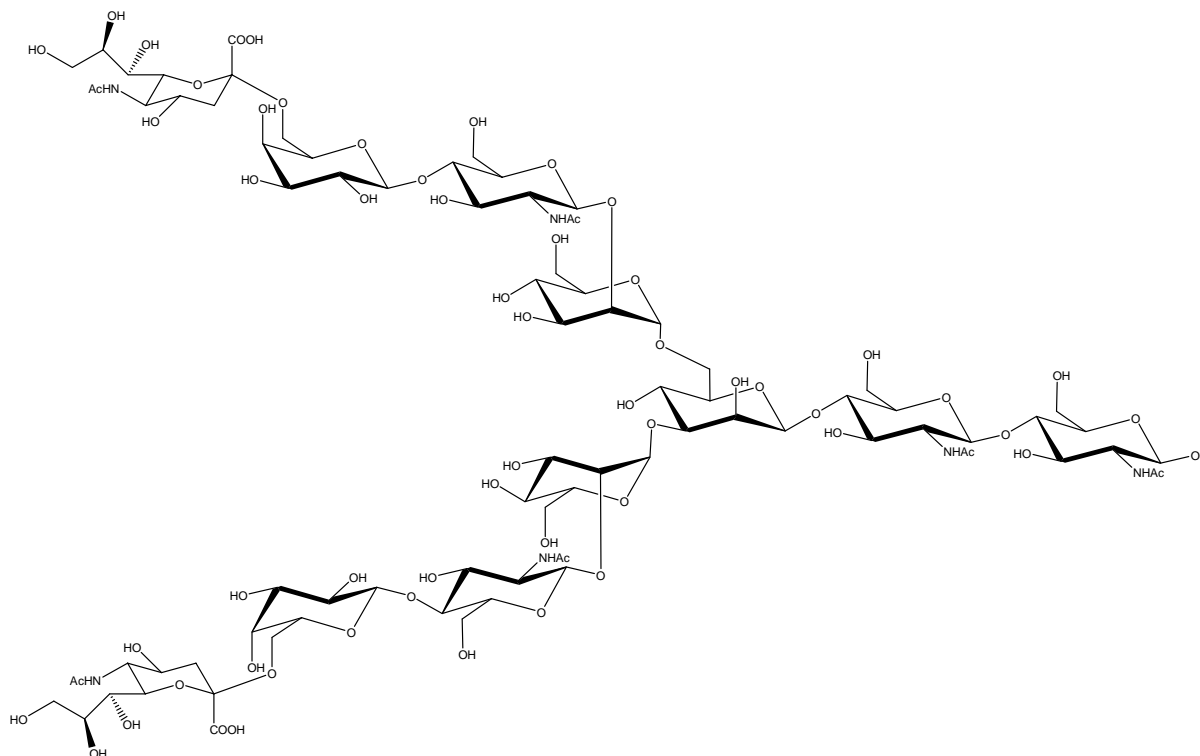


Abbildung 4-7: Struktur des aus Rinderfibrinogen enzymatisch isolierten N-Glycans 4.

Das erhaltene Oligosaccharid 4 wurde sofort mittels des Enzyms Neuraminidase (exo- α -Sialidase) zum gewünschten Nonasaccharid 5 umgesetzt. Da die eingesetzte Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* extrahiert vorlag, wurde zunächst nur ein kleiner Reaktionsansatz umgesetzt, um bei einer Verunreinigung der Probe mit einer Protease nicht das wertvolle Zwischenprodukt 4 zu verlieren. Neuraminidase hydrolysiert α -(2-3)-, α -(2-6)- und α -(2-8)-glycosidische Bindungen von terminalen Neuraminsäureresten in Oligosacchariden, Glycoproteinen, Glycolipiden und synthetischen Substraten.

Die Umsetzung des Ausgangssubstrates 4 zum gewünschten Oligosaccharid 5 wurde in stark verdünnter Essigsäure bei einem pH-Wert von 5.0 über einen Zeitraum von 72 Stunden vorgenommen. Der enzymatische Verdau des Substrates wurde unter genauer Einhaltung des pH-Wertes durchgeführt und mittels MALDI-TOF verfolgt, da durch die entstehenden Abbauprodukte Veränderungen im pH-Wert auftraten, die eine optimale Wirkungsweise des Enzyms hätten verhindern können. Der pH-Wert veränderte sich innerhalb von 8 Stunden von pH 5.0 nach pH 6.0 und musste daher im Laufe der Inkubationszeit mehrfach mittels Zugabe von verdünnter Essigsäure korrekt eingestellt werden.

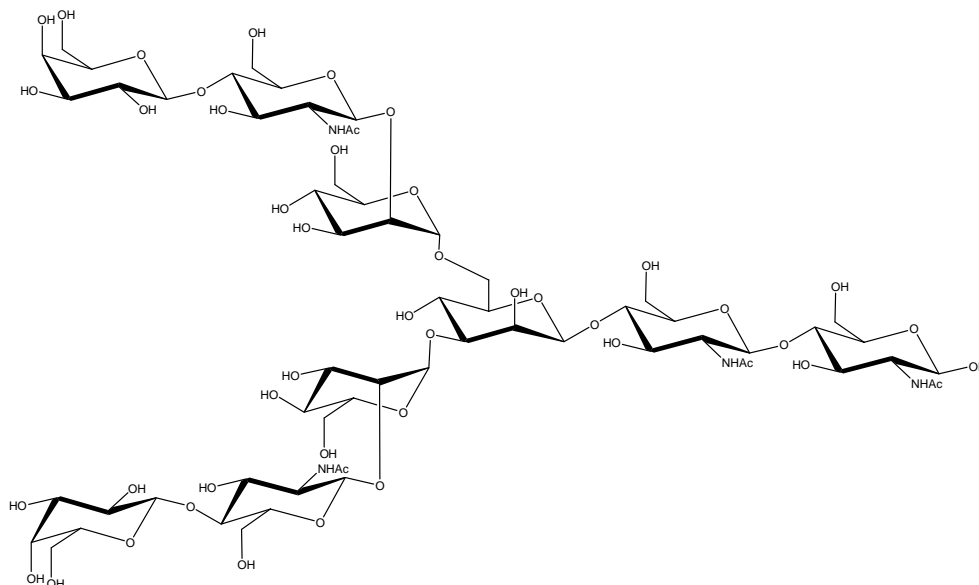


Abbildung 4-8: Struktur des aus Verbindung **4** enzymatisch gespaltenen und isolierten N-Glycans **5**.

Nach 72-stündiger Umsetzung konnte mittels MALDI-TOF-MS kein Edukt **4** mehr detektiert werden. Das Rohprodukt wurde ultrafiltriert (*cut off* 5000 Da) und das Filtrat gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in bidestilliertem Wasser aufgenommen und säulenchromatographisch an Biogel P-2 aufgereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF-MS und ESI-MS identifiziert, vereinigt und gefriergetrocknet. Die Detektion mittels ESI-MS eignete sich gut für die Bestimmung der Reinheit der Probe, da es eventuell vorhandene niedermolekulare Verureinigungen aufgezeigt hätte. Die Messung mittels ESI-MS ergab einen Massenpeak von $[M]^+ = 1641.65$ m/z und die Messung mittels MALDI-TOF-MS einen Massenpeak von $[M+Na]^+ = 1663.73$ m/z. Sowohl die Identifizierung als auch die Reinheitsbestimmung des Nonasaccharids **5** wurden zweifach durchgeführt, da die nachfolgenden Synthesen von diesem Oligosaccharid des komplexen Types ausgehen sollten. Die eindeutige Charakterisierung erfolgte mittels ein- und zweidimensionaler NMR-spektroskopischer Methoden.

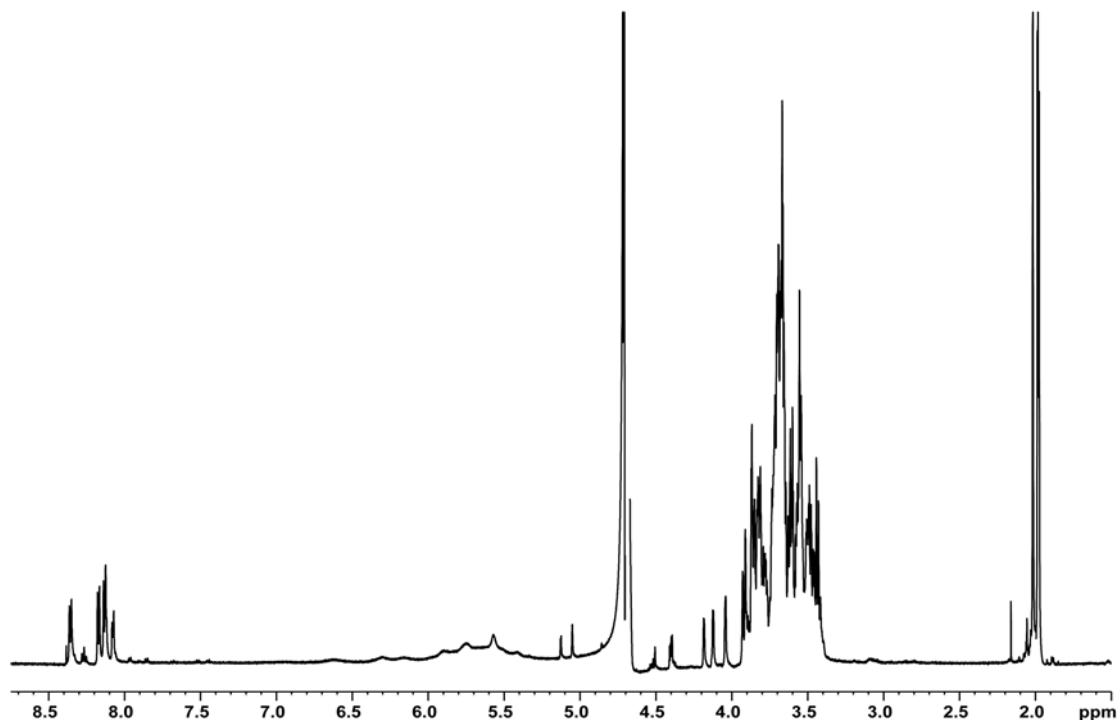


Abbildung 4-9: ^1H -NMR Spektrum des Nonasaccharids 5. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

Abbildung 4-9 zeigt das ^1H -NMR Spektrum des enzymatisch isolierten Nonasaccharids 5. Im Bereich zwischen 5.3 und 6.3 ppm sind noch leichte Verunreinigungen zu erkennen, die nicht abgetrennt oder identifiziert werden konnten. Eine Identifikation aller einzelnen Protonen war trotz der guten Qualität des Spektrums und herangezogener zweidimensionaler NMR-Spektren nicht möglich. Die eindeutige Identifizierung des Nonasaccharids 5 erfolgte anhand der anomeren Protonen im Bereich zwischen 4.0 und 5.2 ppm. Die Identifizierung erfolgte anhand des *Structural Reporter Group Concept* und den resultierenden charakteristischen *Structural Reporter Group Regions* für das Nonasaccharid 5. Dabei handelt es sich um ein von *Vliegenthart* entwickeltes Konzept, dass auf den charakteristischen individuellen ^1H -NMR Verschiebungen saccharidischer Protonen basiert. Hierbei sind die chemischen Verschiebungen der saccharidischen Protonen sowie die resultierenden Kopplungskonstanten und Linienbreiten im ^1H -NMR Spektrum charakteristische Parameter. Diese Parameter sind insbesondere charakteristisch für den Aufbau eines Polysaccharids und das Substitutionsmuster der einzelnen Saccharidbausteine.^{161;164;165}

Zusätzlich wurde eine Charakterisierung mit Hilfe der amidischen Protonen anhand ihrer Spin-Systeme im TOCSY-Spektrum (Abbildung 4-11) vorgenommen. Die anomeren Protonen am C1 der jeweiligen Sacchariduntereinheit sind gut zu erkennen und gut dispergiert. Abbildung 4-10 zeigt eine Vergrößerung des betreffenden Ausschnitts. Besonders charakteristisch sind die anomeren mannosidischen Protonen bei 5.05 und 4.87 ppm.

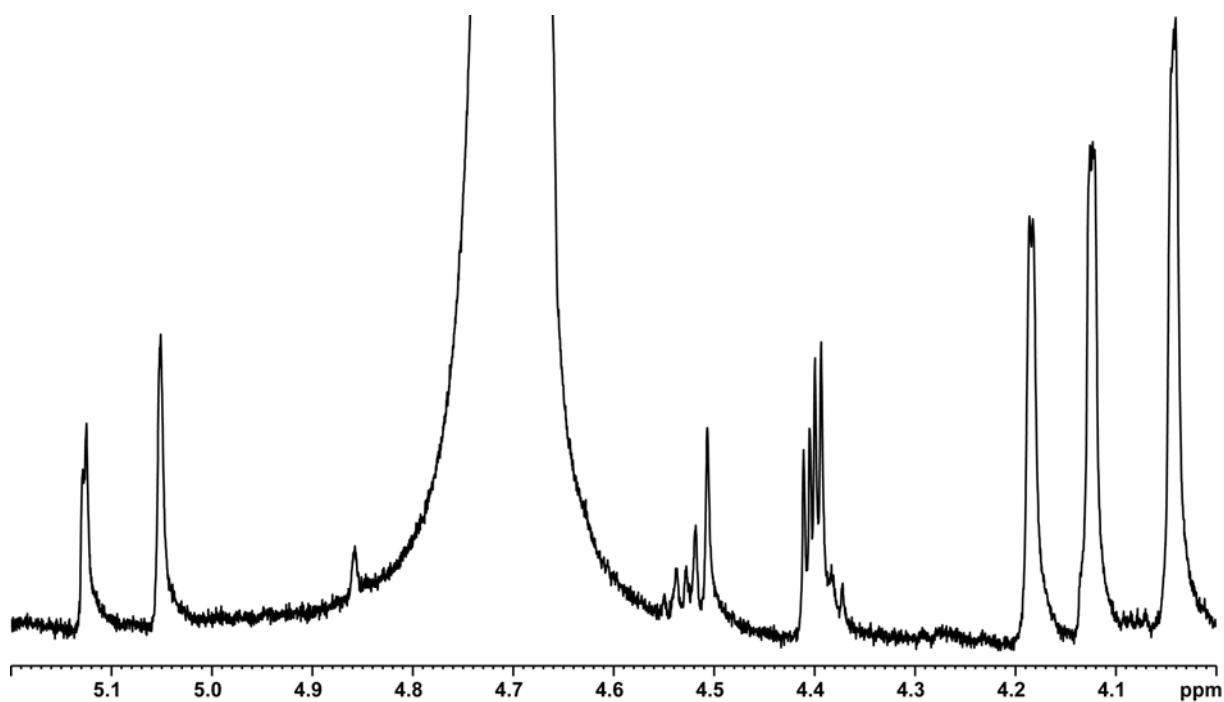


Abbildung 4-10: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums des Nonasaccharids 5. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

Abbildung 4-11 auf der nachfolgenden Seite zeigt den betreffenden Ausschnitt der anomeren Protonen im TOCSY-Spektrum des Nonasaccharids 5.

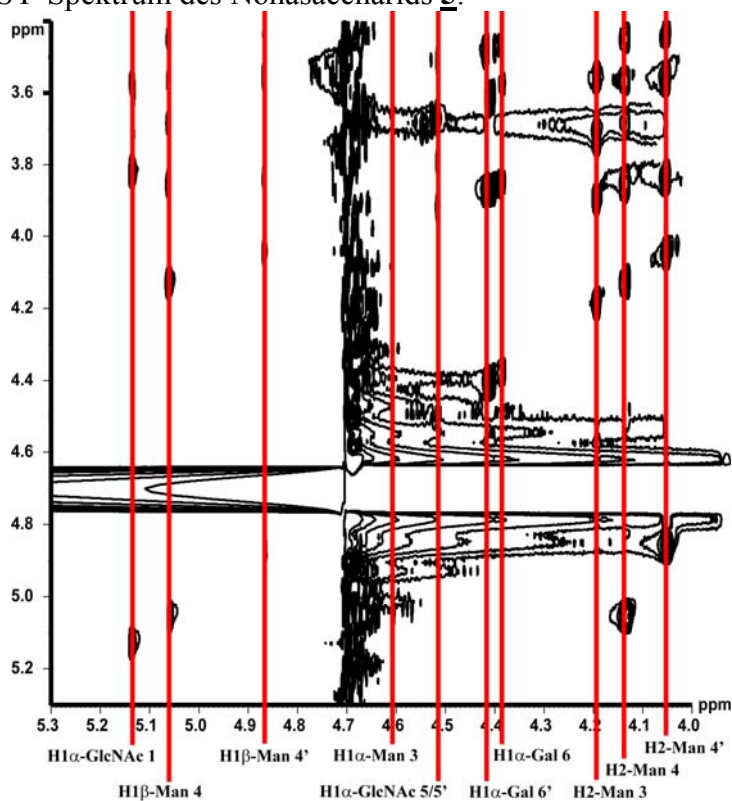


Abbildung 4-11: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums von Verbindung 5. Die Aufnahme des TOCSY-Spektrums erfolgte in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ im Verhältnis 9:1, bei 300 K.

Die folgende Abbildung 4-12 zeigt den NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des Nonasaccharids **5**. Die einzelnen Spuren der NH-Spinsysteme sind gut dispergiert und eindeutig zuzuordnen. Die Zuordnung der einzelnen Protonen erfolgte mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten (HMBC, HSQC, DQF-COSY). Die Zuordnung der Spinsysteme der amidischen Protonen wurde vorgenommen, um die erhaltenen Daten auf die später folgenden Charakterisierungen von Glycopeptiden übertragen zu können.

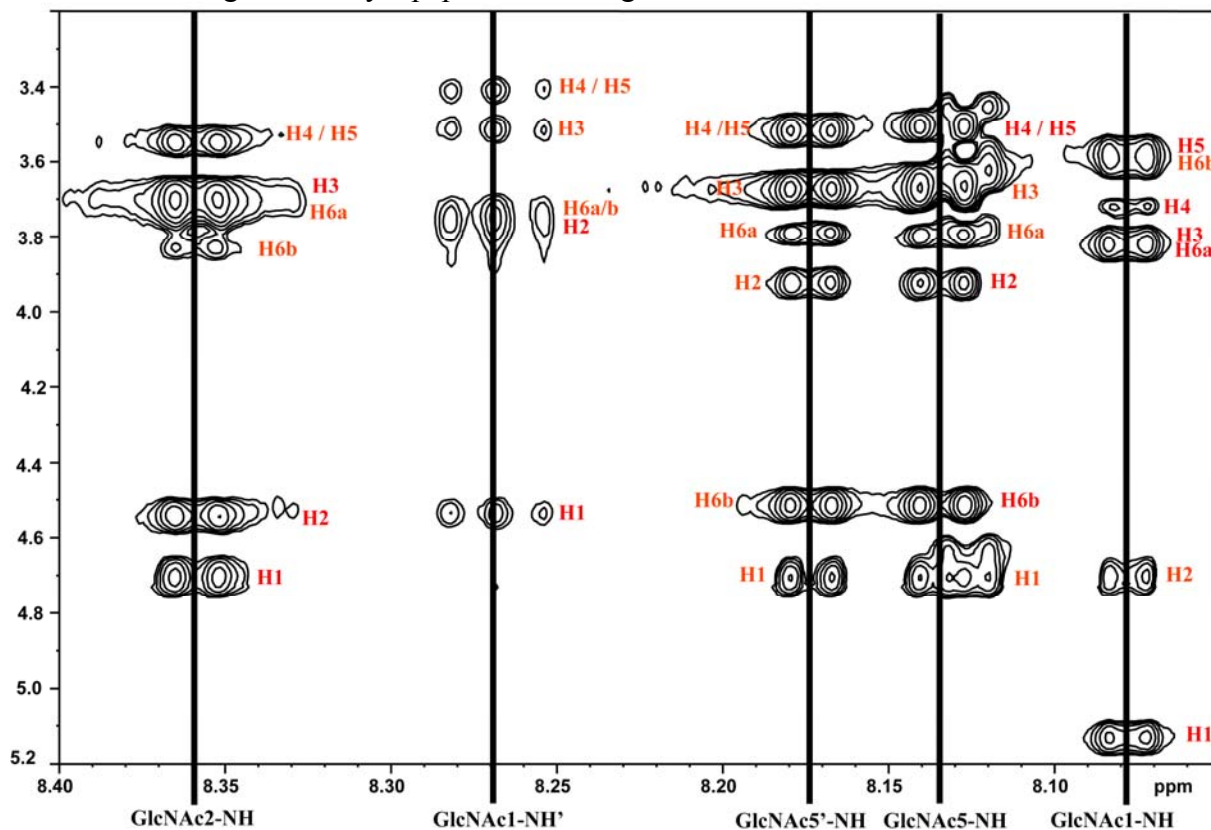


Abbildung 4-12: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums von Verbindung **5**. Die Aufnahme des TOCSY-Spektrums erfolgte in H_2O/D_2O im Verhältnis 9:1, bei 300 K.

Die Isolierung des Nonasaccharids **5** konnte mit einer Ausbeute von 68 % über den gesamten Umsetzungsverlauf durchgeführt werden. In späteren Synthesen sollte eine strenge Kontrolle der pH-Werte der spezifischen enzymatischen Umsetzungsschritte erfolgen, da sich die pH-Werte der Inkubationslösungen teilweise stark veränderten. Die beste Aufreinigung konnte säulenchromatographisch am Biopolymer Biogel P-2 erreicht werden. Durchgeführte Aufreinigungen mittels HPLC an einer $RP-NH_2$ Säule führten zu schlechten Aufreinigungsergebnissen.

Da die Schritte der enzymatischen Umsetzung auf jedes Glycoprotein übertragbar sein sollten, könnte eine entsprechende Umsetzung mit einem höher glycosyliertes Protein bessere Ausbeuten erzielen. Auf dem dargelegten Wege sollten auch weitere (hoch)verzweigte Glycosylstrukturen zugänglich sein. Gerade in Hinblick auf die *core*-Typen der *N*-Typ-

Glycosylierungen (Abbildung 1-9) können sich dadurch neue interessante Zielverbindungen ergeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die enzymatische Zugänglichkeit von weiteren Oligosacchariden ausgehend vom isolierten Nonasaccharid 5 überprüft. Die zugrunde liegende Idee war dabei das isolierte Produkt 5 durch enzymatische Umsetzungen Schritt für Schritt gezielt zu verkürzen. Von besonderem Interesse war in diesem Kontext eine mögliche Zugänglichkeit der ursprünglichen *core*-Struktur aller *N*-Typ Glycoproteine. Die *core*-Struktur ist aus fünf Sacchariduntereinheiten aufgebaut und entspricht dabei in Untereinheiten, Bindung und räumliche Orientierung Verbindung 5 (Abbildung 1-9). Im Rahmen der antennären Verkürzung sollten ausschließlich exo-Glycosidasen zum Einsatz kommen, die nur terminale Glycosyluntereinheiten abspalten können. Die einzusetzenden Enzyme sollten kommerziell erhältlich und möglichst einfach in ihrer Anwendung sein. Die Planung der enzymatischen Verkürzung sah im ersten Schritt die Abspaltung der terminalen β -glycosidisch gebundenen Galactosereste vor. Das Oligosaccharid 5 wurde mit dem Enzym β -Galactosidase umgesetzt, um die terminalen β -verknüpften Galactosereste von den Enden der antennären Verzweigungen zu entfernen. Der Verlauf und Grad der Umsetzung wurde mittels MALDI-TOF-MS verfolgt. Es zeigte sich, dass das Enzym nicht in Lage war die endständigen Galactosereste quantitativ abzuspalten.

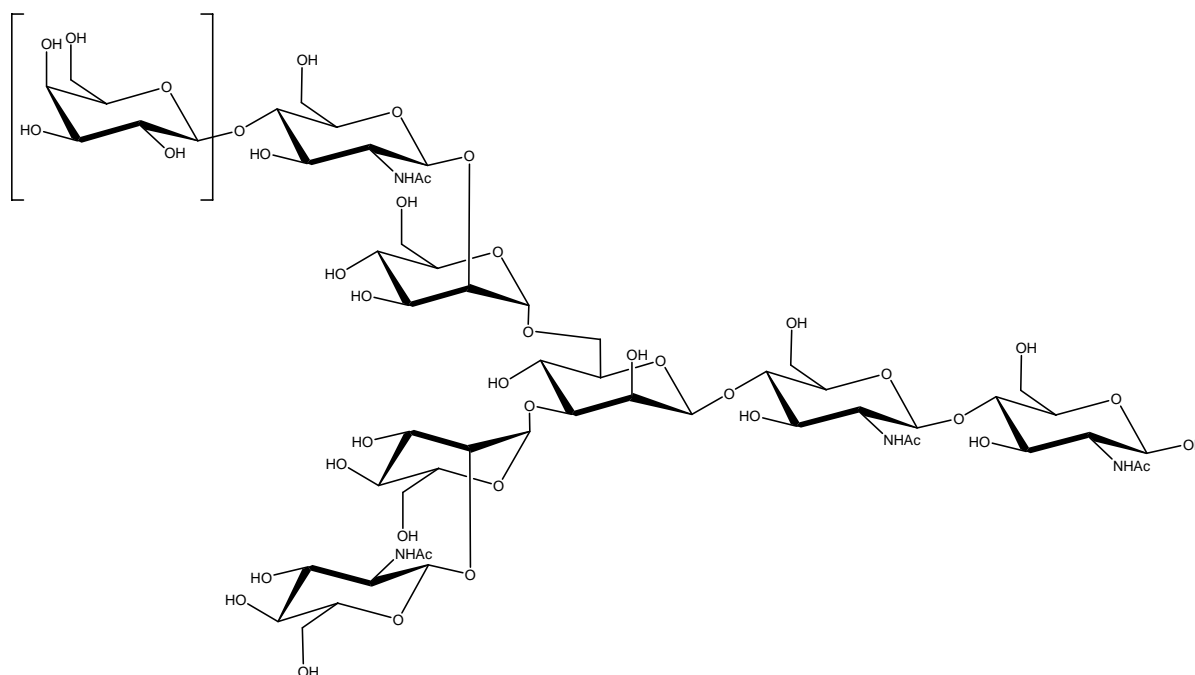


Abbildung 4-13: Struktur des enzymatisch gewonnenen Octasaccharids 20 und des Heptasaccharids 19 (- Gal).

Der pH-Wert der Reaktionslösung veränderte sich während des Reaktionsverlaufes auffällig stark. In den aufgenommenen MALDI-TOF-MS-Spektren konnte ein Produktgemisch der

Oligosaccharide **19** (acht Untereinheiten, ein verbleibender Galactose-Rest) und **20** (sieben Untereinheiten, kein Galactose-Rest) nachgewiesen werden, dass nach 72 stündiger Umsetzung konstant blieb (Abbildung 4.14). Es wird davon ausgegangen, dass die zugegebene β -Galactosidase im Reaktionsverlauf ihre Aktivität verloren hat. Dies wurde vermutlich durch den stark veränderten pH-Wert verursacht, der durch die entstandenen Abbauprodukte hervorgerufen wurde. Nach Ultrafiltration und Gefriertrocknung wurde eine Aufreinigung mittels HPLC an einer *RP-NH₂*-Säule durchgeführt und die beiden Produkte **19** und **20** erhalten.

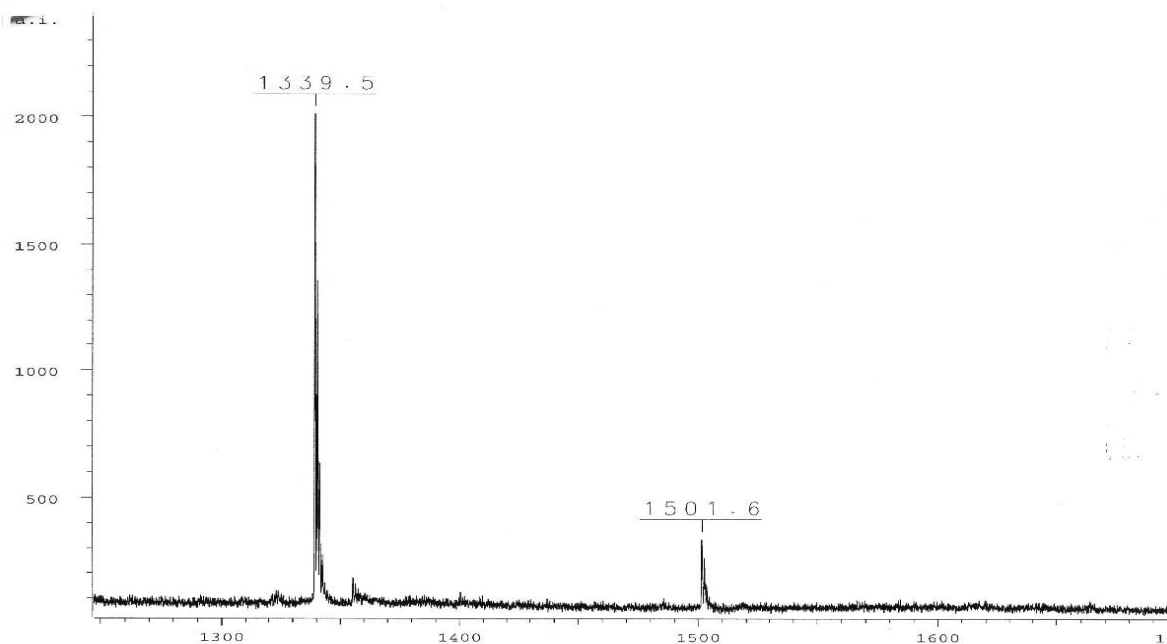


Abbildung 4-14: MALDI-TOF-MS-Spektrum des Produktgemisches der Verbindungen **19 und **20**.**

In der folgenden enzymatischen Umsetzung sollten die beiden terminalen *N*-Acetylglucosaminreste entfernt werden. Da im verbliebenen Substrat vier (terminale) *N*-Acetylglucosaminreste vorlagen, wurde eine spezielle *exo-N*-Acetylglucoaminidase eingesetzt, die nur die gewünschten β -1,2-*N*-glycosidischen Bindungen hydrolysieren sollte. Die eingesetzte *exo-N*-Acetylglucoaminidase stellte eine rekombinant aus *E. Coli* exprimierte Aminidase dar, die nur β -1,2- und β -1,6-*N*-glycosidische Bindungen terminaler *N*-Acetylglucosaminreste hydrolysiert.

Da die eingesetzte *exo-N*-Acetylglucoaminidase einen sehr hohen Kostenfaktor darstellt und die eingesetzten Verbindungen **19** und **20** nur in begrenzten Mengen zur Verfügung standen wurde nur ein kleiner Testansatz durchgeführt. Die Bedingungen dieser Umsetzung wurden sorgfältig gewählt, da die eingesetzte *exo-N*-Acetylglucoaminidase ein sehr empfindliches Enzym darstellt. Die enzymatische Abspaltung der terminalen *N*-Acetylglucosamine erfolgte quantitativ nach einer Inkubationszeit von 48 h. Nach Ablauf dieser Zeit konnte mittels MALDI-TOF-MS kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Nach Aufreinigung mittels HPLC

an einer semipräparativen *RP-NH₂*-Säule wurden 50 % der theoretischen Ausbeute des Produktes **21** erhalten. Vermutlich hat das eingesetzte Enzym teilweise alle *N*-Acetylglucosaminreste abgespalten und so das Substrat komplett hydrolysiert. Das Enzym wurde mittels Ultrafiltration zurückgewonnen und für spätere Synthesen aufbewahrt.

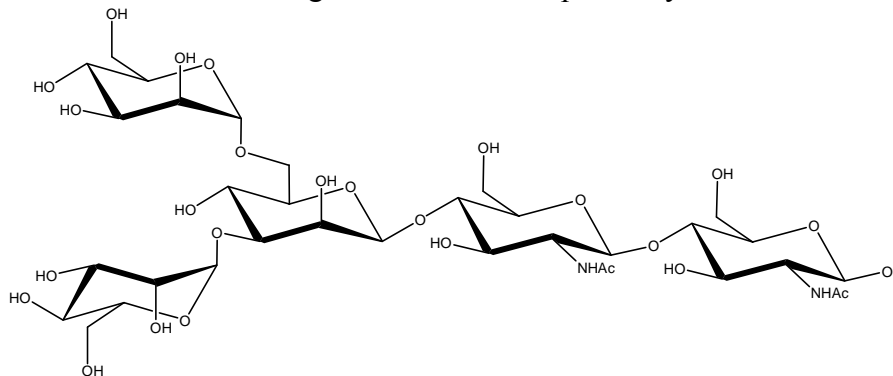


Abbildung 4-15: Struktur des isolierten Pentasaccharids **21**, entsprechend der core-Struktur der *N*-Typ Glycopeptide.

Das Pentasaccharid **21** ist eine interessante Verbindung, da sie die *core*-Struktur aller komplex Typ *N*-Glycoproteine darstellt. Da mit dem Pentasaccharid **21** im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergearbeitet wurde, ist eine spätere Verwendung dieser Verbindung unter Einbau in ein Glycopeptid sicherlich lohnenswert.

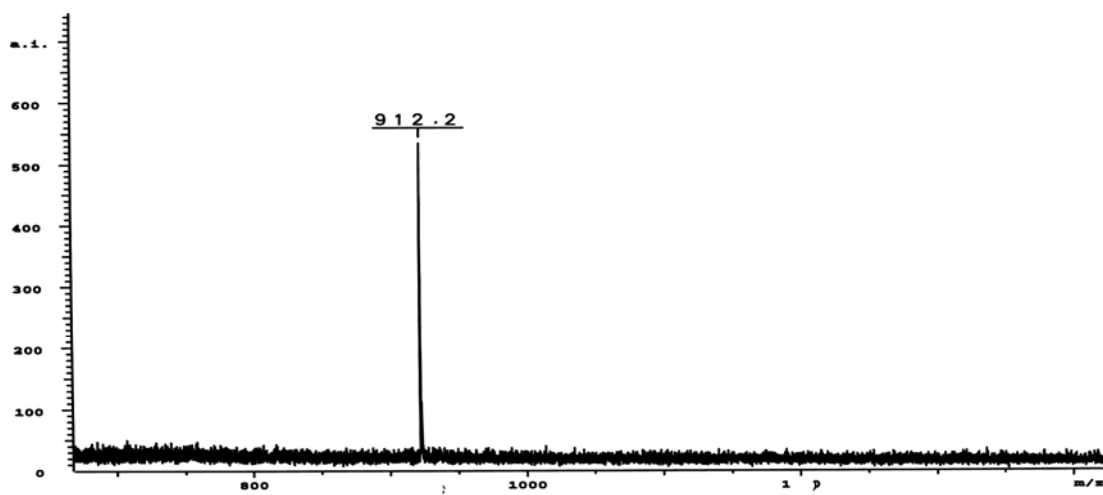


Abbildung 4-16: MALDI-TOF-MS Spektrum des isolierten Pentasaccharids **21**.

4.3 Synthese des $N\gamma$ -[Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc]-tetracosa-acetyl-Asparagin Bausteins 11

Analog zur Darstellung von Verbindung 3 wurde das Nonasaccharid 5 zunächst in das entsprechende Glycosylamin überführt. Die Aminierung erfolgte wie bei Verbindung 1 gemäß Likhoshevskiy *et al.* und kann auf alle Arten von Oligosacchariden angewendet werden.¹⁵⁷

Die zugrundeliegende Methode wurde jedoch leicht modifiziert und die Aminierung bei 55 °C über einen Zeitraum von 120 h unter regelmäßiger Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat quantitativ durchgeführt.^{166;167} Bereits vorher durchgeführte Aminierungen des Nonasaccharids 5 bei 50 °C zeigten einen deutlich längeren Reaktionszeitraum der Substitutionsreaktion von bis zu 200 h. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf über 60 °C führte wiederum zur Zersetzung des Nonasaccharids 5. Vermutlich liegt das Gleichgewicht der Aminierungsreaktion bei 50 °C noch zu weit auf der Seite der Edukte während bei einer Temperatur ab 60 °C die α -mannosidischen Bindungen des Nonasaccharids zerstört werden (Abbildung 4-7). Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Aminierung an Kieselgel (Isopropanol /Ethylacetat/Wasser; 6:1:3) zeigte nach 120 Stunden kein Edukt mehr. Das in Verbindung 5 vorliegende Anomerengemisch des Oligosaccharids konnte dabei quantitativ in das entsprechende β -Glycosylamin 6 überführt werden. Die Detektion mittels MALDI-TOF-MS und ESI-MS zeigte kein Edukt 5 mehr an.

Das Rohprodukt wurde bis zur Gewichtskonstanz mehrfach gefriergetrocknet. Hierbei musste streng auf ein gefrorenes Rohprodukt geachtet werden, da in wässriger Lösung eine Rückreaktion von Verbindung 6 zu 5 erfolgt. Da ein dünnschichtchromatographischer Test des erhaltenen Rückstandes (Isopropanol /Ethylacetat/Wasser; 6:1:3) an Kieselgel auf Verunreinigungen hindeutete, musste das Rohprodukt aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte auf zwei Arten. Eine Aufreinigungsmethode stellte die Aufreinigung mittels HPLC an einer RP-NH₂-Säule bei isokratischem Lösungsmittelverlauf (95 % H₂O) dar, während die zweite Aufreinigung säulenchromatographisch an Biogel P-2 durchgeführt wurde. Beide Methoden lieferten das reine an C-1-Position aminierte Nonasaccharid 6. Es sind jedoch beide Aufreinigungsmethoden mit Nachteilen verknüpft.

Die Aufreinigung des Rohproduktes an Biogel P-2 erzielte eine hohe Reinheit, führte jedoch zur teilweisen Rückreaktion des aminierten Produktes 6 zum Nonasaccharid 5. Da die säulenchromatographische Aufreinigung über Nacht in bidestilliertem Wasser bei Raumtemperatur erfolgte, war bereits von einem Ausbeuteverlust ausgegangen worden. Die Rückreaktion führte zu einem Ausbeuteverlust von bis zu 35 %.

Durch die Aufreinigung mittels HPLC konnte ebenfalls eine hohe Reinheit erzielt werden. Sie musste jedoch bis zu dreimal durchgeführt werden. Durch eine einmalige Aufreinigung konnten nur unbefriedigende Trennergebnisse erzielt werden. Das Produkt enthielt noch zahlreiche niedermolekulare Verunreinigungen, die nur durch ein ¹H-NMR-Spektrum

detektiert werden konnten. Der Vorteil dieser Methode liegt jedoch in einer relativ kurzen Verweildauer des aminierten Produktes bei Raumtemperatur in Wasser. Durch sofortige Gefriertrocknung der produktenthaltenden Fraktionen konnte die Rückreaktion unterdrückt werden. Zukünftige Aufreinigungen verzweigter aminierte Oligosaccharide sollten mittels *RP*-HPLC durchgeführt werden. Auf diese Weise lässt sich ein Ausbeuteverlust minimieren. In der vorliegenden Aufreinigung trat ein Verlust von maximal 5 % des aminierten Nonasaccharids **6** auf. Das aufgereinigte aminierte Nonasaccharid **6** wurde mittels MALDI-TOF-MS und $^1\text{H-NMR}$ eindeutig charakterisiert.

Abbildung 4-17 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des aminierten Nonasaccharids **6**. Im Spektrum ist bereits die Rückbildung zum entsprechenden Nonasaccharid **5** erkennbar, da die Probe in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) vermessen wurde. Durch eine Bestimmung mittels ESI-MS konnte nachgewiesen werden, dass vor Aufnahme des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums nur die aminierte Verbindung **6** vorlag. Nach Aufnahme des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums lagen wiederum die Verbindungen **5** und **6** in einem Verhältnis von 3 % zu 97 % nebeneinander vor.

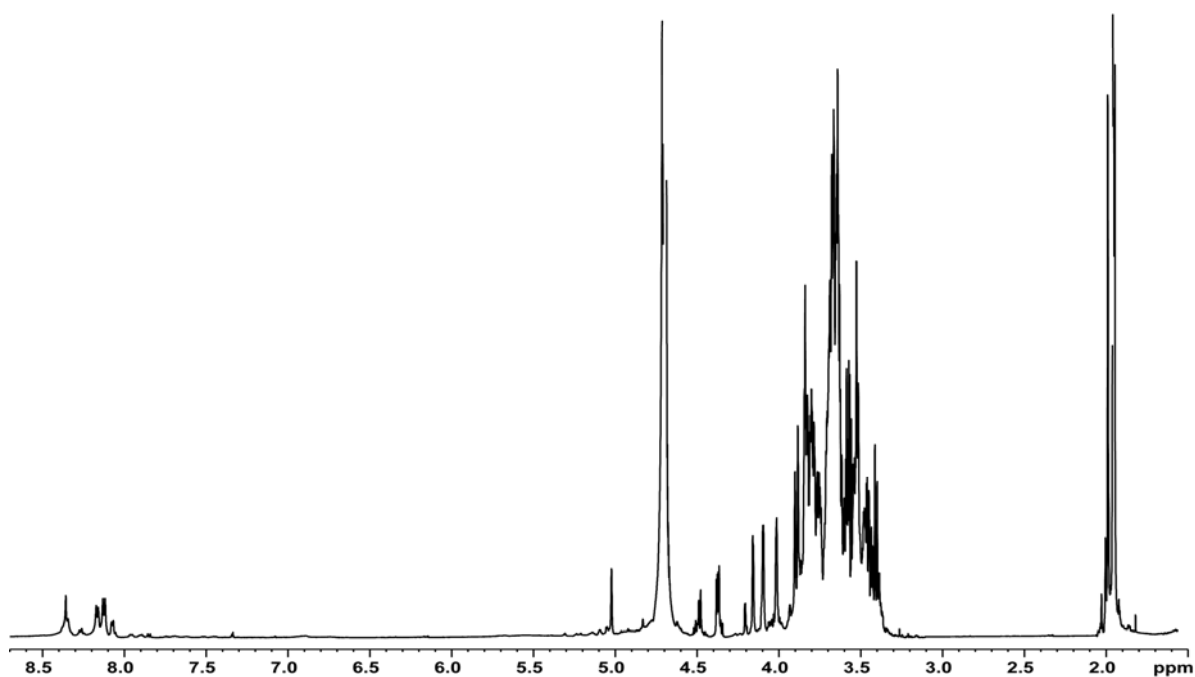


Abbildung 4-17: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des aminierten Nonasacchararids **6**. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1).

Abbildung 4-18 zeigt den vergrößerten Bereich der anomeren Protonen des Nonasaccharids **5** und des aminierten Nonasaccharids **6**. Das Signal für das anomere H_α -Proton an C-1 des Nonasaccharids konnte bei 5.11 ppm identifiziert werden. Im Spektrum des aminierten Nonasaccharids verschiebt sich das Signal auf einen Wert von 4.15 ppm. Diese typisch starke Hochfeldverschiebung ist charakteristisch für das anomere Proton am reduzierenden Ende eine Saccharids nach einer Substitution einer Hydroxyl- durch eine Aminogruppe. Der *shift*

des Signals rührt durch die Veränderung der funktionellen Gruppe am C1 her. Man kann erkennen, dass sich das aminierte Nonasaccharid **6** bereits in der Rückreaktion zum Oligosaccharid **6** befindet.

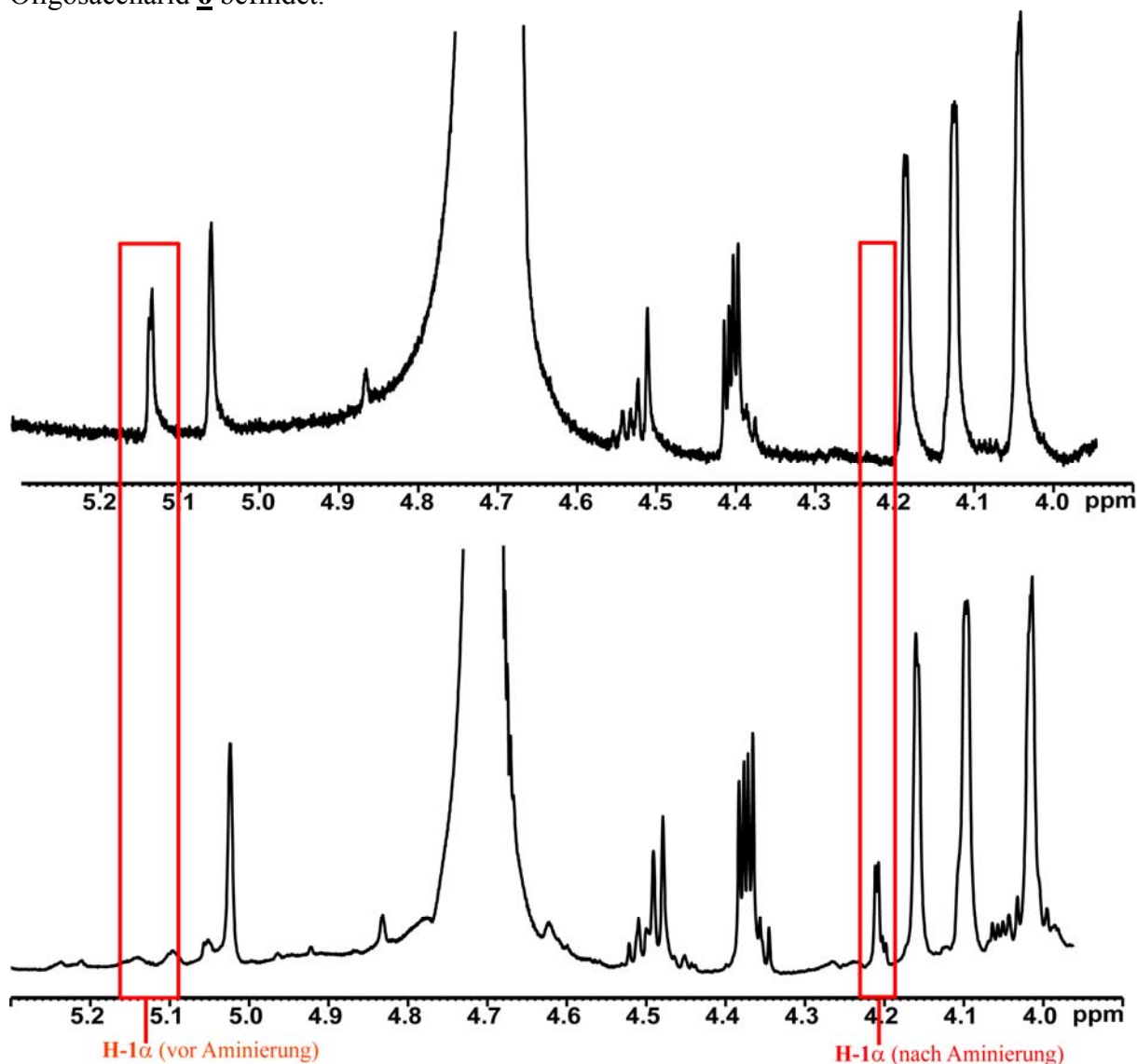


Abbildung 4-18: Bereiche der anomeren Protonen der ¹H-NMR Spektren von Verbindung **5** (obere Abb.) und **6** (untere Abb.). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in H₂O/D₂O (9:1) bei 300 K.

Die Verknüpfung des aminierte Nonasaccharids **6** mit dem seitenkettengeschützten Aminosäurederivat Fmoc-Asp-OtBu zum N-Glycosylbaustein sollte wie unter Abschnitt 4.1 beschrieben durchgeführt werden. Diese Vorgehensweise hatte in Abschnitt 4.1 sowie in vorangegangenen Arbeiten zu guten Reaktionsausbeuten geführt.

Da Verbindung **6** ein wertvolles Edukt darstellte und nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand, wurden zunächst zwei Testreaktionen mit kleinen Substanzmengen durchgeführt. Da mögliche störende Faktoren der Kupplungsreaktion minimiert werden sollten, wurden Vorarbeiten durchgeführt um mögliche Fehlerquellen auszuschließen. Das zu verwendende

Lösungsmittel DMF wurde destillativ absolutiert und auf eventuell vorhandene Wasserspuren sowie freie Amine geprüft. Die Prüfung des Lösungsmittels wurde anhand eines $^1\text{H-NMR}$ Spektrums durchgeführt. Dabei wurde ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des absolutierten DMF aufgenommen und mittels Integration des H_2O Peaks der Wasseranteil im Lösungsmittel bestimmt. Die Integration des Wassersignals zeigte eine Reinheit (Wasserfreiheit) von 99.99 %. Die weiteren zu verwendenden Reagenzien TBTU, DIPEA und Fmoc-Asp-OtBu wurden nach Trocknung ebenfalls auf ihren Wassergehalt untersucht. Dafür wurden jeweils 5 mg (16 μmol) TBTU, 5 mg (11 μmol) Fmoc-Asp-OtBu und 10 μL (8 μmol) DIPEA separat in 500 μL absolutiertem DMF mit bekanntem Wassergehalt aufgenommen. Nach Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ Spektrums wurde der Wasseranteil der gesamten Probe mittels Integration des Wassersignals bestimmt. Der bekannte Wasseranteil des Lösungsmittels wurde von diesem Ergebnis abgezogen. Der Trocknungsgrad betrug bei TBTU 99.8 %, bei Fmoc-Asp-OtBu 99.8 % und bei DIPEA 99.4 %. Bereits geringe Wasserspuren können den Reaktionsverlauf und somit die Ausbeute der Kupplungsreaktion erheblich negativ beeinflussen.

Die Kupplungsreaktion des aminierten Nonasaccharids **6** wurde unter Schutzgasatmosphäre (Argon) durchgeführt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Trotz mehrfacher Durchführung der Kupplungsreaktion konnte keine Umsetzung des aminierten Nonasaccharids **6** mit dem zugegebenen Aminosäurederivat Fmoc-Asp-OtBu zum *N*-Glycosylbaustein beobachtet werden. Auch durch Variation von Kupplungszeiten, Lösungsmitteln und zugegebenen Stoffmengen konnte keine *N*-glycosidische Bindung zwischen Aminosäure und Oligosaccharid geknüpft werden. Als Produkt wurde in allen Umsetzungen entweder das Edukt **6** oder aber das vollständig acetylierte Produkt von Verbindung **6** detektiert. Die dünnschichtchromatographisch detektierten Spots während der Reaktionsverfolgung stellten daher offensichtlich Nebenreaktionsprodukte dar. Der R_f -Wert des zu synthetisierenden *N*-Glycosylbausteins war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

In einer früheren Arbeit konnte die entsprechende *N*-glycosidische Verknüpfung zwischen einem Decasaccharid und der seitenkettengeschützten Aminosäure Fmoc-Asp-OtBu zu einem *N*-Glycosylbaustein erfolgreich durchgeführt werden.¹⁵⁵

Da die Verknüpfung des aminierten Nonasaccharids mit dem Aminosäurebaustein Fmoc-Asp-OtBu nicht mit Hilfe eines zugegebenen Aktivators erreicht werden konnte, wurde nach Alternativen der Bindungsknüpfung zwischen dem aminierten Nonasaccharid **5** und Fmoc-Asp-OtBu gesucht. Die Wahl fiel auf eine Bindungsknüpfung mit Hilfe einer bereits aktivierten Aminosäure. Dabei wird das zugegebene seitenkettengeschützte Aminosäurederivat zunächst in hochreaktiven Aktivester überführt. Diese Methode wurde bereits 1988 von Atherton *et al.* beschrieben und 1998 von Meinjohanns *et al.* erfolgreich umgesetzt, um vergleichbare *N*-Glycosylbausteine herzustellen.^{128;168}

Die Synthesestrategie nach Meinjohanns *et al.* sieht zunächst die Synthese des aktivierten Esters aus Fmoc-Asp-OtBu und 3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl (Dhbt) vor. Der

gebildete Ester zeichnet sich durch seine aktivierte und hochreaktive Carboxylfunktion der Aminosäure aus. Der Aktivester ist leicht zu synthetisieren und zu isolieren.

Für die durchzuführende Synthese wurden die gleichen Vorarbeiten durchgeführt wie in den vorangegangenen Synthesen. Alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien wurden absolutiert oder getrocknet und auf ihren Reinheitsgrad geprüft. Der Aktivester von Fmoc-Asp-OtBu wurde selbständig hergestellt und charakterisiert.

Das aminierte Nonasaccharid **6** wurde in absolutem DMSO gelöst und das aktivierte Aminosäurederivat Fmoc-Asp(ODhbt)-OtBu **8** hinzugegeben. Die zunächst klare Reaktionslösung verfärbte sich sofort nach Zugabe des Aktivesters tiefgelb und zeigte so den Start der Kupplungsreaktion an. Eine Reaktionsverfolgung mittels MALDI-TOF-MS konnte bereits 5 Minuten nach Zugabe von **8** die Bildung des Produktes **9** anzeigen. Nach einer Zeitspanne von 4 h war Edukt **6** nicht mehr detektierbar, was auf eine Beendigung der Reaktion schließen ließ. Zusätzlich zur Detektion mittels MALDI-TOF-MS wurde eine dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion an Kieselgel (CHCl₃/MeOH/H₂O; 10:4:1) durchgeführt, die nach 4 Stunden ebenfalls kein Edukt **6** mehr zeigte.

Zu diesem Zeitpunkt war die tiefgelbe Färbung der Reaktionslösung deutlich verblasst, was laut Literatur ein optisches Anzeichen für den Abschluss der Kupplungsreaktion darstellte.¹⁶⁸

Nach destillativer Abtrennung des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde das Rohprodukt von Verbindung **9** erhalten, das mittels HPLC an einer semipräparativen RP-C₁₈ Säule aufgereinigt werden konnte.

Durch den großen Saccharidanteil in Verbindung **7** und der damit verbundenen Polarität des Gesamtmoleküls ist Verbindung **7** gut in Wasser löslich. Die Abbildungen 4-19, 4-20 und 4-21 zeigen die Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS, sowie an Hand ein- und zweidimensionaler NMR-Spektren. Die betreffenden NMR-Spektren deuten auf Verunreinigungen hin, die nicht abgetrennt werden konnten.

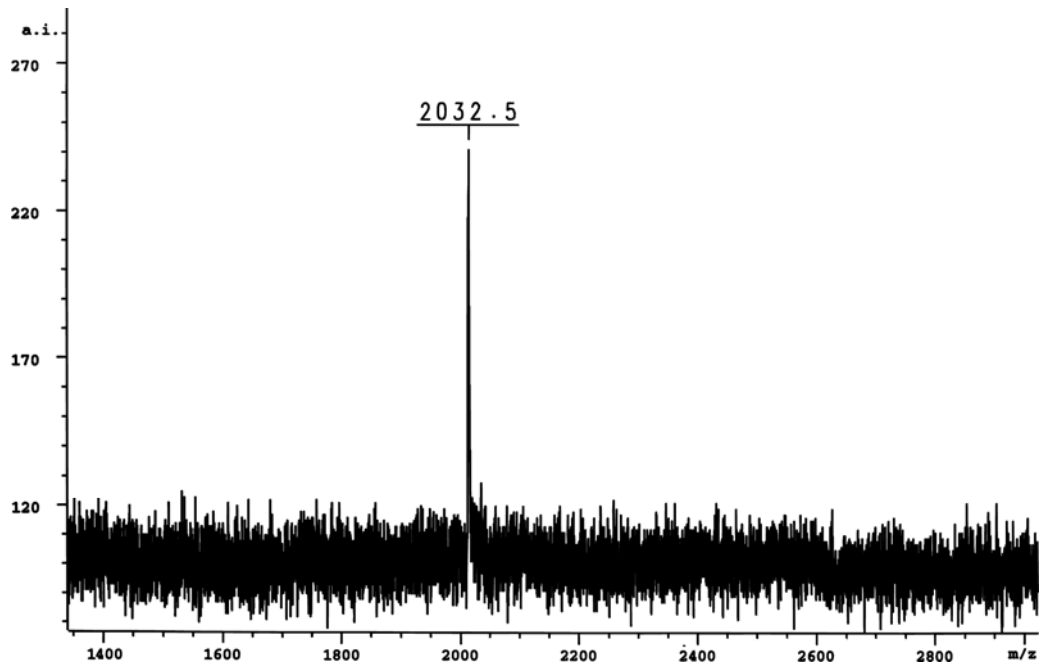


Abbildung 4-19: MALDI-TOF-MS Spektrum des N-Glycosylbausteins 2.

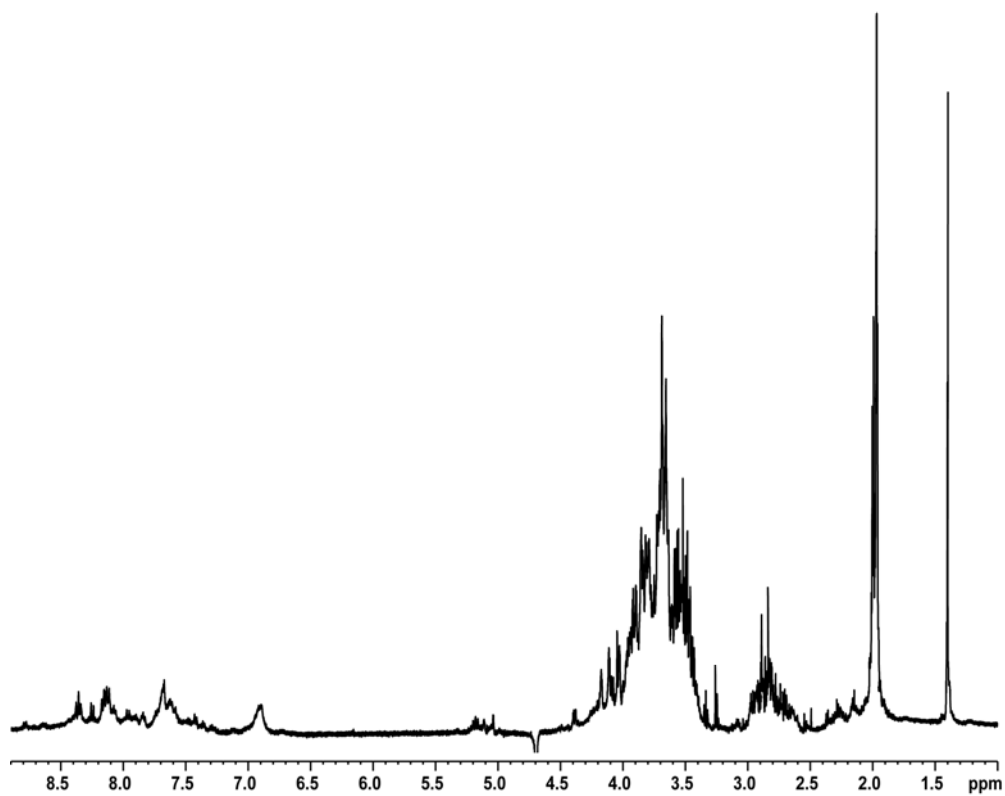


Abbildung 4-20: ¹H-NMR Spektrum des N-Glycosyl Bausteins 2. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) (pH = 3.5).

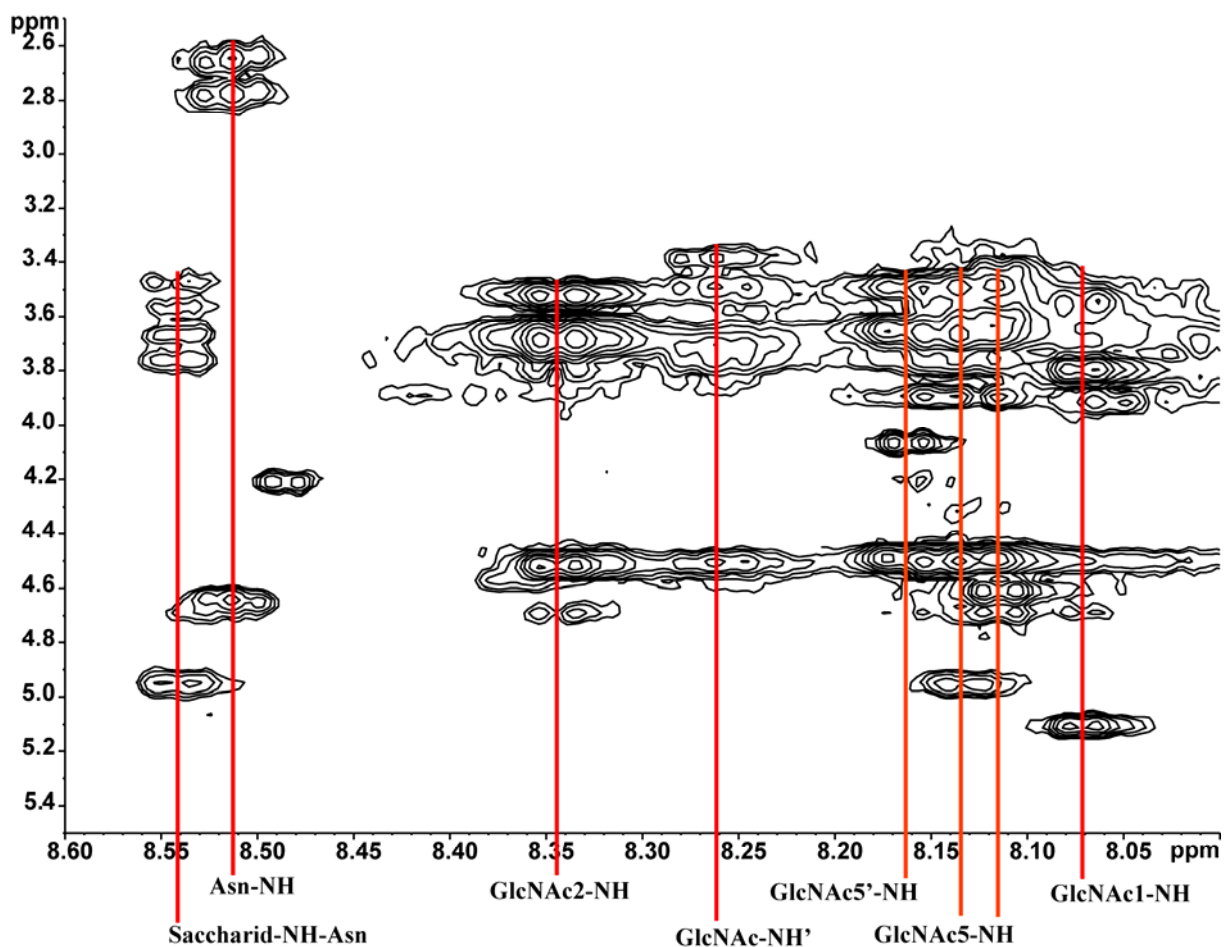


Abbildung 4-21: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums von Verbindung **2** aus dem Bereich der amidischen Protonen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) ($pH = 3.5$).

Durch die von Meinjohanns *et al.* beschriebene Methode konnte die gewünschte *N*-glycosidische Bindung zwischen dem Glycosylamin **6** und Fmoc-Asp-*Ot*Bu erfolgreich geknüpft werden. Die durchgeführte Synthese des *N*-Glycosylbausteins bietet sich für weitere Bausteinsynthesen mit anderen Oligosaccharideinheiten an. Fmoc-Asp(*ODhbt*)-*Ot*Bu **8** ist als Ausgangsreagenz leicht zu synthetisieren und bietet den Vorteil einer leichten Handhabbarkeit bei guten Reaktionsausbeuten. Die in vorangegangenen Arbeiten verwendeten Aktivoren TBTU und HATU sind in ihrer Handhabbarkeit und den Kosten gegenüber dem Aktivester **8** unterlegen.¹⁵⁴ Ein Nachteil der durchgeführten *N*-Glycanbausteinsynthese ist die Verwendung von DMSO als aprotisches polares Lösungsmittel. DMSO lässt sich im Ölpumpenvakuum nur schwierig entfernen. Bei neu durchzuführenden Synthesen sollte die Verwendung von DMF oder NMP überprüft werden. Nach der Isolierung und Charakterisierung des Produktes **2** wurde eine zweite erfolgreiche Bausteinsynthese mit Fmoc-Asp(*ODhbt*)-*Ot*Bu durchgeführt. Nachdem durch Detektion mittels MALDI-TOF-MS kein weiterer Reaktionsumsatz mehr beobachtet werden konnte, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Der erhaltene Rückstand

wurde in DMF aufgenommen und Verbindung **9** mittels vorsichtiger Zugabe von Essigsäureanhydrid / Pyridin (Verhältnis 2:1) an den freien Hydroxylgruppen zu Verbindung **10** acetyliert. Die Schützung der freien OH-Gruppen des Oligosacchararids wurde durchgeführt um unerwünschte Nebenreaktionen in der später anschließenden Festphasensynthese auszuschließen. Die Acetylierung von Verbindung **9** muss unbedingt unter Eiskühlung und über einen Zeitraum von mehreren Stunden erfolgen. Eine Zugabe von Ac₂O / Pyridin (2:1) ohne Eiskühlung ergab den entsprechenden Trisaccharidbaustein. Da die α -mannosidischen Bindungen zwischen den Glycosyluntereinheiten 3 und 4 sowie 3 und 4' leicht gespalten werden können, scheint der exotherme Charakter der Schützung bereits auszureichen, um diese glycosidische Bindungen thermolytisch zu spalten.

Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde das erhaltene Rohprodukt zunächst zweimal aus Ethanol umkristallisiert, um die größten Verunreinigungen zu entfernen. Das umkristallisierte Rohprodukt wurde mittels RP-HPLC an einer präparativen C₁₈-Säule aufgereinigt. Trotz intensivster Bemühungen konnte der vollständig acetylierte Glycosylbaustein nicht völlig aufgereinigt werden. Durch die Acetylierung scheinen viele Nebenprodukte gebildet worden zu sein, die eine Aufreinigung sehr schwierig gestalteten. Die Charakterisierung erfolgte mittels MALDI-TOF-MS und NMR. Obwohl im MALDI-TOF-MS Spektrum keine Verunreinigung unter einer Masse von 1000 m/z zu identifizieren ist, zeigt das abgebildete ¹H-NMR Spektrum den Grad der Verunreinigung.

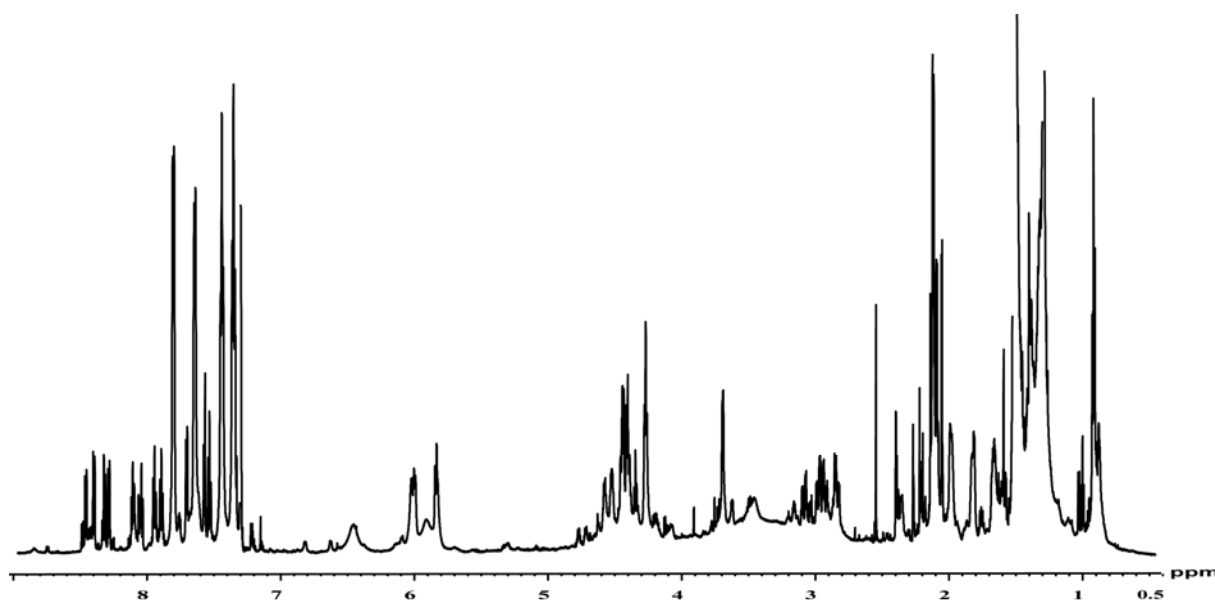


Abbildung 4-22: ¹H-NMR Spektrum des vollständig peracetylierten N-Glycosyl Bausteins **10**. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in CDCl₃.

Die quantitative Entfernung der *t*Bu-Schutzgruppe an der Hydroxylfunktion der Aminosäure wurde durch einstündige Umsetzung mit einem Gemisch aus TFA/Wasser (Verhältnis 19:1)

durchgeführt. Nach erfolgreicher Entschützung von Verbindung **10** zu Verbindung **11** wurde eine weitere Aufreinigung mittels HPLC an einer *RP-C₁₈*-Säule durchgeführt, die jedoch wiederum keine quantitative Reinigung des acetylierten Bausteins **10** erreichen konnte. Abbildung 4-23 zeigt das MALDI-TOF-MS Spektrum von Verbindung **11** (MW = 2987.2 g/mol).

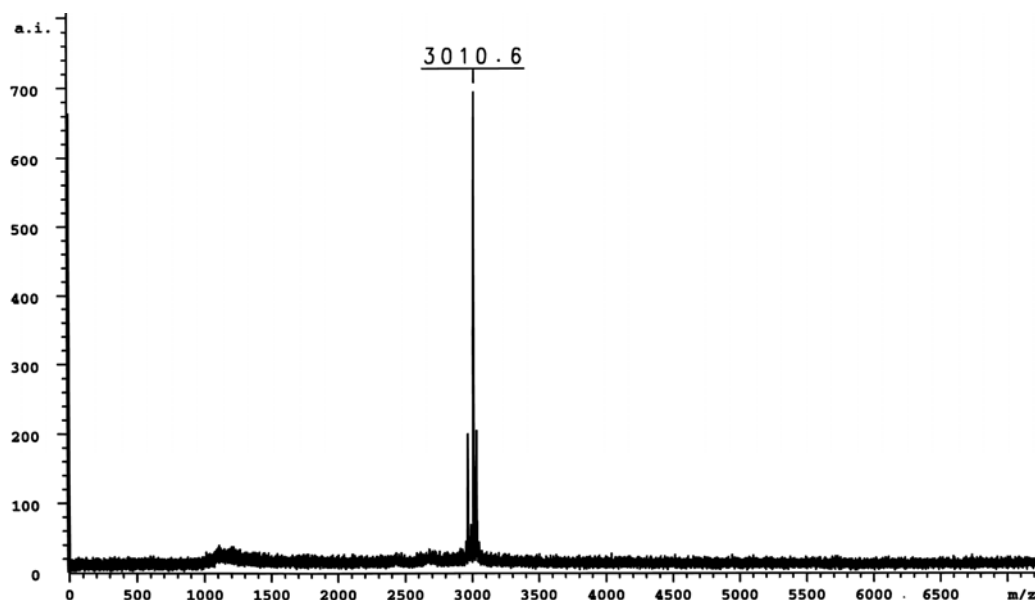


Abbildung 4-23: MALDI-TOF-MS Spektrum des vollständig acetylierten, an der Carboxylfunktion entschützten Bausteins **11**.

4.4 Synthese von Peptiden und Glycopeptiden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Peptid- und Glycopeptidsynthesen wurden an einem automatischen Peptidsynthesizer nach dem *continuous flow*-Verfahren durchgeführt. Die Synthesen erfolgten dabei in einer Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese. Der Einbau des jeweiligen *N*-Glycosylbausteins in die wachsende Peptidkette wurde manuell vorgenommen.

Als Festphase wurde ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz (Abbildung 4-24) verwendet. Das Harz war durch einen 5-(Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeriansäure (PAL)-Linker funktionalisiert und die Aminofunktion des PAL-Linkers durch die Fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc) Gruppe geschützt. Das gewählte Harz bietet den Vorteil, bei der geforderten Druckstabilität in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese, ein geringes Quellvermögen aufzuweisen. Nach ihrer Abspaltung von der Festphase liegen die (Glyco) Peptide C-terminal als Säureamid und N-terminal mit freier Aminofunktion vor.

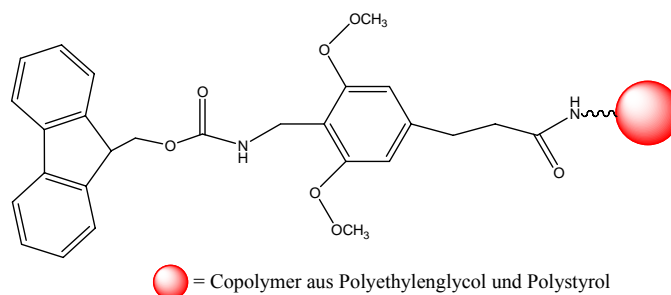


Abbildung 4-24: Schematische Darstellung des PAL Linkers am Polystyrol Harz

Die verwendeten Aminosäuren wurden als seitenkettengeschützte Derivate eingesetzt, wobei die Aminofunktionen durch die Fmoc-Gruppe geschützt und die Carboxygruppen ungeschützt vorlagen. Die Seitenketten wurden je nach Aminosäure durch die Triphenylmethyl (Trityl)-, 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)- oder *tert*-Butyl (*t*-Bu)-Gruppe geschützt. In der alternativen manuellen Synthesevariante wurden die seitenketten- und NH-geschützten Aminosäuren als die *OPfp*- oder *ODhbt- α* -Aktivester ihrer Carboxylfunktion eingesetzt.

Vor Beginn jedes Synthesesyklus ist es erforderlich die Fmoc-Schutzgruppe von der Aminofunktion zu entfernen. Die quantitative Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird durch Einwirkung einer 20%-igen Piperindinlösung in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) erreicht. Untersuchungen der Reaktionskinetik belegen, dass nach einem maximalen Zeitraum von zehn Minuten die Fmoc-Schutzgruppe als Methylenfluoren quantitativ abgespalten wurde.¹⁵⁵ Da Methylenfluoren durch seine UV-Absorption bei $\epsilon = 7950 \text{ cm}^2/\text{mol}$ in Lösung bestimmt werden kann, ist es möglich die Quantität der einzelnen Kupplungen zu bestimmen. Die Detektion des abgespaltenen Methylenfluorens erfolgte automatisch. Die Bestimmung nach den manuellen Kupplungen wurde von Hand an einem UV-Spektrometer vorgenommen. Das Harz wird hierfür mit einem exakt abgemessenen Volumen an Abspalllösung bedeckt und mit exakten Volumina von DMF gewaschen. Nach entsprechender Verdünnung wird der in Lösung befindliche Methylenfluorenwert bestimmt und daraus die am Harz vorhandene Menge freier Aminofunktionen berechnet. Diese Methode liefert einen guten Anhaltspunkt für die Abschätzung der Kupplungsausbeute, der Fehler kann jedoch bis zu 20 % betragen. Die hohe Fehlerquote wird durch die Instabilität des detektierten Methylenfluorens in Lösung verursacht. Der bestimmte Methylenfluorenwert kann insbesondere durch Lichteinwirkung verfälscht werden. Der Einbau der Aminosäuren in die wachsende Peptidkette erfolgte mithilfe des Aktivators TBTU. Bezogen auf die am Harz befindlichen freien Aminofunktionen wurden je Kupplungsschritt vier Äquivalente geschütztes Aminosäurederivat und fünf Äquivalente des Aktivators TBTU sowie der Base DIPEA eingesetzt. Die hohen Überschüsse der eingesetzten Reagenzien gewährleisteten eine nahezu quantitative Ausbeute der Kupplungsreaktion. Um die Ausbeuten zusätzlich zu optimieren wurden die Kupplungen dreifach durchgeführt. Nach Ende jeder Kupplung wurden die noch

am Harz befindlichen nicht umgesetzten freien Aminofunktionen mittels Zugabe einer 10 %-igen Lösung aus Essigsäureanhydrid in DMF acetyliert. Die Acetylierung soll ein unkontrolliertes Kettenwachstum durch Bildung von unerwünschten Deletionsnebenprodukten unterbinden. Die Reaktionsbedingungen für den Einbau eines *N*-Glycosylbausteins müssen sorgfältig gewählt werden, da der Baustein nur in begrenzten Mengen zur Verfügung steht und ein wertvolles Edukt darstellt. Daher ist es von Bedeutung mit möglichst geringem Einsatz dieses Eduktes eine maximale Kupplungsausbeute zu erzielen. In diesem Zusammenhang führt die intramolekulare Aspartimidbildung zu Ausbeuteverlusten, da sich dieses thermodynamisch außerordentlich stabile Produkt leicht durch die Zugabe von TBTU bilden kann (Abbildung 2-4).

Für die manuelle Kupplung des *N*-Glycosylbausteins an die Peptidkette wurde der Aktivator TBTU in Gegenwart der Base DIPEA gewählt. Alternativ zu der Verwendung von TBTU ist jedoch eine Umsetzung des jeweiligen *N*-Glycosylbausteins in seinen entsprechenden *OPf*- oder *ODhbt*-Aktivester überlegenswert. Laut Literatur verspricht die Umsetzung mit Aktivestern eine bessere Ausbeute bei sterisch anspruchsvollen Kupplungen.^{31;168}

Die Kupplung der *N*-Glycosylbausteine erfolgte unter Feuchtigkeitsausschluss mit absolutiertem DMF. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine optimale Kupplungsausbeute der *N*-Glycosylbausteine bei einer Kupplungszeit von mehr als sechs Stunden erreicht werden konnte. Das Verhältnis von Baustein zu Aktivator und Base sollte 4:5:5 betragen und möglichst 1.5 eq Baustein bezogen auf die freien Aminofunktionen am Harz eingesetzt werden.¹⁵⁴

Die *O*-Deacetylierung der an der festen Phase befindlichen und am Saccharidanteil peracetylierten Glycopeptide wurde durch eine sechs- bis zwölfstündige Umsetzung mit Hydrazinhydrat in absolutiertem Methanol erreicht. Der Vorteil dieser Methode liegt in der leichten Aufreinigung des Produktes durch mehrfaches Waschen mit Methanol.

Die Abspaltung der Peptide von der Festphase unter gleichzeitiger quantitativer Entschützung der Seitenketten wurde durch die Zugabe eines Gemisches aus TFA, TIPS und H₂O (Verhältnis: 95:5:2) über einen Zeitraum von zweimal 60 Minuten durchgeführt.

Durch die gleichzeitige Seitenkettenentschützung lagen nach der Abspaltung auch die Sulfhydrylfunktionen in den Cysteinseitenketten ungeschützt vor. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität musste daher unter Sauerstoffausschluss gearbeitet werden. Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine sind sehr leicht oxidierbar und können bei Einwirkung von Luftsauerstoff unkontrolliert intermolekular zu einem unlöslichen Feststoff polymerisieren. Durch die Abspaltung unter Entschützung von Harz liegt das (Glyco)Peptid in seiner linearen offenkettigen Form vor. Die Anwesenheit von Luftsauerstoff in der Reaktionslösung würde sofort zu ungewollten intermolekularen Reaktionen führen und die oben genannten Polymerisation nach sich ziehen.

Die Verknüpfung der beiden in der Sequenz vorliegenden Sulfhydrylgruppen zu einer Disulfidbrücke erfolgte zunächst unter Luftausschluss in großer Verdünnung um eine

intramolekulare Reaktion zu begünstigen. Die in der Literatur vorgeschlagene Konzentration der Reaktionslösung sollte dabei 1 μmol (Glyco)Peptid in 50 mL gesättigter 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung betragen.¹⁶⁹ Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde unter Sauerstoffausschluss gerührt und anschließend unter starkem Rühren für 72 h Luftsauerstoff eingeleitet. Die Lösung wurde ultrafiltriert, um Salze und kleinere Abbruchpeptide abzutrennen. Anschließend war eine Identifizierung der gewünschten Produkte mittels MALDI-TOF-MS möglich.

4.4.1 Synthese des nicht glycosylierten cyclisierten V3-Peptides **12**; **NESVEINCTRPSNNTRKSIHIGPGRAFATGEIIGDIRQAHCNVS**

Die Synthese des unglycosylierten cyclischen V3-Peptides **12** erfolgte als Referenzsubstanz zu den zu synthetisierenden glycosylierten Verbindungen. Anhand des Vergleiches zwischen dem cyclischen Referenzpeptid **12** und den glycosylierten Verbindungen sollte der Einfluss des jeweiligen *N*-Glycans auf Struktur und Bindungsverhalten erfolgen.

Die Synthese des 45 Aminosäuren langen Referenzpeptides **12** erfolgte in zwei Abschnitten durch automatisierte Festphasensynthese gemäß AAV 1. Die Anknüpfung der ersten Aminosäure beider Teilsequenzen wurde je dreimal für 180 Minuten unter vierfachem Überschuss durchgeführt. Erfahrungsgemäß benötigt die erste Aminosäure einer Sequenz lange Kupplungszeiten, um eine befriedigende Ausbeute zu erzielen. Alle Aminosäuren der zweiten Teilsequenz wurden bei vierfachem Überschuss dreimal für jeweils 120 Minuten gekuppelt. Vorgegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Ausbeute der Kupplungsschritte sonst keine zufriedenstellenden Ergebnisse ergaben.¹⁵⁶

Die Bestimmung des Fmoc-Wertes nach Beendigung der Synthese ergab eine Reaktionsausbeute von 54 % bezogen auf den gewählten 50 μmol Reaktionsansatz. Die größten Einbußen der Kupplungsausbeuten traten an den Positionen G³¹⁰ bis Y³¹⁶ auf. Bei diesem Bereich handelt es sich um das GGRAF-Motiv, das sowohl den *tip* der V3-Loop, als auch ein *turn*-Motiv darstellt.¹⁰⁸ Eine Verminderung der Kupplungsausbeuten in diesem Bereich wurde bereits früher beobachtet und kann mit sterischen Effekten erklärt werden.¹⁵⁶

Das Peptid wurde gemäß AAV 6 unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen von der Festphase abgespalten und unter Sauerstoffausschluss in eine entgaste und mit Helium gesättigte 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung überführt. Durch die Einwirkung von Luftsauerstoff wurden die freien Thiolgruppen der Cysteine an Position 296 und 330 innerhalb der Sequenz unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke oxidiert. Das stark salzhaltige Produkt wurde ultrafiltriert (regenerierte Zellulose, *cut off* 1000 Da) und der Rückstand gefriergetrocknet. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC an einer *RP-C*₁₈-Säule. Es wurden 12 mg (2.4 μmol) des Produktes **12** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 4.8 % bezogen auf den gewählten Reaktionsansatz von 50 μmol . Die theoretische Cyclisierungsausbeute bezogen auf das eingesetzte Rohprodukt betrug 10 %.

Nach Aufreinigung konnte das Produkt **12** (MW = 4924.42 g/mol) zunächst mittels MALDI-TOF-MS durch ein Massensignal bei $[M]^+ = 4925.24$ m/z eindeutig identifiziert werden. Die Charakterisierung mittels NMR erfolgte an Hand von 2D-NMR-Experimenten.

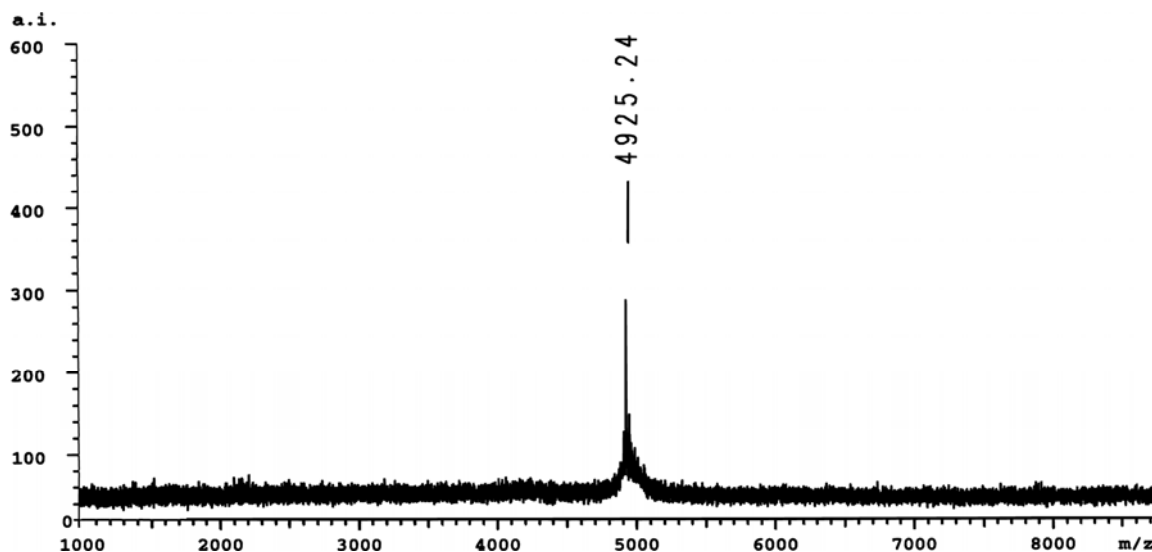


Abbildung 4-25: MALDI-TOF-MS Spektrum des cyclisierten, nicht glycosylierten Peptids 12.

Bei der Aufnahme und der anschließenden Auswertung der 2D-NMR-Spektren traten die gleichen Probleme wie in einer vorangegangenen Arbeit von J. Tost auf.¹⁵⁴ Trotz ausreichender Substanzmenge von 8 mg (1.6 μ mol) ergaben sich für diese Substanzmenge nicht zufrieden stellende Spektren. Die gelöste Substanzmenge von 2 μ mol ergibt eine Konzentration der NMR-Probe von 2.5 mM. Die Lösung zeigte unter UV-Licht feine dispergierte Teilchen. Diese konnten nicht abfiltriert oder mittels Ultraschall gelöst werden. Umfangreiche Untersuchungen der Probenreinheit zeigten keinerlei Verunreinigung. Es wird die Vermutung von J. Tost unterstützt, dass sich cyclische V3-Peptide kollodial aneinander anlagern können.¹⁵⁴ Es ist ebenfalls möglich, dass noch Reste des polymerisierten Peptids in Lösung vorlagen. Weder Änderungen des Lösungsmittelgemisches, der Prozessierung, noch der Probenkonzentration konnten Abhilfe schaffen. Die genannten Probleme zeigten sich ebenfalls in den folgenden Abschnitten 4.4.2 bis 4.4.4 und führten zu erheblichen Problemen bei der Spektrenauswertung. In den vorliegenden Spektren der Verbindung **12** konnte die Identifikation jedoch eindeutig durchgeführt werden.

In dem in Abbildung 4-26 dargestellten Ausschnitt der NH-Region des cyclischen Peptids **12** konnten im Bereich zwischen 7.85 und 8.75 ppm 42 Aminosäuren eindeutig identifiziert und ihren Spinsystemen zugeordnet werden. Die Charakterisierung der beiden in der Sequenz enthaltenen Proline erfolgte über die Identifikation ihrer $CH\alpha$ -Spuren bei 4.375 und 4.386 ppm. Die $CH\alpha$ -Spur des terminalen Asparagins N²⁸⁹ konnte nicht identifiziert werden, da die betreffende $CH\alpha$ -Spur im Bereich der Wasserunterdrückung durch die *watergate*-Pulssequenz

lag. Die NH-Spur des terminalen N²⁸⁹ ist durch Austauschprozesse nicht im Bereich der amidischen Protonen sichtbar. Daher stellt N²⁸⁹ die einzige Aminosäure dar, die nicht identifiziert und zugeordnet werden konnte.

Die Sequenzierung des cyclischen V3-Peptids **12** erfolgte anhand der Analyse der sequentiellen NOE-Signale ihrer benachbarten Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum.

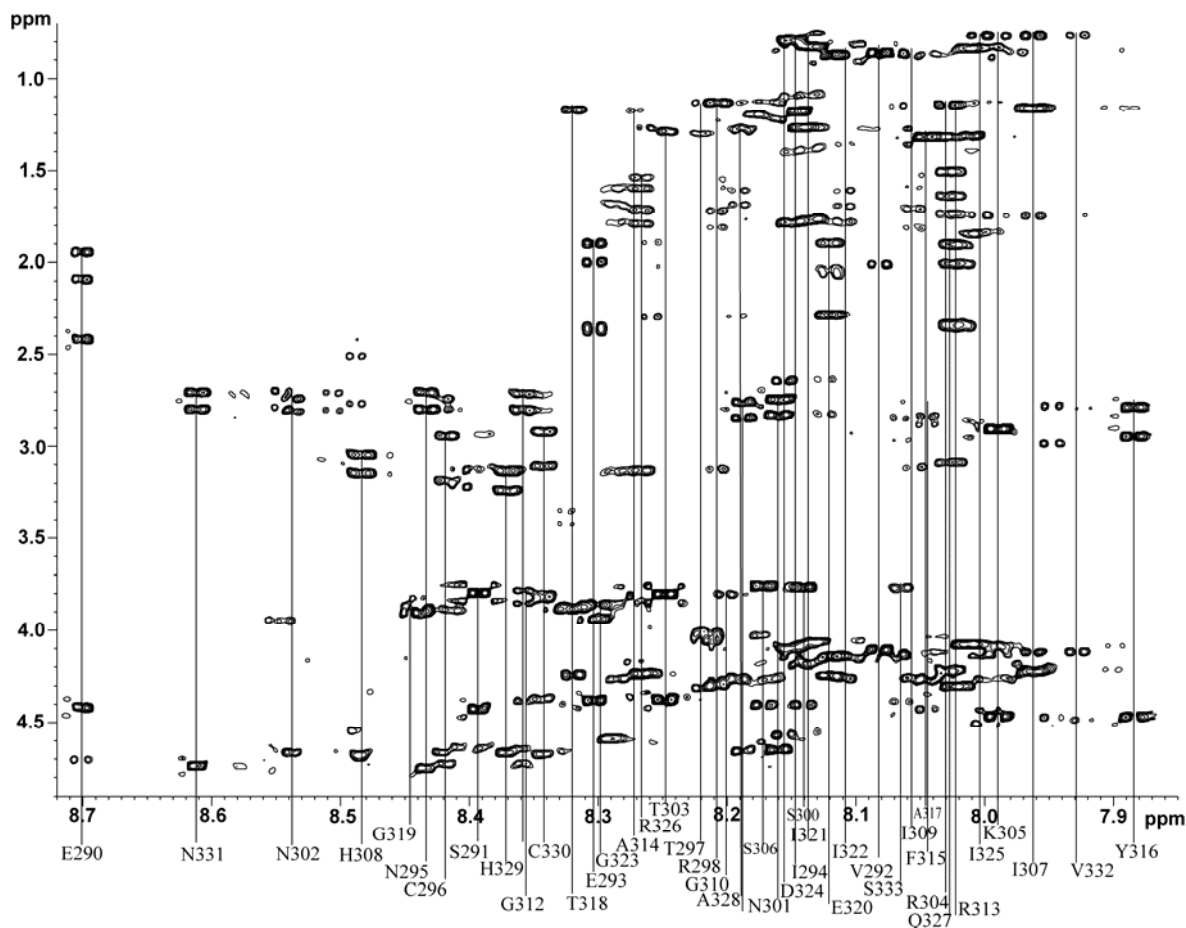


Abbildung 4-26: Ausschnitt aus dem NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des cyclisierten, nicht glycosylierten V3-Peptids **12**. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) und pH 3.5.

Es wurden 52 strukturelevante sequentielle NH_i-NH_{i+1}-NOE-Kontakte des cyclischen V3-Peptids **12** identifiziert. Darüberhinaus konnten vierzehn *long-range* NOE-Kontakte eindeutig identifiziert werden. Diese NOE-Kontakte treten ausnahmslos zwischen sich gegenüberliegenden Aminosäuren in den Flanken der cyclischen Loop auf. Diese Beobachtungen scheinen zu bestätigen, dass durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen C²⁹⁶ und C³³⁰ eine geordnete Struktur der Loop stabilisiert wird. Dadurch ist es möglich, dass gegenüberliegende Aminosäuren räumlich miteinander interagieren und so die Struktur der Loop beeinflussen. Dabei ist zu beobachten, dass zwischen den Disulfidbrücken verbrückten, sich in der Sequenz gegenüberliegenden, Cysteinen gegenseitige Raumkontakte auftreten.

Dies wird als Beweis für eine sehr enge räumliche Nähe angesehen. Die nachfolgenden Aminosäuren insbesondere Aminosäuren mit langen Seitenketten, wie z. B. Arg³⁰⁴ oder Ile³²⁵ zeigen ebenfalls deutliche *long-range* Kontakte zur gegenüberliegenden Seite der Loop. Die beobachteten Kontakte weisen alle auf eine räumliche Nähe beider Flanken der V3-Loop hin. Die eindeutige Sequenzierung der einzelnen Aminosäuren war außerordentlich schwierig, da eine Vielzahl weiterer Raumkontakte beobachtet werden konnte. Abbildung 4-28 zeigt das TOCSY-Spektrum im Vergleich zum NOESY-Spektrum und die zahlreichen Raumkontakte.

AS	NOE-Kontakte			AS	NOE-Kontakte		
	i+1	i+2	weitere Kontakte		i+1	i+2	weitere Kontakte
Asn ²⁸⁹	-	-	-	Gly ³¹²	-	-	Glu³²⁰
Glu ²⁹⁰	Asn ²⁸⁹	-	Val ²⁹²	Arg ³¹³	Gly ³¹²	-	-
Ser ²⁹¹	Glu ²⁹⁰	-	-	Ala ³¹⁴	Arg ³¹³	-	-
Val ²⁹²	Ser ²⁹¹	-	-	Phe ³¹⁵	Ala ³¹⁴	-	Tyr ³¹⁶
Glu ²⁹³	Val ²⁹²	-	Ile ²⁹⁴	Tyr ³¹⁶	Phe ³¹⁵	-	-
Ile ²⁹⁴	Glu ²⁹³	-	Asn ²⁹⁵	Ala ³¹⁷	Tyr ³¹⁶	-	-
Asn ²⁹⁵	Ile ²⁹⁴	-	-	Thr ³¹⁸	Ala ³¹⁷	-	Ile³⁰⁷
Cys ²⁹⁶	Asn ²⁹⁵	-	Cys³³⁰, Thr²⁹⁷	Gly ³¹⁹	Thr ³¹⁸	-	-
Thr ²⁹⁷	Cys ²⁹⁶	-	Arg ²⁹⁸	Glu ³²⁰	Gly ³¹⁹	-	Asn³⁰²
Arg ²⁹⁸	Thr ²⁹⁷	Cys ²⁹⁶	-	Ile ³²¹	Glu ³²⁰	-	Arg³⁰⁴
Pro ²⁹⁹	-	-	-	Ile ³²²	Ile ³²¹	-	His³⁰⁸
Ser ³⁰⁰	-	-	Arg³⁰⁴	Gly ³²³	Ile ³²²	-	-
Asn ³⁰¹	Ser ³⁰⁰	-	Arg³²⁶	Asp ³²⁴	Gly ³²³	-	-
Asn ³⁰²	Asn ³⁰¹	-	Thr ³⁰³	Ile ³²⁵	Asp ³²⁴	-	Asn³⁰¹
Thr ³⁰³	Asn ³⁰²	-	Arg ³⁰⁴	Arg ³²⁶	Ile ³²⁵	-	Asn³⁰¹
Arg ³⁰⁴	Thr ³⁰³	-	Asp³²⁴	Gln ³²⁷	Arg ³²⁶	-	Arg²⁹⁸
Lys ³⁰⁵	Arg ³⁰⁴	-	Ser ³⁰⁶	Ala ³²⁸	Gln ³²⁷	-	Cys²⁹⁶
Ser ³⁰⁶	Lys ³⁰⁵	-	-	His ³²⁹	Ala ³²⁸	-	-
Ile ³⁰⁷	Ser ³⁰⁶	-	Ile ³⁰⁹	Cys ³³⁰	His ³²⁹	-	Cys²⁹⁶
His ³⁰⁸	Ile ³⁰⁷	-	-	Asn ³³¹	Cys ³³⁰	-	Val²⁹²
Ile ³⁰⁹	His ³⁰⁸	-	-	Val ³³²	Asn ³³¹	-	-
Gly ³¹⁰	Ile ³⁰⁹	-	-	Ser ³³³	Val ³³²	-	-
Pro ³¹¹	-	-	-				

Tabelle 1: Strukturelevante NOE Kontakte des cyclischen V3-Peptids 12. Long Range Kontakte sind schwarz hervorgehoben.

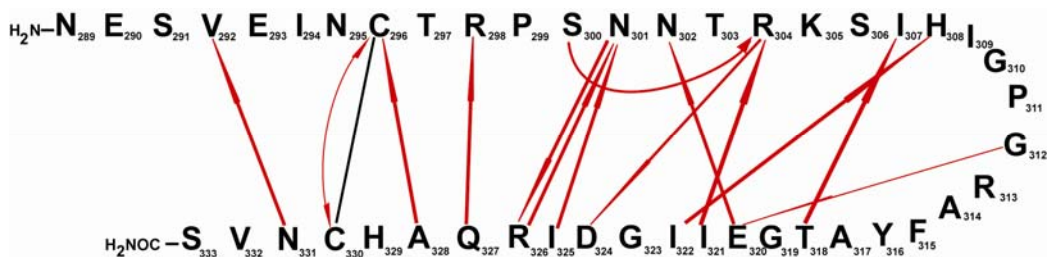


Abbildung 4-27: Schematisierte graphische Übersicht der beobachteten NOE Kontakte des cyclischen V3-Peptids 12.

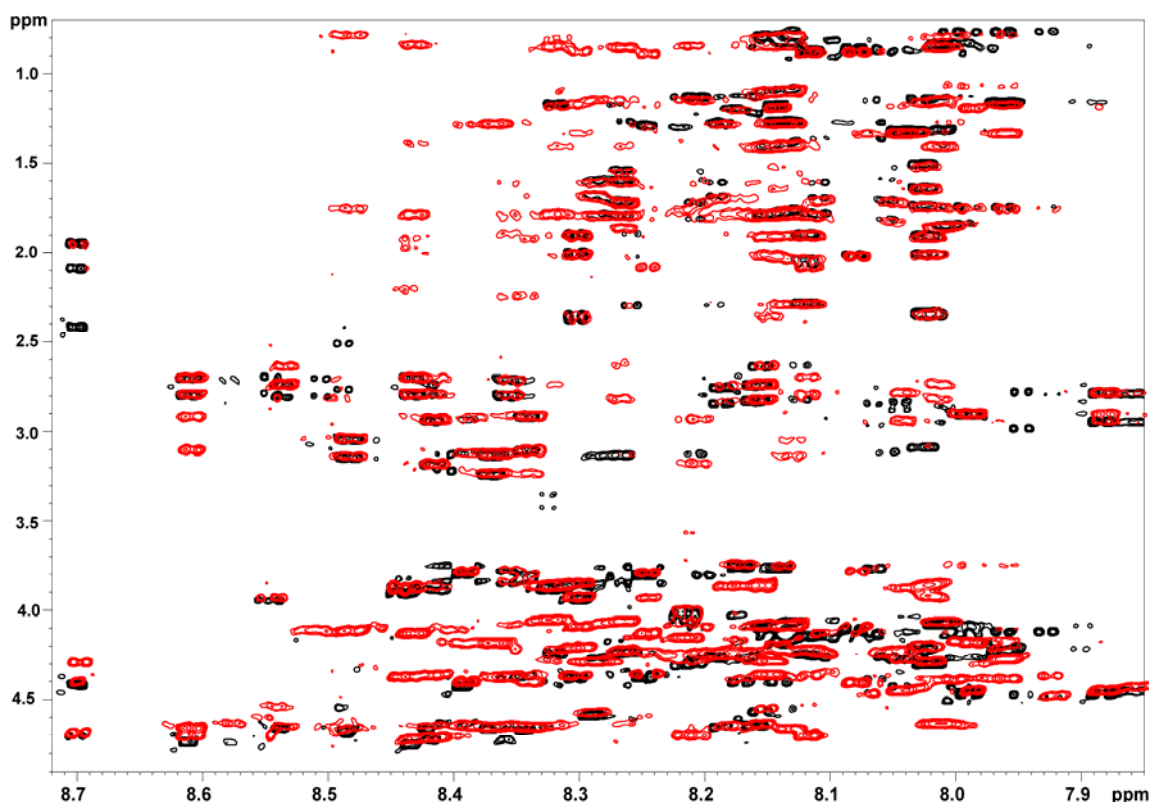


Abbildung 4-28: Ausschnitte der NH-Bereiche des TOCSY-Spektrums (schwarz) und des NOESY-Spektrums (rot) des cyclisierten, nicht glycosylierten V3-Peptids 12.

4.4.2 Synthese des cyclisierten glycosylierten V3-Peptides 14; **NESVEINCTRPSN(GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS**

Die Synthese des cyclischen Glycopeptids 14 mit einer *N*-glycosidisch gebundenen *N*-Acetylglucosamin-Einheit an Position N³⁰¹ erfolgte durch eine Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese.

In einem 50 μmol Syntheseansatz wurde zunächst ein 32 Aminosäuren langer Sequenzabschnitt $\text{H}_2\text{N}^{302}\text{-NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS}^{333}\text{-COOH}$ synthetisiert. Die erste Aminosäure dieser Teilsequenz wurde dreimal für je 120 Minuten unter vierfachem Überschuss an die Festphase gekuppelt. Die nachfolgenden Kupplungen wurden bei

vierfachem Überschuss für je 30, 60 und 90 Minuten durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese ergab die Bestimmung der Reaktionsausbeute gemäß AAV 2 eine Ausbeute von 42 μmol (84 %). Der Reaktionsansatz wurde gedrittelt. Die nachfolgenden Schritte wurden jeweils mit einem Drittel des an der Festphase befindlichen Peptids durchgeführt.

Alle folgenden Schritte wurden in einer Argonatmosphäre durchgeführt. Der manuelle Einbau des *N*-Glycosylbausteins wurde mit einem Äquivalent *N*-Acetylglucosaminbaustein **3**, 1.25 Äquivalenten TBTU und 1.25 Äquivalenten DIPEA vorgenommen. Alle Äquivalente bezogen sich dabei auf das vorliegende festphasengebundene Peptid.

Der *N*-Acetylglucosaminbaustein **3** und der Aktivator TBTU wurden zunächst separat in absolutem DMF gelöst. Das DIPEA wurde zum gelösten TBTU hinzugegeben und beide Lösungen vereinigt. Dies sollte eine Voraktivierung des *N*-Acetylglucosaminbausteins **3** bewirken. Nach 2 Minuten wurde die Gesamtreaktionslösung zum Harz gegeben und für 36 Stunden gekuppelt. Nach einer zweiten Kupplung wurde gemäß AAV 2 die Rohausbeute des Kupplungsschrittes bestimmt. Die erzielte Ausbeute des manuellen Kupplungsschrittes betrug 98 % (13 μmol Glycopeptid an der Festphase).

Nach dem erfolgreichen Einbau des *N*-Acetylglucosaminbausteins in die Peptidkette wurde mit der Anknüpfung der zweiten Teilsequenz $\text{H}_2\text{N-}^{289}\text{VEINCTRPS}^{300}\text{-COOH}$ fortgefahren. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass nach dem Einbau eines *N*-Glycans in eine wachsende Peptidkette die Kupplungsausbeuten nachfolgender Aminosäuren deutlich reduziert werden.¹⁵⁶ Daher wurden die Kupplungszeiten aller nachfolgenden Aminosäuren mit je dreimal 120 Minuten festgelegt. Die Bestimmung der Gesamtausbeute gemäß AAV 2 nach Beendigung der Synthese ergab einen Wert von 70 % (9 μmol) bezogen auf die Kupplung der zweiten Teilsequenz. Der Hauptausbeuteverlust trat nach dem Einbau des *N*-Glycosylbausteins in die Peptidkette auf. Darüberhinaus konnte eine deutliche Verschlechterung der Kupplungsausbeuten während der Kupplungen des GPGRF-Motivs beobachtet werden. Vor Abspaltung von der Festphase wurde das an seiner Glycosylstruktur *O*-acetylierte Glycopeptid für 6 Stunden durch Zugabe von Hydrazinhydrat/Methanol (1:5) deacetyliert.

Das Glycopeptid **14** wurde gemäß AAV 6 unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen von der Festphase abgespalten und die Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Unter Sauerstoffausschluss wurde zum erhaltenen Rückstand eine entgaste mit Helium gesättigte 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung zugegeben. Durch die Einwirkung von Luftsauerstoff wurden die freien Thiolgruppen der Cysteine an Position 296 und 330 innerhalb der Sequenz unter Ausbildung einer Disulfidbrücke intramolekular oxidiert.

Das stark salzhaltige Rohprodukt wurde ultrafiltriert (Membran: regenerierte Zellulose, *cut off* 1 kDa) und gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde mittels HPLC an einer semipräparativen *RP*-C₁₈ Säule aufgereinigt und 1.8 mg (0.6 μmol) des cyclisierten

glycosylierten V3-Peptids **14** erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 1.8 % bezogen auf die ermittelte Menge Glycopeptid am Harz vor der Abspaltung.

Verbindung **14** (MW = 5125.48 g/mol) wurde durch ein Massensignal von $[M]^+ = 5125.01$ m/z im MALDI-TOF-MS Spektrum identifiziert. Die eindeutige Charakterisierung wurde mittels 2D-NMR-Experimenten durchgeführt.

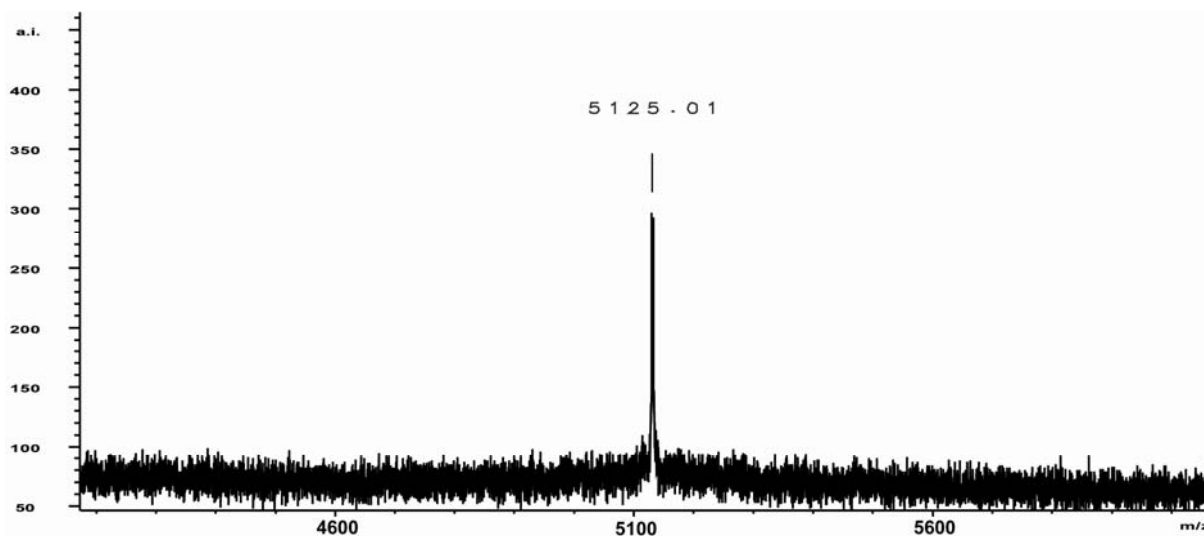


Abbildung 4-29: MALDI-TOF-MS Spektrum des MALDI-TOF-MS Spektrum des cyclisierten glycosylierten Peptids **14**.

Die Charakterisierung mittels 2D-NMR gestaltete sich ähnlich schwierig wie bei dem cyclischen nicht glycosylierten V3-Peptid **12**. Es konnte nur eine schlechte Signal-zu-Rausch Qualität erreicht werden. Die aufgenommenen Signale zeigen sich verbreitert und schlecht dispergiert. Eine Untersuchung unter UV-Licht zeigte wiederum Anzeichen für eine Aggregation der Glycopeptide in Lösung. Eine erhebliche Schwierigkeit stellte die Tatsache dar, dass das Glycopeptid **14** während der NMR-Messungen teilweise aus dem Lösungsmittel ausfiel. Das ausgefallene Glycopeptid **14** konnte durch Aufnahme in 15 mL Wasser wieder gelöst und nach Gefriertrocknung zurückgewonnen werden. Aufgrund der Vergleichbarkeit aller aufgenommenen Spektren wurden die Messungen jedoch trotzdem in H₂O/D₂O (9:1) bei einem pH-Wert von 3.5 durchgeführt. Da das cyclische Glycopeptid **14** spätestens nach 6 Stunden aus der Lösung ausfiel, konnte aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Stoffmenge nur relativ schlecht dispergierte NOESY-Spektren erhalten werden. Die Sequenzierung konnte anhand dieses Spektrums eindeutig erfolgen. Es konnten jedoch nicht so viele *long-range* NOE-Kontakte beobachten werden, wie im cyclischen, nicht glycosylierten V3-Peptid **12**.

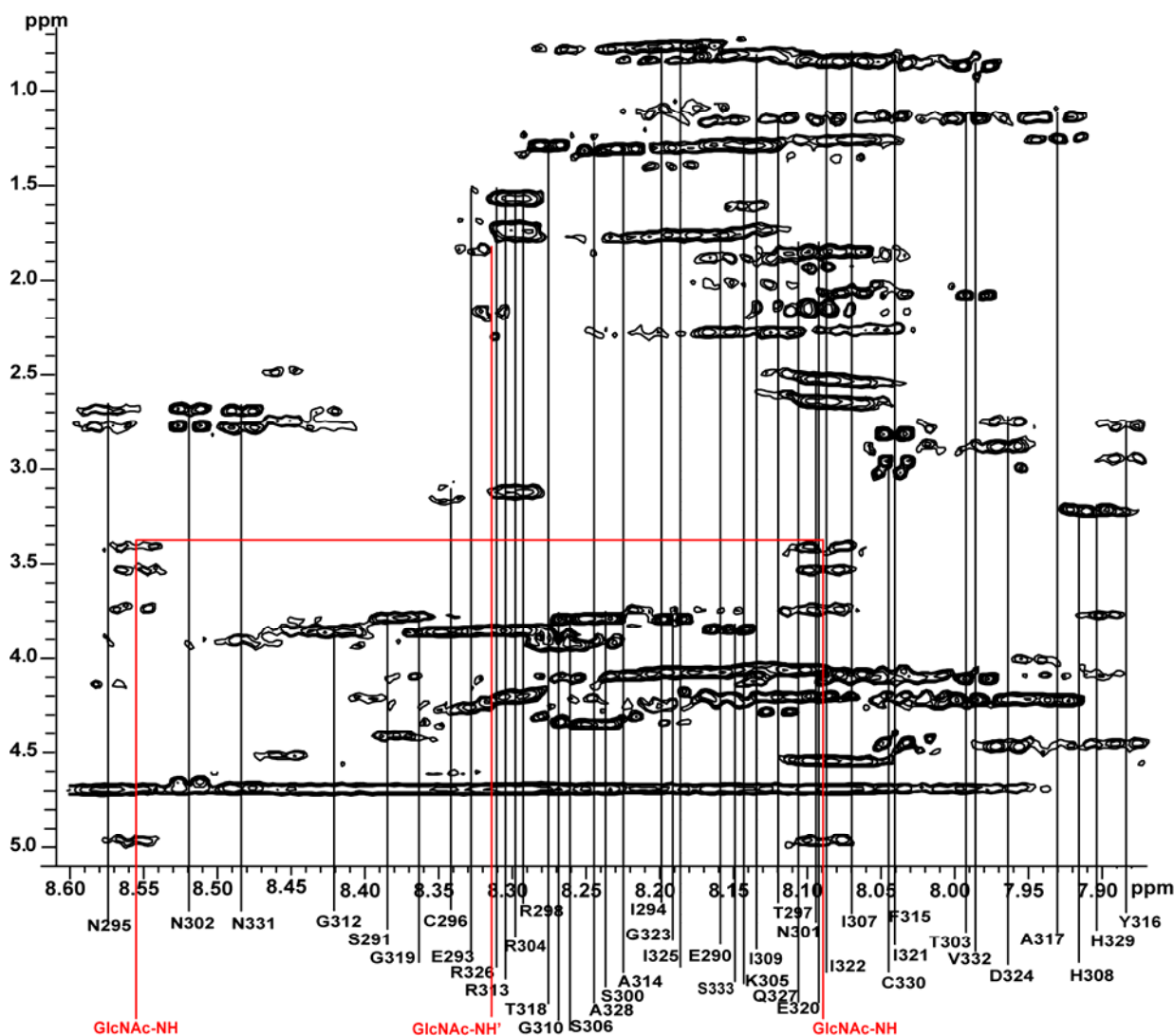


Abbildung 4-30: Ausschnitt aus dem NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des cyclisierten glycosylierten V3-Peptids **14**. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) und pH 3.5.

Es wurden 38 strukturelevante sequentielle NH_i-NH_{i+1} -NOE-Kontakte des cyclischen glycosylierten V3-Peptids **14** identifiziert. Es konnten jedoch nur 7 *long-range* NOE-Kontakte identifiziert werden. Die NOE-Kontakte konnten sowohl zwischen sich gegenüberliegenden Aminosäuren in der cyclischen Loop als auch zwischen dem gebundenen *N*-Acetylglucosamin und der gegenüberliegenden Flanke der V3-Loop beobachtet werden. Die identifizierten Signale scheinen die Beobachtungen aus Abschnitt 4.4.1 zu bestätigen, dass durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen C^{296} und C^{330} eine geordnete Struktur der Loop stabilisiert wird. Es scheint jedoch ein weiterer stabilisierender Effekt von der Glycosylstruktur auszugehen. Dadurch ist es möglich, dass gegenüberliegende Aminosäuren räumlich miteinander interagieren und so die Struktur der Loop beeinflusst wird. Es ist anzumerken, dass sich die 2D-NMR-Spektren der Verbindungen **12** und **14** erheblich

unterscheiden. Auf die Unterschiede der 2D-NMR-Spektren wird in Abschnitt 4.5 eingegangen.

AS	NOE-Kontakte			AS		NOE-Kontakte	
	i+1	i+2	weitere Kontakte		i+1	i+2	weitere Kontakte
Asn ²⁸⁹	-	-	-	Gly ³¹²	-	-	-
Glu ²⁹⁰	Asn ²⁸⁹	-	-	Arg ³¹³	Gly ³¹²	-	-
Ser ²⁹¹	Glu ²⁹⁰	-	-	Ala ³¹⁴	Arg ³¹³	-	Phe ³¹⁵
Val ²⁹²	Ser ²⁹¹	-	-	Phe ³¹⁵	Ala ³¹⁴	-	Tyr ³¹⁶
Glu ²⁹³	Val ²⁹²	Ser ²⁹¹	-	Tyr ³¹⁶	Phe ³¹⁵	-	-
Ile ²⁹⁴	Glu ²⁹³	-	-	Ala ³¹⁷	Tyr ³¹⁶	-	-
Asn ²⁹⁵	Ile ²⁹⁴	-	-	Thr ³¹⁸	Ala ³¹⁷	-	-
Cys ²⁹⁶	Asn ²⁹⁵	-	-	Gly ³¹⁹	Thr ³¹⁸	-	-
Thr ²⁹⁷	Cys ²⁹⁶	-	-	Glu ³²⁰	Gly ³¹⁹	-	-
Arg ²⁹⁸	Thr ²⁹⁷	-	-	Ile ³²¹	Glu ³²⁰	-	-
Pro ²⁹⁹	-	-	-	Ile ³²²	Ile ³²¹	-	Arg ³⁰⁴
Ser ³⁰⁰	-	-	Asn ³⁰¹	Gly ³²³	Ile ³²²	-	-
Asn ³⁰¹	Ser ³⁰⁰	-	-	Asp ³²⁴	Gly ³²³	-	-
Asn ³⁰²	Asn ³⁰¹	-	Thr ³⁰³	Ile ³²⁵	Asp ³²⁴	-	-
Thr ³⁰³	Asn ³⁰²	-	-	Arg ³²⁶	Ile ³²⁵	-	-
Arg ³⁰⁴	Thr ³⁰³	-	-	Gln ³²⁷	Arg ³²⁶	-	-
Lys ³⁰⁵	Arg ³⁰⁴	-	-	Ala ³²⁸	Gln ³²⁷	-	-
Ser ³⁰⁶	Lys ³⁰⁵	-	-	His ³²⁹	Ala ³²⁸	-	-
Ile ³⁰⁷	Ser ³⁰⁶	-	-	Cys ³³⁰	His ³²⁹	-	-
His ³⁰⁸	Ile ³⁰⁷	-	-	Asn ³³¹	Cys ³³⁰	-	-
Ile ³⁰⁹	His ³⁰⁸	-	-	Val ³³²	Asn ³³¹	-	-
Gly ³¹⁰	Ile ³⁰⁹	-	-	Ser ³³³	Val ³³²	-	-
Pro ³¹¹	-	-	-				-
weitere strukturelevante Kontakte							
GlcNAc-1-NH	Asn ³⁰¹						
GlcNAc-1-NH	GlcNAc-1-OCH ₃						
GlcNAc-1'-NH	GlcNAc-1'-OCH ₃						

Tabelle 2: Strukturelevante NOE Kontakte des glycosylierten cyclischen V3-Peptids 14.

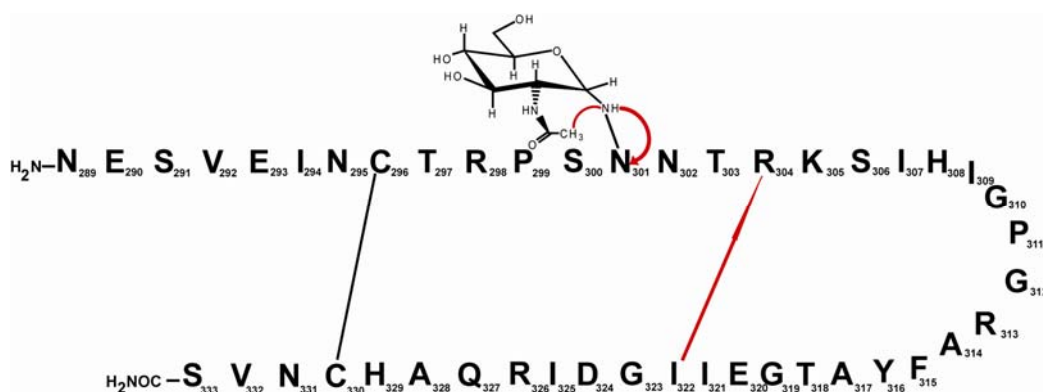


Abbildung 4-31: Schematisierte graphische Übersicht der beobachteten NOE Kontakte des cyclischen glycosylierten V3-Peptids **14**.

4.4.3 Synthese des linearen nicht glycosylierten V3-Peptids **16**; **NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS**

Die Synthese des 33 Aminosäuren umfassenden linearen Peptids **16** wurde in einer Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese durchgeführt.

Es wurde ein Teil des in Abschnitt 4.4.2. synthetisierten 32 Aminosäuren langen Sequenzabschnittes $\text{H}_2\text{N}^{300}\text{NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS}^{333}\text{-COOH}$ verwendet. Da das am Harz befindliche Peptid unter Eiskühlung aufbewahrt worden war, wurde es zunächst mehrfach mit Dichlormethan, Isopropanol und DMF gewaschen um jegliche Feuchtigkeitsspuren zu entfernen. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum wurde das Harz in einer Glasfritte unter Argon bei RT aufbewahrt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes gemäß AAV 7 ergab eine Belegung des Harzes von 8 μmol . Anschließend wurde eine manuelle Peptidkupplung der Aminosäure Asparagin unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Kupplung wurde unter vierfachem Überschuss des Aminosäurederivates Fmoc-Asn(*Trt*)-OH dreimal für je 60 Minuten durchgeführt. Eine Bestimmung der Rohausbeute des Kupplungsschrittes gemäß AAV 2 ergab eine erzielte Ausbeute von 94 % (7.5 μmol).

Das Peptid wurde gemäß AAV 5 von der Festphase abgespalten und die Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Nach Aufreinigung mittels HPLC an einer semipräparativen *RP-C*₁₈ Säule wurde das lineare V3-Peptid **16** erhalten. Die Identifizierung des Produktes **16** (MW = 3595.75 g/mol) erfolgte mittels MALDI-TOF-MS durch einen Massenpeak bei $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3617.3 \text{ m/z}$. Die eindeutige Charakterisierung erfolgte mittels 2D-NMR.

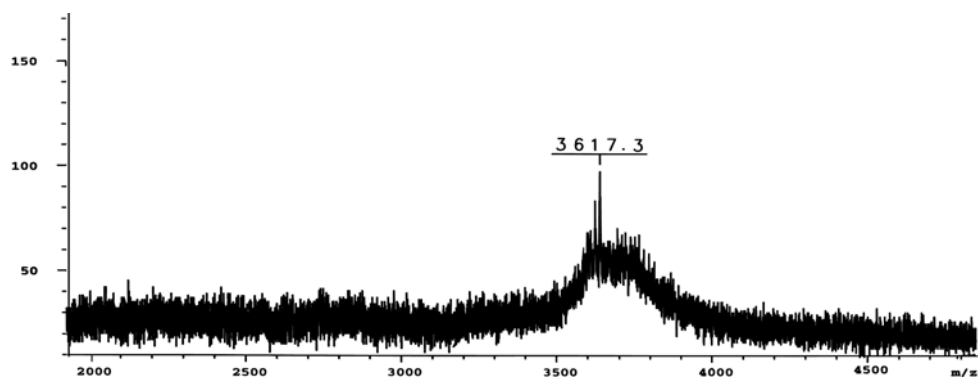


Abbildung 4-32: MALDI-TOF-MS Spektrum des linearen V3-Peptids 16.

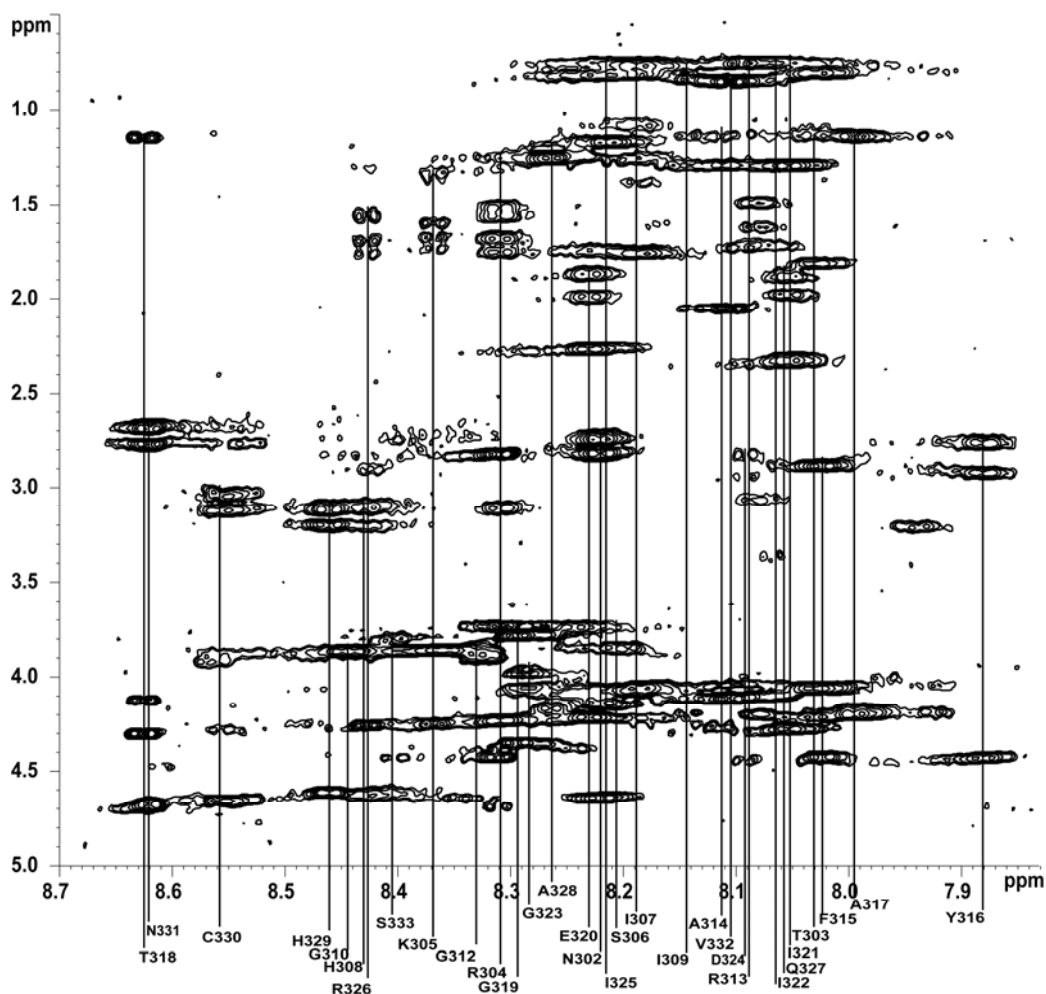


Abbildung 4-33: Ausschnitt aus dem NH-Bereich des TOCSY-Spektrums des linearen, nicht glycosylierten V3-Peptids 16. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) und pH 3.5.

Es wurden 28 sequentielle NH_i-NH_{i+1} -NOE-Kontakte des linearen V3-Peptids 16 identifiziert. Es konnten keine *long-range* NOE-Kontakte identifiziert werden. Da es sich um ein lineares Peptid handelt, das keine strukturgebende Elemente beinhaltet, war dies nicht zu erwarten. Abbildung 4-33 zeigt den Ausschnitt des NH-Bereiches des TOCSY-Spektrums von

Verbindung **16**. Es ist wiederum eine Linienverbreiterung zu erkennen, die vermutlich wiederum durch kolloidale Anlagerung der Peptide aneinander ausgelöst wird. Die NMR-Probe wurde nach den erfolgten NMR-Messungen mittels MALDI-TOF-MS und ESI-MS vermessen um eventuelle Verunreinigungen detektieren zu können. Diese Untersuchungen zeigten jedoch nur das lineare V3-Peptid **16**.

AS	NOE-Kontakte			AS	NOE-Kontakte		
	i+1	i+2	weitere Kontakte		i+1	i+2	weitere Kontakte
Asn ³⁰¹	-	-	-	Thr ³¹⁸	Ala ³¹⁷	-	-
Asn ³⁰²	Asn ³⁰¹	-	-	Gly ³¹⁹	Thr ³¹⁸	-	-
Thr ³⁰³	Asn ³⁰²	-	-	Glu ³²⁰	Gly ³¹⁹	-	-
Arg ³⁰⁴	Thr ³⁰³	-	-	Ile ³²¹	Glu ³²⁰	-	-
Lys ³⁰⁵	Arg ³⁰⁴	-	-	Ile ³²²	Ile ³²¹	-	-
Ser ³⁰⁶	Lys ³⁰⁵	-	-	Gly ³²³	Ile ³²²	-	-
Ile ³⁰⁷	Ser ³⁰⁶	-	-	Asp ³²⁴	Gly ³²³	-	-
His ³⁰⁸	Ile ³⁰⁷	-	-	Ile ³²⁵	Asp ³²⁴	-	-
Ile ³⁰⁹	His ³⁰⁸	-	-	Arg ³²⁶	Ile ³²⁵	-	-
Gly ³¹⁰	Ile ³⁰⁹	-	-	Gln ³²⁷	Arg ³²⁶	-	-
Pro ³¹¹	-	-	-	Ala ³²⁸	Gln ³²⁷	-	-
Gly ³¹²	-	-	-	His ³²⁹	Ala ³²⁸	-	-
Arg ³¹³	Gly ³¹²	-	-	Cys ³³⁰	His ³²⁹	-	-
Ala ³¹⁴	Arg ³¹³	-	-	Asn ³³¹	Cys ³³⁰	-	-
Phe ³¹⁵	Ala ³¹⁴	-	-	Val ³³²	Asn ³³¹	-	-
Tyr ³¹⁶	Phe ³¹⁵	-	-	Ser ³³³	Val ³³²	-	-
Ala ³¹⁷	Tyr ³¹⁶	-	-				

Tabelle 3: Strukturelevante NOE Kontakte des linearen V3-Peptids **16.**

4.4.4 Synthese des linearen glycosylierten V3-Peptids **17**;

(GlcNAc)₂-Man-(Man-GlcNAc-Gal)₂

NNTRKSIHIGPGRAFATGEIIGDIRQAHCNVS

Die Synthese des 33 Aminosäuren umfassenden linearen Glycopeptids **17** wurde durch eine Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese durchgeführt.

Es wurde ein Drittel des in Abschnitt 4.4.2. aufbewahrten Harzes verwendet. An der Festphase befand sich der erste 32 Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitt ${}_{\text{H}_2\text{N}}\text{-}^{302}\text{NTRKSIHIGPGRAFATGEIIGDIRQAHCNVS}^{333}\text{-COOH}$. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes gemäß AAV 7 ergab 11 μmol freier Bindungsstellen an der Festphase. Das Harz wurde getrocknet und unter Argon aufbewahrt. Alle folgenden Schritte wurden in einer Argonatmosphäre durchgeführt. Bezogen auf das vorliegende festphasengebundene Peptid

wurde die manuelle Kupplung mit einem Äquivalent *N*-Glycosylbaustein **11** und 1.25 Äquivalenten TBTU sowie DIPEA vorgenommen. Sowohl der *N*-Acetylglucosaminbaustein **11** als auch der Aktivator TBTU wurde zunächst separat in absolutem DMF gelöst. Der Lösung des TBTU in DMF wurde das DIPEA hinzugegeben und beide Lösungen vereinigt. Dies sollte den Effekt einer Voraktivierung des *N*-Acetylglucosaminbausteins bewirken. Die vereinigte Lösung wurde zum Harz gegeben und das bedeckte Harz für 72 Stunden am Schütteltisch belassen. Die Kupplung wurde ein zweites Mal wiederholt und die Rohausbeute des Kupplungsschrittes gemäß AAV 2 bestimmt. Es ergab sich eine erzielte Ausbeute von 54 % (3.5 μmol).

Das Harz wurde geteilt und eine Hälfte für die Versuche der Kettenverlängerung in Abschnitt 4.4.5 verwahrt. Eine Hälfte des noch am Harz befindlichen Glycopeptids sollte jedoch bereits vom Harz abgespalten werden, um das lineare Glycopeptid untersuchen zu können. Vor der Abspaltung von der Festphase wurde das am *N*-Glycan *O*-acetylierte Glycopeptid für 18 Stunden durch Zugabe von Hydrazinhydrat/Methanol (1:5) *O*-deacetyliert. Anschließend wurde das Peptid gemäß AAV 6 unter Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen von der Festphase abgespalten. Nach destillativer Abtrennung der Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum wurde das Rohprodukt gefriergetrocknet und mittels HPLC an einer semipräparativen *RP*- C_{18} Säule aufgereinigt. Nach Aufreinigung konnte das Produkt **17** (MW = 5264.98 g/mol) mittels MALDI-TOF-MS durch einen Massenpeak bei $[\text{M}]^+ = 5266.6$ m/z identifiziert werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels 2D-NMR.

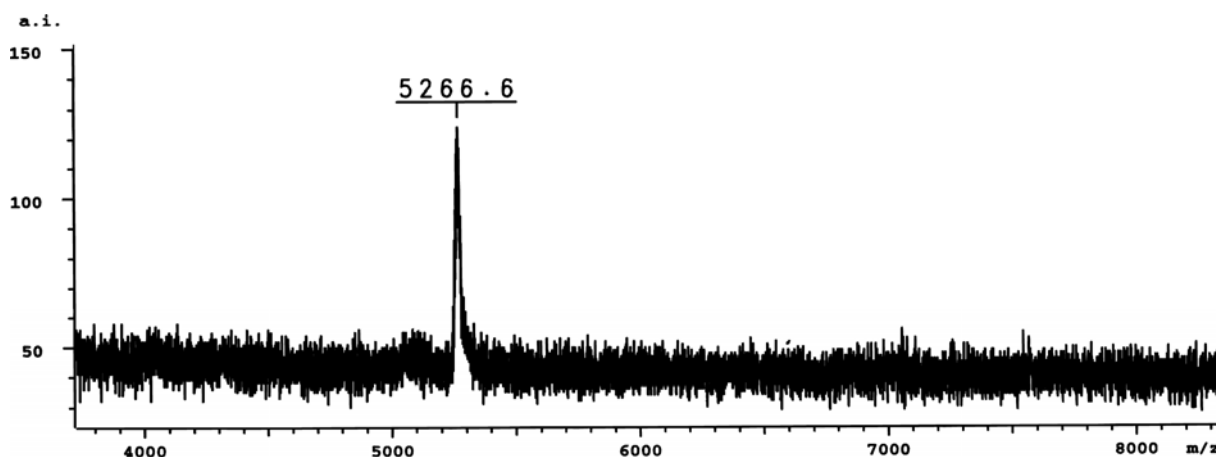


Abbildung 4-34: MALDI-TOF-MS Spektrum des linearen glycosylierten V3-Peptids **17**.

Wie in den vorgehenden Abschnitten zeigt sich eine schlechte Qualität der aufgenommenen 2D-NMR-Spektren, die sich in einer Linienverbreiterung und schlechter Auflösung widerspiegelt. Da Verbindung **17** kein cyclisches Glycopeptid darstellt, wurde zunächst von einer Verunreinigung ausgegangen, die jedoch durch Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS und LC-ESI-MS ausgeschlossen werden konnte. Eine Aufreinigung mittels HPLC zeigte keinerlei Verunreinigungen, eine massenspektrometrische Untersuchung der vermessenen

Probe ebenfalls nur Produkt **17**. Da die V3-Peptide **16** und **17** unter identischen Bedingungen vermessen wurden und den gleichen Reinheitsgrad aufwiesen, wird vermutet, dass die N-terminale Glycosylstruktur Einfluss auf die Bildung von kolloidalen Strukturen hat. In früheren Arbeiten hatte sich in Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen gezeigt, dass glycosylierte V3-Peptide zur kolloidalen Zusammenlagerung neigen. Diese Erkenntnis würde sich mit den aufgetretenen Problemen decken. Zum einen würde eine kolloidale Zusammenlagerung der Glycopeptide eine Linienbreite erklären und zum anderen die aufgetretenen Probleme der Kettenverlängerung in Abschnitt 4.4.5. Die saccharidischen Protonen sind jedoch gut dispergiert und konnten eindeutig identifiziert werden.

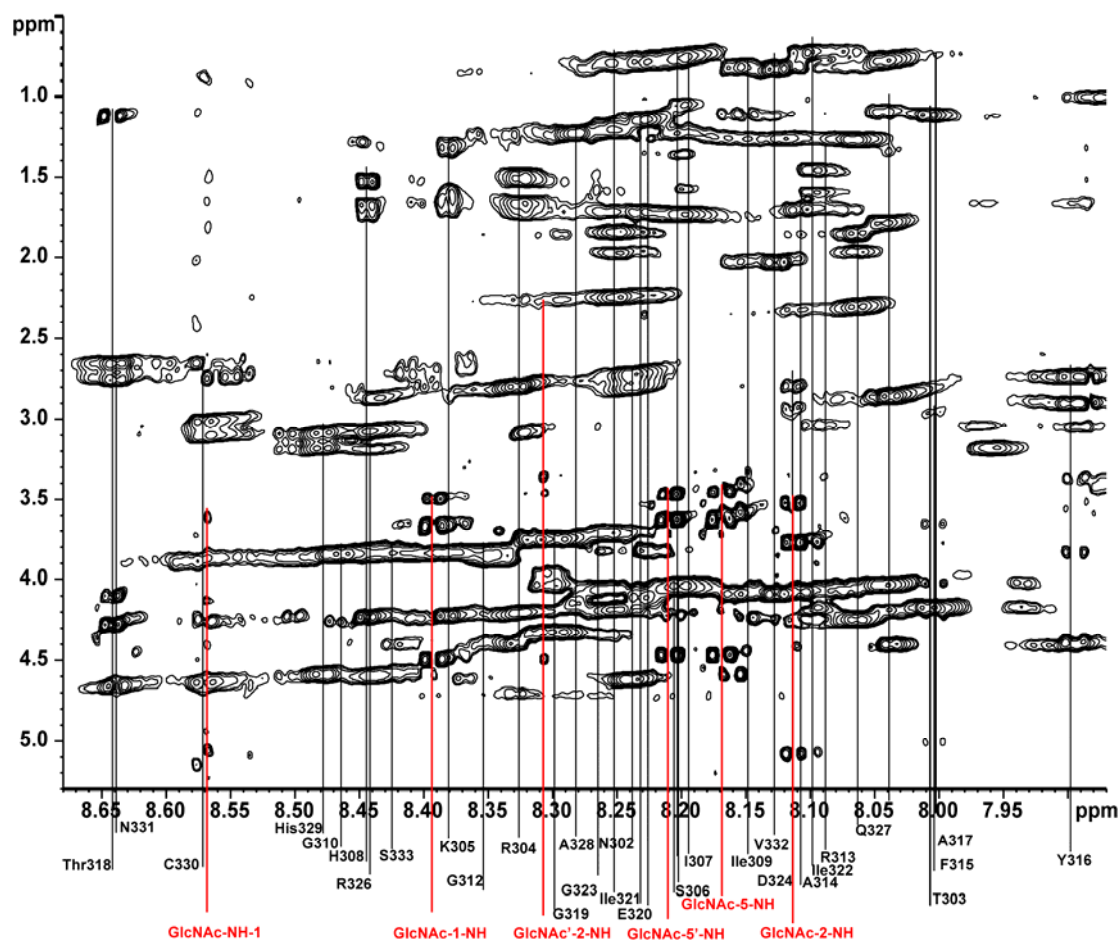


Abbildung 4-35: Ausschnitt des NH-Bereiches des TOCSY-Spektrums des linearen glycosylierten V3-Peptids **17**. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) und pH 3.5.

Es wurden 32 sequentielle NH_i-NH_{i+1} -NOE-Kontakte und zehn *long-range* NOE-Kontakte des glycosylierten linearen V3-Peptids **17** identifiziert. Diese NOE-Kontakte treten zwischen der Saccharidprotonen und den Seitenketten der in der Mitte des Glycopeptids gelegenen Aminosäuren auf. Diese Beobachtungen scheinen zu bestätigen, dass die Nonsaccharideinheit mit den Seitenketten des Peptids interagiert. Da ansonsten keinerlei

long-range NOE-Kontakte beobachtet werden konnten, scheint das Peptid in einer eher zufälligen Konformation vorzuliegen. Dies bedeutet für das Glycopeptid eine flexible Struktur, die jedoch über die Glycosylstruktur in gewissem Maße stabilisiert wird. Auf die Bedeutung dieser Erkenntnisse wird in Abschnitt 4.5 genauer eingegangen.

AS	NOE-Kontakte			AS		NOE-Kontakte	
	i+1	i+2	weitere Kontakte		i+1	i+2	weitere Kontakte
Asn ³⁰¹	-	-	-	Thr ³¹⁸	Ala ³¹⁷	-	-
Asn ³⁰²	Asn ³⁰¹	-	-	Gly ³¹⁹	Thr ³¹⁸	-	-
Thr ³⁰³	Asn ³⁰²	-	-	Glu ³²⁰	Gly ³¹⁹	-	-
Arg ³⁰⁴	Thr ³⁰³	-	-	Ile ³²¹	Glu ³²⁰	-	-
Lys ³⁰⁵	Arg ³⁰⁴	-	-	Ile ³²²	Ile ³²¹	-	-
Ser ³⁰⁶	Lys ³⁰⁵	-	-	Gly ³²³	Ile ³²²	-	-
Ile ³⁰⁷	Ser ³⁰⁶	-	-	Asp ³²⁴	Gly ³²³	-	-
His ³⁰⁸	Ile ³⁰⁷	-	-	Ile ³²⁵	Asp ³²⁴	-	-
Ile ³⁰⁹	His ³⁰⁸	-	-	Arg ³²⁶	Ile ³²⁵	-	-
Gly ³¹⁰	Ile ³⁰⁹	-	-	Gln ³²⁷	Arg ³²⁶	-	-
Pro ³¹¹	-	-	-	Ala ³²⁸	Gln ³²⁷	-	-
Gly ³¹²	-	-	-	His ³²⁹	Ala ³²⁸	-	-
Arg ³¹³	Gly ³¹²	-	-	Cys ³³⁰	His ³²⁹	-	-
Ala ³¹⁴	Arg ³¹³	-	-	Asn ³³¹	Cys ³³⁰	-	-
Phe ³¹⁵	Ala ³¹⁴	-	-	Val ³³²	Asn ³³¹	-	-
Tyr ³¹⁶	Phe ³¹⁵	-	-	Ser ³³³	Val ³³²	-	-
Ala ³¹⁷	Tyr ³¹⁶	-	-				
weitere strukturelevante Kontakte							
GlcNAc-1-MH	Asn ³⁰¹ (β,β')			GlcNAc-5-MH		Arg ³⁰⁴ (β,β')	
GlcNAc-1-MH	Ile ³²⁵ (β)			GlcNAc-5-MH		Glu ³²⁰ (γ,γ')	
GlcNAc-2-MH	Ile ³²⁵ (β)			GlcNAc-5'-MH		Arg ³²⁶ (β,β')	
GlcNAc-2-MH	Ile ³²⁵ (γ')						

Tabelle 4: Strukturelevante NOE Kontakte des linearen glycosylierten V3-Peptids 17

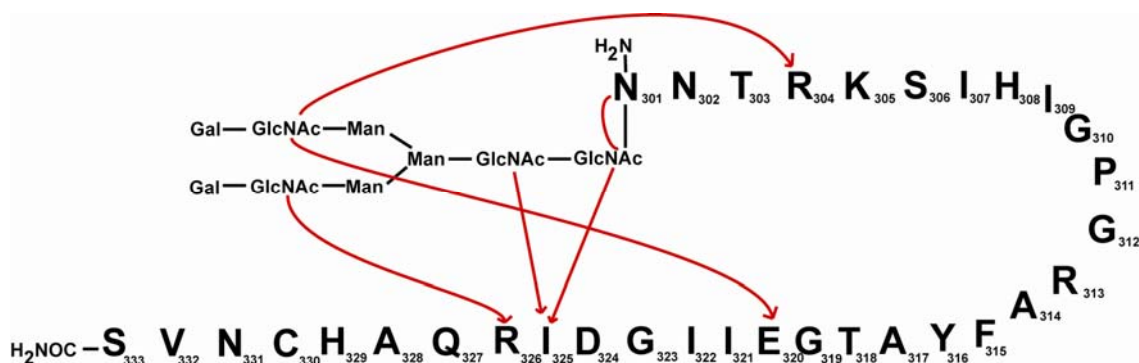


Abbildung 4-36: Schematisierte graphische Übersicht der beobachteten NOE Kontakte des linearen glycosylierten V3-Peptids 17.

4.4.5 Versuche der Peptidkettenverlängerung von Verbindung 17

Die Synthese des 45 Aminosäuren langen cyclischen Glycopeptids mit der *N*-glycosidisch gebundenen Nonasaccharideinheit 5 an Position N³⁰¹ sollte durch eine Kombination aus automatischer und manueller Synthese durchgeführt werden. Da der Einfluss der *N*-Glycosylierung des komplexen Types auf die Struktur der cyclischen V3-Loop untersucht werden sollte, wurden mehrere Versuche der Peptidkettenverlängerung nach der Glycosylierungsstelle an Position N³⁰¹ unternommen.

Der erste Versuch der Kettenverlängerung stellte die Umsetzung des am Harz befindlichen Glycopeptids mit dem Aktivator TBTU und der Fmoc- und seitenkettengeschützten Aminosäure Serin dar. Da Serin eine relativ kleine und sterisch wenig gehinderte Aminosäure ist, wurde zunächst versucht eine Kupplung unter Anwendung der normalen Synthesestrategie durchzuführen. Die Kupplung wurde unter Schutzgasatmosphäre mit absolutierten Lösungsmitteln dreimal durchgeführt. Die eingesetzte Aminosäure und der eingesetzte Aktivator waren getrocknet worden um jegliche Feuchtigkeitsspuren zu entfernen. Die Kupplungszeiten wurden aufgrund der zu erwartenden schwierigen Kupplungen mit je 24 Stunden angesetzt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes gemäß AAV 6 ergab nach der zweiten Kupplung jedoch keinerlei Reaktionsumsatz.

Da der erste Versuch der Kettenverlängerung mit Hilfe des Aktivators TBTU fehlgeschlagen war fiel die Wahl im zweiten Versuch auf den Einsatz des stärkeren Aktivators HATU. HATU bewirkt zwar eine deutlich höhere Aktivierung als TBTU, besitzt jedoch den Nachteil der Bildung zahlreicher Nebenprodukte. Die Kupplung wurde analog zur Umsetzung mit TBTU vorgenommen. Dabei wurde wiederum unter Schutzgasatmosphäre mit absolutierten Lösungsmitteln eine Dreifachkupplung durchgeführt. Die eingesetzte Aminosäure und der eingesetzte Aktivator waren vorher getrocknet worden. Die Kupplungszeiten wurden aufgrund des ersten Versuches mit je 60 Stunden gewählt. Die Bestimmung des Fmoc-Wertes gemäß AAV 6 ergab nach der dritten Kupplung jedoch wiederum keinen Reaktionsumsatz. Die oben angeführten Versuche der Peptidkettenverlängerung wurden zusätzlich noch jeweils

einmal unter der Einwirkung von Mikrowellenenergie durchgeführt. Laut Literatur lassen sich unter Verkürzung der Reaktionszeit höhere Ausbeuten einer Peptidkupplung erzielen.^{170;171}

Diese Variation der Peptidkettenverlängerung erbrachte jedoch wiederum keinen Erfolg.

Die nachfolgenden Versuche der Peptidkettenverlängerung wurden mit Hilfe voraktivierter Fmoc-geschützter Aminosäurederivate vorgenommen. Die Carboxylfunktion der Aminosäure wird dabei als α -Aktivester voraktiviert. Die Umsetzungen mit α -Aminosäureaktivestern der OPfp- und ODhbt-Klasse haben laut Literatur den Vorteil in sterisch ungünstigen Kupplungen eine höhere Ausbeute als Peptidverknüpfungen mit Aktivatoren wie z.B. TBTU erzielen zu können.¹²⁸ Der Nachteil der OPfp- und ODhbt-aktivierten Aminosäuren besteht in ihrer Instabilität über längere Zeiträume und ihre große Anfälligkeit gegenüber Feuchtigkeitseinfluss. Die nachfolgend erwähnten OPfp- und ODhbt-Aktivester der eingesetzten Aminosäure Serin wurden daher frisch hergestellt und mittels ¹H-NMR charakterisiert, um ihre Qualität zu gewährleisten.

Ein weiterer Versuch der Peptidkettenverlängerung wurde mit Hilfe des Pentafluorphenolesters der Aminosäure Serin durchgeführt (Abbildung 2-3). Dabei wurden der in DMF gelöste α -Aktivester der Aminosäure unter Zugabe von DCC zu dem am Harz befindlichen Glycopeptid gegeben und für 4 Stunden gekuppelt. Obwohl die typisch gelbe Verfärbung die den Start der Kupplungsreaktion optisch anzeigt, beobachtet werden konnte, wurde nach einer zweiten durchgeführten Kupplung kein Reaktionsumsatz detektiert.

Der folgende Versuch der Peptidkettenverlängerung wurde mit Hilfe des frisch hergestellten ODhbt-Aktivesters der Aminosäure Serin durchgeführt (Abbildung 2-3). Hierbei wurde analog der Kupplung mit dem OPfp-Aktivester verfahren. Es konnte wiederum keine Kupplungsausbeute festgestellt werden.

Aufgrund der fehlgeschlagenen Versuche der Peptidkettenverlängerung wurde erneut die Idee der Mikrowellen unterstützten Peptidkupplung aufgegriffen. In einer durchgeführten Testsynthese mit kommerziell erhältlichen Aktivestern wurde erfolgreich ein Peptid mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-}^{289}\text{NESVEINCTRPS}^{300}\text{-COOH}$ mit einer Ausbeute von 98 % synthetisiert. Da das synthetisierte Peptid dem noch zu kuppelnden Syntheseabschnitt entsprach, wurde aus dieser Synthese eine Synthesestrategie für den Versuch der mikrowellenunterstützten Kupplung des am Harz befindlichen Glycopeptids und dem Aktivester der Aminosäure Serin abgeleitet. Dabei wurde gemäß des Kupplungsprotokolls der Testsequenz verfahren. Es konnte jedoch wiederum kein Umsatz bzw. keine Kettenverlängerung festgestellt werden.

Aufgrund der Vielzahl fehlgeschlagener Kupplungsversuche wird vermutet, dass sterische Gründe eine Ankupplung der nächsten Aminosäure behindern. Eine eventuelle Faltung am Harz könnte eine Anknüpfung der folgenden Aminosäure nach der Glycosylierungsstelle verhindern. Die Daten des linearen glycosylierten V3-Peptids **17** scheinen daraufhinzuweisen, dass sich die sehr voluminöse Glycosylstruktur über die terminale Aminofunktion des *N*-glycosidisch gebundenen Asparaginrestes legt. Die Aminofunktion würde so nur sehr schwierig oder überhaupt nicht für die folgenden Kupplungen zur Verfügung stehen.

Um die vorliegenden Probleme zu lösen könnte der Einsatz von *N*-Pyrilidon Abhilfe schaffen, da es eine Faltung von Peptiden am Harz unterdrückt. Auf diesem Wege konnte eine Abschirmung der terminalen Aminofunktion durch das *N*-Glycan eventuell verhindert werden. Um die erfolgreiche Synthese einer cyclischen V3-Loop mit dem *N*-glycosidisch gebundenen Oligosaccharid **5** gewährleisten zu können sollten auch völlig andere Wege gegangen werden. So wäre das betreffende Glycopeptid eventuell auch über den Syntheseweg der konvergenten Synthese oder aber der Blocksynthese zugänglich. Man könnte auch den Einsatz neuer Reagenzien überlegen, indem man beispielsweise einen Baustein aus dem betreffenden Asparagin und zwei oder drei bereits angehängten Aminosäuren synthetisiert. Nach dem Einbau in die Peptidkette wäre so bereits eine Kettenverlängerung erreicht. Man könnte ebenfalls über den Einsatz von Pseudoprolinderivaten nachdenken, um diese schwierige Kupplung durchführen zu können.

Die nicht erfolgreich durchgeführte Peptidkettenverlängerung deckt sich mit früheren Arbeiten, die immer eine deutliche Verschlechterung der Kupplungsausbeuten nach Glycosylierungsstellen beobachten konnten.^{154;156} Da bereits kleinere *N*-glycosidisch gebundene Saccharrideinheiten in der Peptidkette am Harz die Ausbeute deutlich verschlechtern, liegt der Schluss nahe, dass die *N*-terminal vorhandene voluminöse Oligosaccharidstruktur eine Peptidkupplung vollständig verhindern kann.

4.5 NMR-spektroskopische und konformative Untersuchungen der synthetischen V3-Peptide- und Glycopeptide

Eine Abschätzung des Einflusses der Glycosylierung und der Disulfidbrücke auf die Struktur der dargestellten Peptide kann durch einen Vergleich der TOCSY-Spektren erreicht werden. Da die ¹H-NMR chemischen Verschiebungen im TOCSY-Spektrum von der jeweiligen Sekundärstruktur beeinflusst werden, liefert ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen einen Einblick inwieweit Glycosylierung und Cyclisierung der V3-Loop Einfluss auf die Struktur besitzen. Alle Messungen wurden mit einem identischen Lösungsmittelgemischansatz (H₂O/D₂O, 9:1, pH = 3.5), bei gleicher Temperatur (T = 300 K) und identischen Pulsprogrammen vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind ebenfalls hilfreich in der Abschätzung der SPR-Bindungsstudien in Abschnitt 4.6.

4.5.1 NMR-spektroskopischer Vergleich des cyclischen V3-Peptids **12** und des cyclischen glycosylierten V3-Peptids **14**

Ein Vergleich der ¹H-NMR chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des cyclischen V3-Peptids **12** und des cyclischen Glycopeptids **14** liefert glycosylierungsbedingte Änderungen in der 3D-Struktur. Abbildung 4-33 zeigt die übereinander gelegten NH-Bereiche der TOCSY-Spektren des cyclischen Peptids **12** und des cyclischen Glycopeptids **14**, was einen direkten Vergleich beider Verbindungen ermöglicht. Die Kalibrierung beider Spektren

erfolgte auf das NH-Signal des Tyrosins an Position 316 innerhalb der Loop. Tyr³¹⁶ wurde ausgewählt, um auch die nachfolgenden Spektren untereinander vergleichen zu können. Die betreffenden Signale liegen in jedem Spektrum gut erkennbar und dispergiert vor.

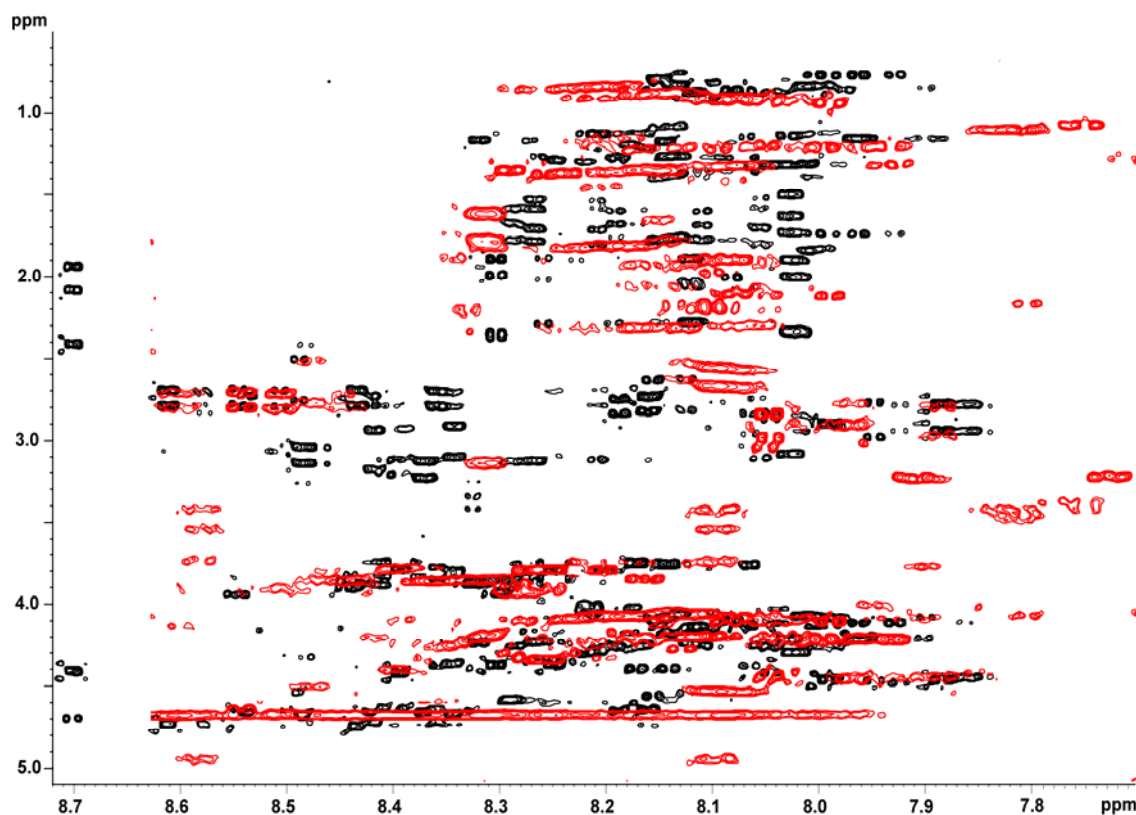


Abbildung 4-37: Ausschnitte der TOCSY-Spektren des cyclischen Peptids 12 (schwarz) und des cyclischen glycosylierten Peptids 14 (rot). Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) und pH 3.5.

Beide Spektren unterscheiden sich erheblich. Die Beeinflussung der Struktur cyclischer V3-Peptide durch die relativ kleine *N*-glycosidisch gebundene Saccharideinheit 2-Acetamido-2-desoxy-**D**-glucosamin konnte bereits in einer früheren Arbeit nachgewiesen werden.¹⁵⁶

Eine nähere Betrachtung der Veränderungen in den chemischen Verschiebungen zeigt, dass eine zu erwartende große Veränderung im Bereich der Glycosylierungsstelle am Asparagin an der Position 301 innerhalb der Loop auftritt. Die Änderung der chemischen Verschiebung von -0.0954 stellt eine auffällige Änderung der chemischen Verschiebung dar. Threonin 303, Arginin 304 und Lysin 305, die auf die Glycosylierungsstelle folgen, zeigen ebenfalls eine starke Änderung ihrer chemischen Verschiebung von -0.2626, 0.2428 und 0.1515 ppm. In Abschnitt 4.4.1 konnte gezeigt werden, dass Arginin 304 einen *long-range* NOE-Kontakt zum gegenüberliegenden Aspartat an Position 324 aufbaut, wodurch die chemische Verschiebung des betreffenden Aspartats ebenfalls um -0.1934 ppm verschoben ist. Eine gegenseitige Beeinflussung beider Aminosäuren, die sich in der V3-Loop direkt gegenüberliegen scheint hier der Fall zu sein. Gleiches gilt für Isoleucin 321 und Lysin 305, obwohl kein

entsprechender NOE-Kontakt zugeordnet werden konnte. Diese Aminosäuren liegen sich jedoch ebenfalls gegenüber. Generell kann die Aussage getroffen werden, dass sich alle chemischen Verschiebungen durch die Glycosylierung ändern.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Asn ²⁸⁹	-	Arg ²⁹⁸	0.0827	Ile ³⁰⁷	0.1080	Tyr ³¹⁶	0	Ile ³²⁵	0.1813
Glu ²⁹⁰	-0.5730	Pro ²⁹⁹	-	His ³⁰⁸	-0.5690	Ala ³¹⁷	-0.1147	Arg ³²⁶	0.0508
Ser ²⁹¹	-0.0070	Ser ³⁰⁰	0.0977	Ile ³⁰⁹	0.0779	Thr ³¹⁸	-0.0455	Gln ³²⁷	0.0674
Val ²⁹²	-0.2761	Asn ³⁰¹	0.0954	Gly ³¹⁰	0.0780	Gly ³¹⁹	-0.0820	Ala ³²⁸	0.0389
Glu ²⁹³	0.0234	Asn ³⁰²	-0.0186	Pro ³¹¹	-	Glu ³²⁰	-0.0285	His ³²⁹	-0.4676
Ile ²⁹⁴	0.0625	Thr ³⁰³	-0.2626	Gly ³¹²	0.0612	Ile ³²¹	-0.1085	Cys ³³⁰	-0.2990
Asn ²⁹⁵	0.1418	Arg ³⁰⁴	0.2428	Arg ³¹³	0.2741	Ile ³²²	-0.0519	Asn ³³¹	-0.0930
Cys ²⁹⁶	-0.0744	Lys ³⁰⁵	0.1515	Ala ³¹⁴	-0.0488	Gly ³²³	-0.1126	Val ³³²	0.0556
Thr ²⁹⁷	-0.1006	Ser ³⁰⁶	0.0873	Phe ³¹⁵	-0.0057	Asp ³²⁴	-0.1934	Ser ³³³	0.0814

Tabelle 5: Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des cyclischen V3-Peptids 12 und des cyclischen glycosylierten V3-Peptids 14. Auffällige Differenzen sind rot hervorgehoben.

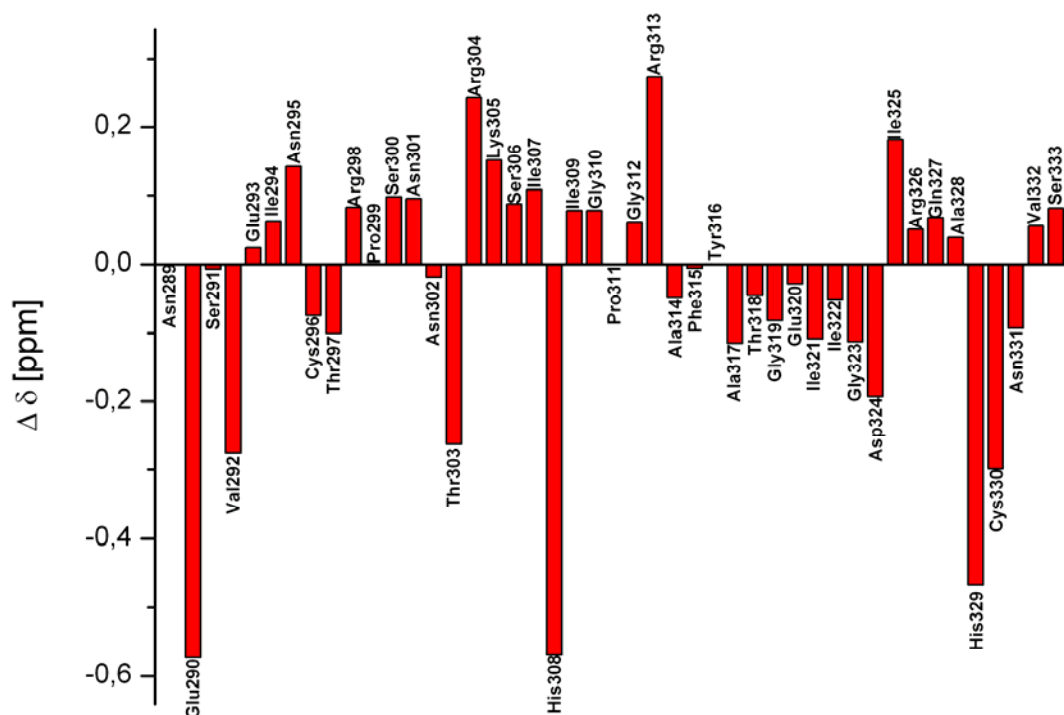


Abbildung 4-38: Graphische Übersicht der Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des cyclischen V3-Peptids 12 und des cyclischen glycosylierten V3-Peptids 14.

Das an Position 313 innerhalb der Loop vorliegende Arginin fällt in diesem Zusammenhang besonders auf, da es den größten *shift* von 0.2741 ppm aufweist und im GPGRAF Motif vorliegt. Diese Änderung könnte in Zusammenhang mit der Änderung der chemischen Verschiebung des Histidins an Position 308 als Indiz für eine räumliche Umlagerung des Peptidrückrades angesehen werden. Der *shift* von -0.1934 ppm des Aspartats an Position 324 ist zusätzlich zu den oben getroffenen Aussagen auffällig, da diese Aminosäure der Glycosylierungsstelle gegenüberliegt. Da das benachbarte Isoleucin 325 ebenfalls einen *shift* von 0.1813 ppm aufweist kann dies als Indiz angesehen werden, dass die glycosydisch gebundene *N*-Acetylglucosamineinheit an Position 301 über die V3-Loop reicht und mit der gegenüberliegenden Seite interagiert. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Erkenntnissen.¹⁵⁶ Die benachbarte Aminosäure Arginin an Position 326 weist einen geringeren *shift* von 0.0260 ppm auf. Diese Aminosäure steht im Verdacht außerordentlich hohe Bedeutung für die Bindungseigenschaften der V3-Loop zu haben.¹⁷²

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren E²⁹⁰ bis N²⁹⁵, die eine N-terminale Verlängerung der loop sind ebenfalls auffallend verändert. Da es sich jedoch um ein flexibles Element handelt, das vor dem strukturgebenden Element der Disulfidbrücke liegt, sind diese Änderungen als Folge der flexiblen Konformation anzusehen. Eine Untersuchung der strukturellen NOE-Kontakte in Abschnitt 4.4.1 zeigte darüber hinaus keinerlei relevanten Raumkontakte dieses flexiblen Elementes zur eigentlichen V3-Loop.

Generell weisen die vorliegenden Daten der Änderungen der chemischen Verschiebungen auf eine deutlich geänderte Konformation des cyclischen Glycopeptids **14** gegenüber dem cyclischen Peptid **12** hin. Da insbesondere sich gegenüberliegende Aminosäuren innerhalb der Loop einen auffälligen *shift* in ihren chemischen Verschiebungen aufweisen, wird vermutet, dass bereits die Wechselwirkung der relativ kleinen Glycosyleinheit auf die gegenüberliegende Seite der Loop reicht. Diese Annahme wird durch die zahlreichen in Abschnitt 4.4.1 beobachteten *longe-range* NOE-Kontakte gestützt, die auf eine räumliche Nähe beider Flanken der V3-Loop hinweisen. Der in früheren Arbeiten beobachtete stabilisierende Effekt einer Glycosyleinheit innerhalb der Loop scheint damit bestätigt worden zu sein.^{154;155}

Der Einfluss der Glycosylstruktur auf die gesamte Konformation des Glycopeptids könnte ebenfalls eine Erklärung für die schlechte synthetische Zugänglichkeit des cyclischen Glycopeptids **14** sein. Die Synthese erwies sich in der Vergangenheit als außerordentlich schwierig und musste mehrfach durchgeführt werden, um zum Erfolg zu gelangen. Die dabei erzielte Ausbeute der Cyclisierung lag nur bei 10 % der Ausbeute der nicht glycosylierten Verbindung. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die Glycosylstruktur die Bildung einer Disulfidbrücke unter den gewählten Reaktionsbedingungen durch sterische oder elektrostatische Einflüsse unterdrückt.

4.5.2 NMR-spektroskopischer Vergleich der linearen V3-Peptids **16** und des linearen glycosylierten V3-Peptids **17**

Die vergleichende Betrachtung der TOCSY-Spektren des linearen Peptids **16** und des linearen glycosylierten Peptids **17** zeigt erwartungsgemäß nur geringe Unterschiede in den chemischen Verschiebungen. Abschnitt 4.5.1 und frühere Arbeiten belegen, dass der Einfluss einer *N*-glycosidisch gebundenen Saccharideinheit den stärksten Einfluss auf cyclische V3-Peptide aufweist.¹⁵⁴ Es liegt auf der Hand, dass die dreidimensionale Struktur des relativ flexiblen offenkettigen Peptids nicht oder nur gering durch eine *N*-glycosidisch gebundene Saccharideinheit beeinflusst werden kann. In cyclischen V3-Peptiden liegt im Gegensatz dazu eher eine starre Konformation des Peptidrückgrades vor, in der sich zusätzlich die beiden Flanken der V3-Loop in relativ dichter räumlicher Nähe zueinander befinden. Es konnten jedoch im NOESY-Spektrum des linearen V3-Glycopeptids **17** NOE-Kontakte der Saccharidprotonen zu den Aminosäuren in der Mitte der Sequenz identifiziert werden. Diese Kontakte scheinen jedoch nur darauf hinzudeuten, dass eine räumliche Nähe der Nonasaccharidprotonen und zu entsprechenden Aminosäureseitenketten besteht. Diese räumliche Nähe kann durch den Raumbedarf der Oligosaccharideinheit erklärt werden. Die Struktur des Peptidrückgrades scheint dadurch jedoch nicht oder nur minimal beeinflusst zu werden. Abbildung 4-34 zeigt die übereinandergelegten TOCSY-Spektren der Verbindungen **16** und **17**.

Erwartungsgemäß zeigt sich die deutlichste Änderung der chemischen Verschiebung im Bereich der Glycosylierungsstelle. Dies betrifft insbesondere Asn 302, das der Glycosylierungsstelle benachbart ist. Asn 301 ist durch seine N-terminalen Lage aufgrund von Austauschprozessen in der betreffenden Region nicht sichtbar. Die Änderung der Verschiebung von Asn³⁰² um 0.037 ppm, kann jedoch ebenfalls als Hinweis angesehen werden, dass die Glycosylstruktur den N-terminalen Bereich des Glycopeptids beeinflusst. Dies wird durch den *shift* des Threonins an Position 303 unterstützt. Es auffällig, dass die Arginine an den Positionen 304, 313 und 326 einen kleinen *shift* in ihren chemischen Verschiebungen aufweisen. Da Arginin eine Aminosäure mit einer großen Seitenkette darstellt, wird vermutet dass diese Änderung durch eine Wechselwirkung mit der glycosidischen Struktur verursacht wird. Diese Vermutung wird durch die Änderungen der chemischen Verschiebung des Threonins an Position 303 und des Lysins an Position 305 ebenfalls gestützt. Offensichtlich scheint die große N-terminal vorliegende Saccharideinheit die Verschiebungen von Aminosäuren mit langen Seitenketten zu beeinflussen. Da im betreffenden NOE-Spektrum des Glycopeptids jedoch keine diesbezüglichen Kontakte identifiziert werden konnten, wird von einer sterischen Beeinflussung ausgegangen. Durch den großen Platzbedarf des Nonasaccharids ist dies denkbar.

Es kann die Aussage getroffen werden, dass sich die Konformation des Peptids **16** und des Glycopeptids **17** nicht bzw. nur gering voneinander unterscheiden.

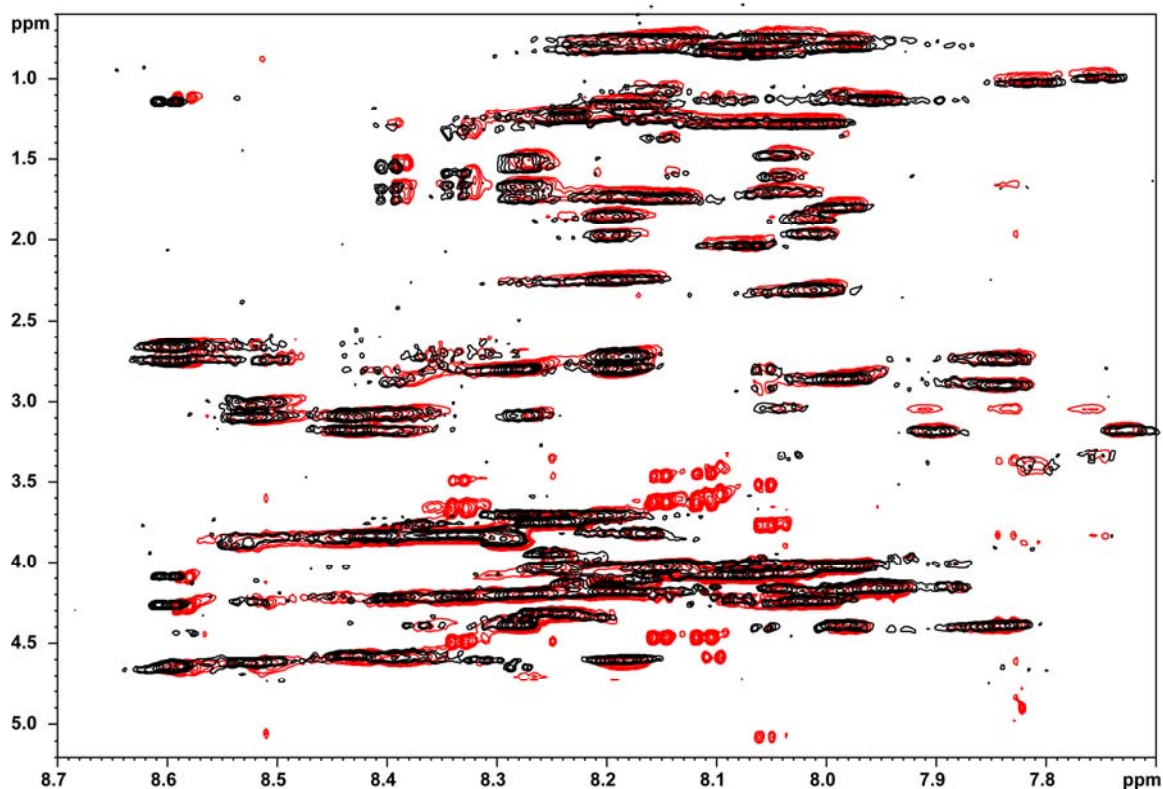


Abbildung 4-39: Ausschnitte der TOCSY-Spektren des linearen Peptids 16 (schwarz) und des linearen glycosylierten Peptids 17 (rot). Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) und pH 3.5).

Die beobachteten differentiellen Änderungen sind wie erwartet nur minimal und stellen einen deutlichen Unterschied zum Vergleich der beiden cyclischen Verbindungen 12 und 14 dar.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Asn ³⁰¹	-	His ³⁰⁸	0.0011	Phe ³¹⁵	0.0020	Ile ³²²	0.0022	His ³²⁹	0.0007
Asn ³⁰²	-0.0370	Ile ³⁰⁹	-0.0055	Tyr ³¹⁶	0	Gly ³²³	0.0091	Cys ³³⁰	0.0024
Thr ³⁰³	0.0365	Gly ³¹⁰	0.0024	Ala ³¹⁷	0.0023	Asp ³²⁴	-0.0061	Asn ³³¹	0.0125
Arg ³⁰⁴	0.0017	Pro ³¹¹	-	Thr ³¹⁸	0.0028	Ile ³²⁵	0.0011	Val ³³²	0.0012
Lys ³⁰⁵	0.0016	Gly ³¹²	-0.0025	Gly ³¹⁹	0.0025	Arg ³²⁶	-0.0016	Ser ³³³	-0.0054
Ser ³⁰⁶	0.0042	Arg ³¹³	-0.0213	Glu ³²⁰	-0.0033	Gln ³²⁷	0.0014		
Ile ³⁰⁷	0.0034	Ala ³¹⁴	-0.0069	Ile ³²¹	0.0017	Ala ³²⁸	-0.0014		

Tabelle 6: Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des linearen V3-Peptids 16 und des linearen glycosylierten V3-Peptids 17. Auffällige Differenzen sind rot hervorgehoben.

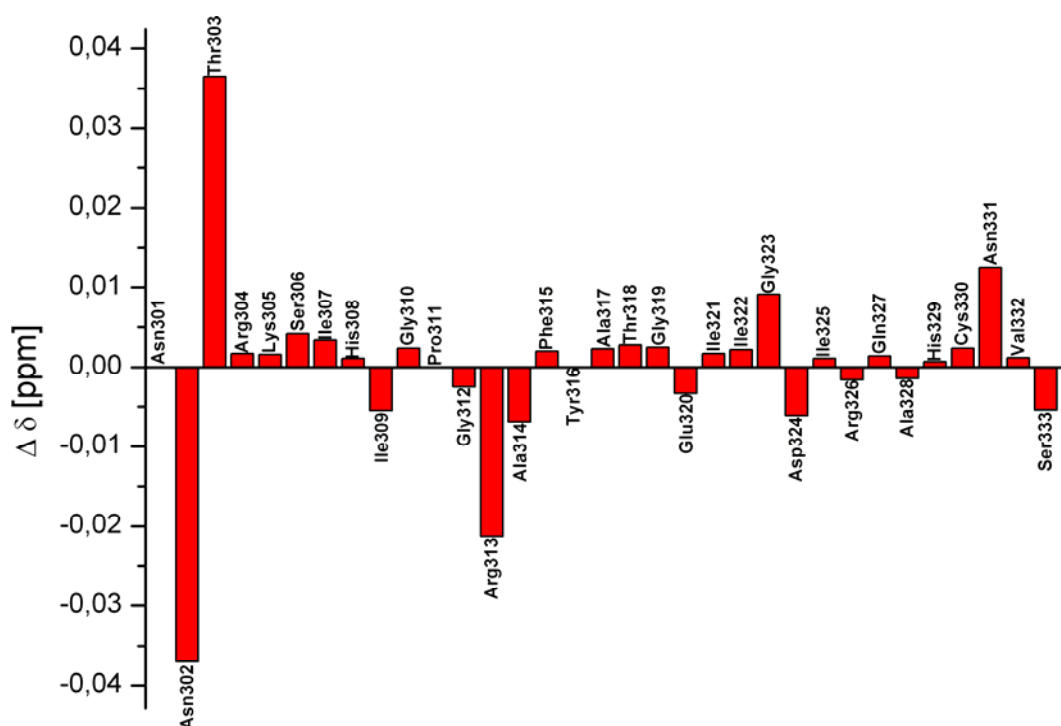


Abbildung 4-40: Graphische Übersicht der Differenzen der ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des linearen V3-Peptids **16** und des linearen glycosylierten V3-Peptids **17**.

4.5.3 NMR-spektroskopischer Vergleich des cyclischen V3-Peptids **12** und des linearen Peptids **16**

Eine vergleichende Betrachtung der ^1H -NMR chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des linearen V3-Peptids **16** und des cyclischen V3-Peptids **12** zeigt interessante Unterschiede der chemischen Verschiebungen auf. Dieser Vergleich wurde vorgenommen, um die Beeinflussung der verbrückenden Disulfidbrücke des cyclischen Peptids **12** auf die räumliche Struktur treffen zu können.

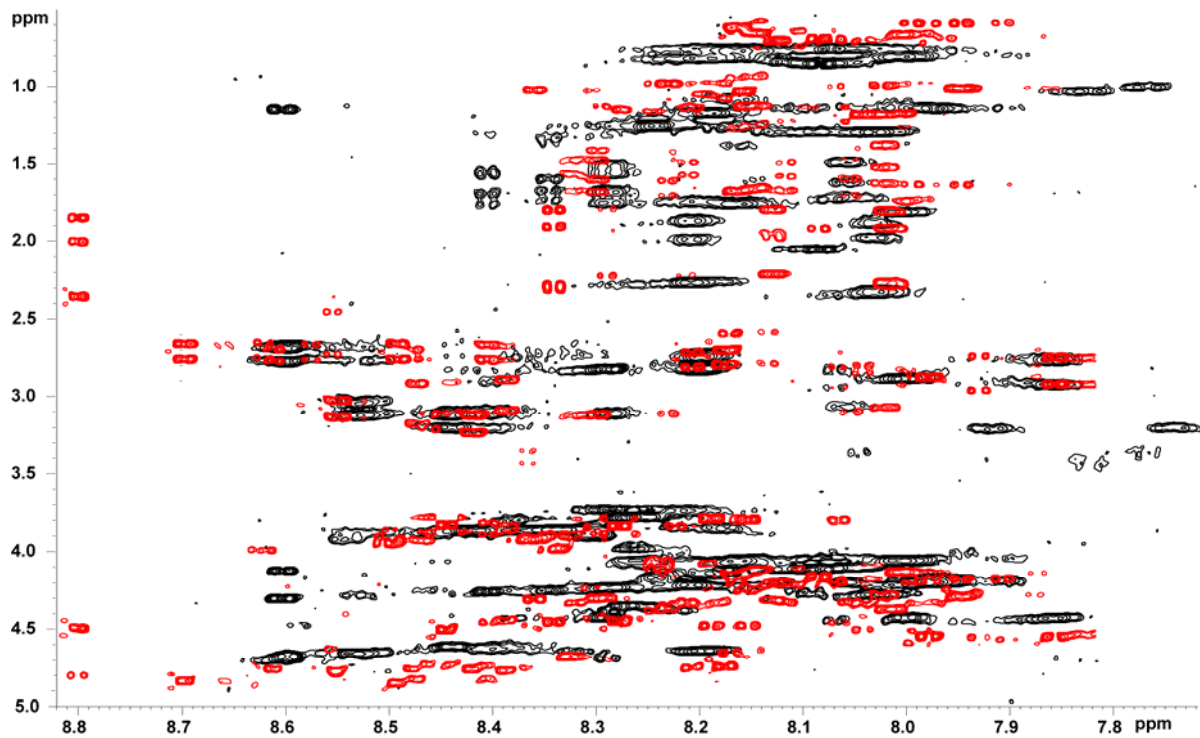


Abbildung 4-41: Ausschnitte der TOCSY-Spektren des linearen Peptids **16** (schwarz) und des cyclischen Peptids **12** (rot). Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) und pH 3.5.

Abbildung 4-41 zeigt deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der beiden unglycosylierten Peptide **12** und **16**. Es ist deutlich erkennbar, dass Peptid **16** eine um 12 Aminosäuren kürzere Sequenz aufweist als das cyclische Peptid **12**. Durch die deutlich kürzere Sequenz des linearen Peptids **16** und der fehlenden Disulfidbrücke kann der Vergleich jedoch nur als qualitativ angesehen werden. Die stärkste Veränderung der chemischen Verschiebungen zeigt die Aminosäure Lysin an Position 305. Da diese Aminosäure im cyclischen Peptid einen *long-range* NOE-Kontakt auf die gegenüberliegende Seite der Loop zeigt, wird davon ausgegangen, dass sich die chemische Verschiebung durch die Abwesenheit des Interaktionspartners verändert.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Asn ²⁸⁹	-	Arg ²⁹⁸	-	Ile ³⁰⁷	0.2261	Tyr ³¹⁶	0	Ile ³²⁵	0.2113
Glu ²⁹⁰	-	Pro ²⁹⁹	-	His ³⁰⁸	-0.0562	Ala ³¹⁷	-0.0497	Arg ³²⁶	0.1628
Ser ²⁹¹	-	Ser ³⁰⁰	-	Ile ³⁰⁹	0.0875	Thr ³¹⁸	0.3077	Gln ³²⁷	0.0245
Val ²⁹²	-	Asn ³⁰¹	-	Gly ³¹⁰	0.0254	Gly ³¹⁹	-0.1493	Ala ³²⁸	0.0596
Glu ²⁹³	-	Asn ³⁰²	-0.3155	Pro ³¹¹	-	Glu ³²⁰	0.1131	His ³²⁹	0.0939
Ile ²⁹⁴	-	Thr ³⁰³	-0.2173	Gly ³¹²	0.0003	Ile ³²¹	-0.0945	Cys ³³⁰	0.2168
Asn ²⁹⁵	-	Arg ³⁰⁴	0.2609	Arg ³¹³	0.0338	Ile ³²²	-0.0700	Asn ³³¹	0.0258
Cys ²⁹⁶	-	Lys ³⁰⁵	0.3803	Ala ³¹⁴	-0.1559	Gly ³²³	0.0040	Val ³³²	0.1914
Thr ²⁹⁷	-	Ser ³⁰⁶	0.0377	Phe ³¹⁵	-0.0201	Asp ³²⁴	-0.0658	Ser ³³³	0.3409

Tabelle 7: Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des cyclischen V3-Peptids 12 und des linearen V3-Peptids 16.

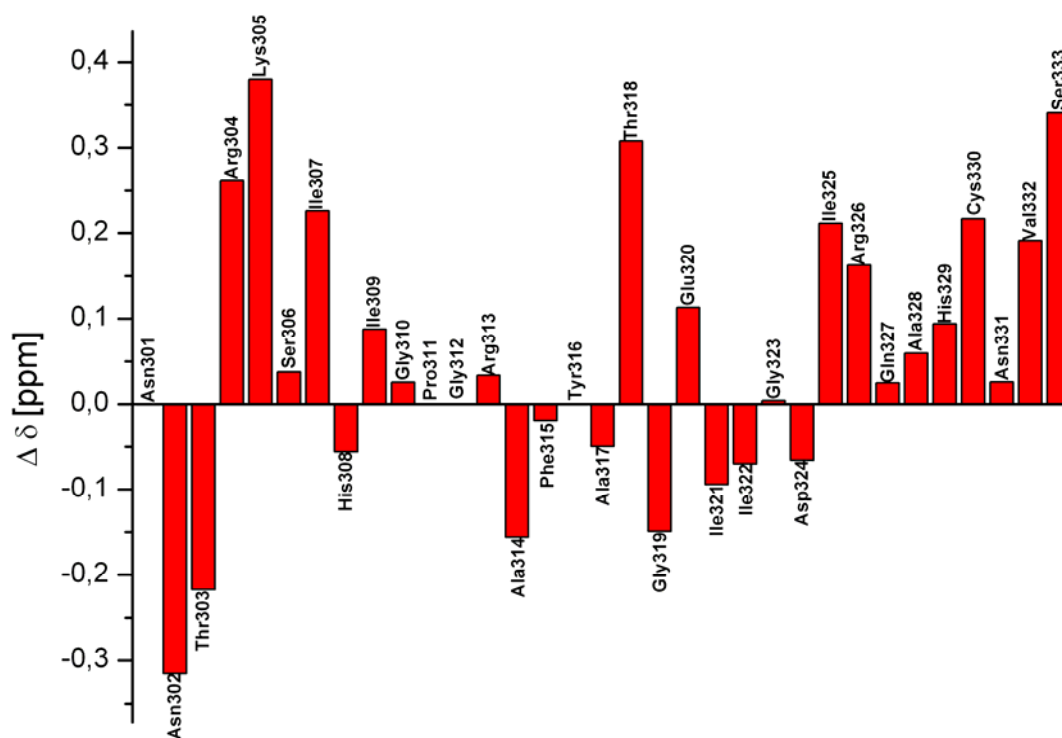


Abbildung 4-42: Graphische Übersicht der Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des cyclischen V3-Peptids 12 und des linearen V3-Peptids 16.

Generell treten im Bereich der Aminosäuren mit langen Seitenketten Änderungen in den chemischen Verschiebungen auf. Insbesondere Arginin, Lysin, Glutamin und Isoleucin zeigen

auffällige Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen von bis zu 0.3803 ppm. Alle diese Aminosäuren zeigen relevante *shifts* in ihren chemischen Verschiebungen, die sich durch die im cyclischen Peptid vorhandene konformationell geordnetere Struktur erklären lassen. Die geordnetere Struktur wird durch das strukturgebende Element der Disulfidbrücke zwischen den beiden in der Sequenz vorliegenden Cysteinen hervorgerufen und stabilisiert. Die Auswertung der NOE-Kontakte in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 zeigen, dass im cyclischen Peptid **12** *long-range* NOE-Kontakte über die Loop hinweg auf die gegenüberliegende Seite stattfinden. Die vorliegende Disulfidbrücke scheint ebenfalls dafür verantwortlich zu sein, dass die einzelnen Spuren der Aminosäuren dichter zusammenliegen, als im entsprechenden linearen Peptid. Dieser Effekt betrifft wiederum primär Aminosäuren mit langen Seitenketten.

Die vorliegenden Spektren und deren Daten scheinen wiederum zu bestätigen, dass die Disulfidbrücke als stabilisierendes und strukturgebendes Element die Struktur der V3-Loop maßgeblich beeinflusst. Durch die geordnete Struktur liegen die Flanken der V3-Loop räumlich sehr nahe beieinander, was die unterschiedlichen TOCSY-Spektren erklärt.

4.5.4 NMR-spektroskopischer Vergleich des cyclischen V3-Glycopeptids **14** und des linearen V3-Glycopeptids **17**

Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen der beiden Glycopeptide **14** und **17** zeigt ebenfalls Unterschiede in der räumlichen Struktur beider Verbindungen auf. Hierbei ist zu beobachten, dass das TOCSY-Spektrum des linearen glycosylierten Peptids **17** durch Linienverbreiterung etwas schlechter aufgelöst ist.

Abbildung 4-36 zeigt die übereinandergelegten Bereiche der amidischen Protonen des jeweiligen TOCSY-Spektrums der Glycopeptide **14** und **17**. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich erheblich voneinander. Da es sich um eine cyclisches und eine lineares Glycopeptid handelt, wird der Hauptunterschied in den chemischen Verschiebungen vermutlich wiederum durch das strukturgebende Element der Disulfidbrücke verursacht. Ein direkter Vergleich beider Verbindungen ist durch das Fehlen der Disulfidbrücke im linearen Glycopeptid **17** als rein qualitativ anzusehen.

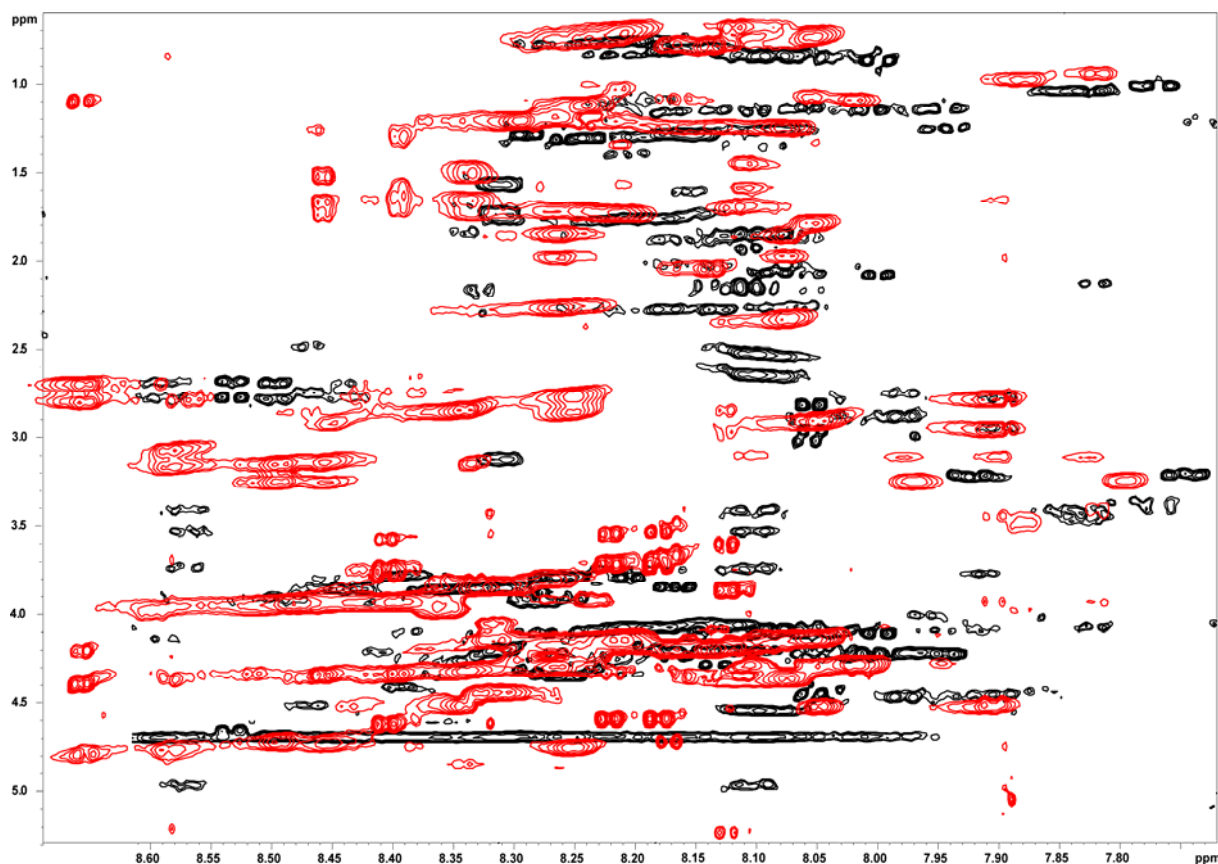


Abbildung 4-43: Ausschnitte der TOCSY-Spektren des linearen glycosylierten V3-Peptids **17** (rot) und des cyclischen glycosylierten V3-Peptids **14** (schwarz). Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K in H_2O/D_2O (9:1) und pH 3.5.

Es fällt wiederum der Unterschied beider Spektren auf. Die stärksten Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen zeigen die Aminosäuren Asn³⁰², Thr³⁰³, Arg³⁰⁴ und Lys³⁰⁵. Da es sich bei dieser Sequenz um den N-Terminus des linearen Glycopeptids **17** handelt, wird angenommen, dass die Änderungen in den chemischen Verschiebungen durch eine sterische Beeinflussung des N-terminalen *N*-glycosidisch gebundenen Nonasaccharids hervorgerufen werden. Vermutlich beruht die Beeinflussung auf sterischen Effekten, da im NOESY-Spektrum kein Kontakt zu den betreffenden Aminosäuren beobachtet werden konnte. Die vorliegenden Daten belegen die Annahme, dass die Nonasaccharidstruktur eine erfolgreiche Peptidkettenverlängerung an der betreffenden Aminosäure verhindert. Eine erfolgreiche Kupplung konnte trotz umfangreicher Bemühungen nicht durchgeführt werden. Da die Nonasaccharideinheit einen beträchtlichen Raumbedarf besitzt, der größer als der des Peptides ist, ist eine sterische Verhinderung der Peptidkettenverlängerung denkbar.

Es ist wiederum ein auffälliger *shift* in den chemischen Verschiebungen aller Aminosäuren mit langen Seitenketten zu beobachten. Diese Aussage trifft auf alle betreffenden Aminosäuren des linearen Glycopeptids **17** zu. Interessanterweise zeigt Cys³³⁰ den größten *shift* seiner chemischen Verschiebung. Diese wird damit erklärt, dass im vorliegenden linearen Glycopeptid keine Disulfidbrücke vorliegt.

Die vorliegenden Daten zeigen deutlich, dass sich das lineare Glycopeptid **17** und das cyclische Glycopeptid **14** in ihrer Struktur stark unterscheiden.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Asn ²⁸⁹	-	Arg ²⁹⁸	-	Ile ³⁰⁷	-0.1147	Tyr ³¹⁶	0	Ile ³²⁵	-0.0289
Glu ²⁹⁰	-	Pro ²⁹⁹	-	His ³⁰⁸	-0.5117	Ala ³¹⁷	-0.0627	Arg ³²⁶	-0.1136
Ser ²⁹¹	-	Ser ³⁰⁰	-	Ile ³⁰⁹	-0.0151	Thr ³¹⁸	-0.3504	Gln ³²⁷	0.0443
Val ²⁹²	-	Asn ³⁰¹	-	Gly ³¹⁰	0.0672	Gly ³¹⁹	0.0698	Ala ³²⁸	-0.0221
Glu ²⁹³	-	Asn ³⁰²	0.2932	Pro ³¹¹	-	Glu ³²⁰	-0.1449	His ³²⁹	-0.5608
Ile ²⁹⁴	-	Thr ³⁰³	-0.0088	Gly ³¹²	0.0584	Ile ³²¹	-0.0123	Cys ³³⁰	-0.5134
Asn ²⁹⁵	-	Arg ³⁰⁴	-0.0164	Arg ³¹³	0.2190	Ile ³²²	0.0203	Asn ³³¹	-0.1063
Cys ²⁹⁶	-	Lys ³⁰⁵	-0.2272	Ala ³¹⁴	0.1002	Gly ³²³	-0.0995	Val ³³²	-0.1346
Thr ²⁹⁷	-	Ser ³⁰⁶	0.0538	Phe ³¹⁵	0.0164	Asp ³²⁴	-0.1337	Ser ³³³	-0.2649

Tabelle 8: Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des cyclischen V3-Peptids **14** und des linearen V3-Peptids **17**.

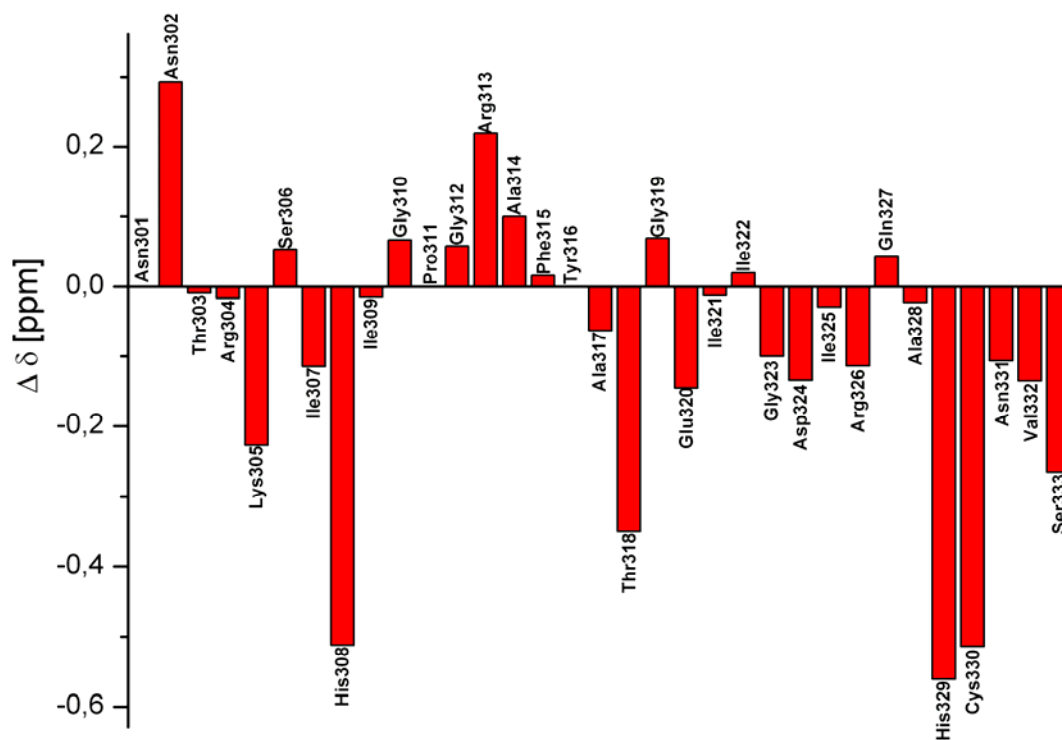


Abbildung 4-44: Graphische Übersicht der Differenzen der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des linearen Glycopeptids **14** und des cyclischen Glycopeptids **17**.

4.6 SPR-Bindungsstudien der synthetisierten Verbindungen 12, 14 und 17

Die Anwendung der Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) ermöglicht es, biomolekulare Interaktionen in Echtzeit zu untersuchen. SPR ermöglicht dabei die Messung von Wechselwirkungen zwischen einer immobilisierten Komponente auf einem Sensorchip und einer mobilen Komponente in einer Pufferlösung. Dadurch ist es möglich Bindungsaffinitäten zu bestimmen, und zu vergleichen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SPR-Messungen wurden jeweils mit den Verbindungen 12, 14 und 17 als immobilisierte Komponente durchgeführt. Auf eine Vermessung von Verbindungen 16 und 7 wurde verzichtet. Die zu vermessenden Verbindungen wurden an der Dextran-Matrix von CM3-Sensorchips immobilisiert. Die Immobilisierung wurde zweifach für jeweils 15 min bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ durchgeführt. Die Chipoberfläche der CM3-Chips wurde mittels einer Mischung aus NHS/EDC 1:1 bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ aktiviert. Die Kupplung der in Acetatpuffer bei pH 5.5 gelösten Verbindungen 12, 14 und 17 an die aktivierte Chipoberfläche erfolgte gemäß vorangegangener Arbeiten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ und einer Konzentration von 1 mg / mL.

Da der N-Terminus der Peptide nicht acetyliert vorlag, erfolgte die Kupplung vermutlich hauptsächlich über die terminale Aminofunktion. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Bindung ebenfalls über Lysin- oder Argininseitenketten hergestellt wurde. Abbildung 4-45 zeigt schematisch mögliche Positionierungen der immobilisierten Verbindungen auf der Chipoberfläche der CM3-Sensorchips. Die Belegung der CM3-Chips wurde anhand der RU-Werte kontrolliert und berechnet. Nicht belegte, noch aktivierte Bindungsstellen auf der Chipoberfläche wurden mittels Ethanolamin gecappt und somit irreversibel blockiert.

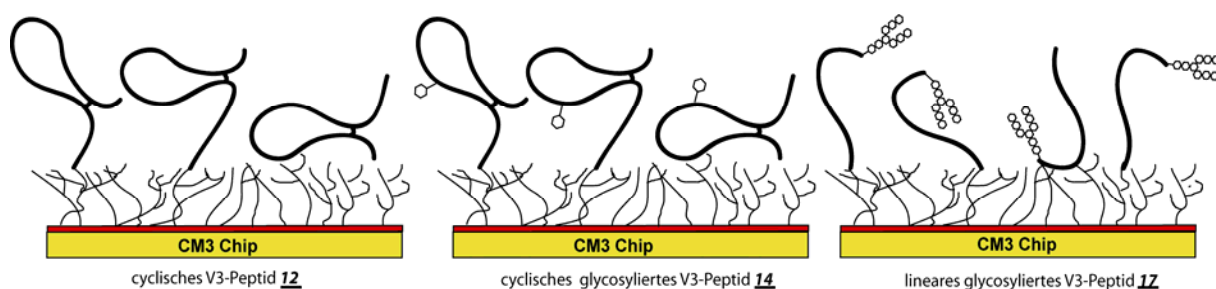


Abbildung 4-45: Schematisch dargestellte mögliche räumliche Orientierungen der immobilisierten Verbindungen 12, 14 und 17.

Das verwendete SPR-Messgerät *Biacore J* kann gerätebedingt nur zwei der vier auf einem Sensorchip vorhandenen Messzellen ansteuern. Flusszelle Nr. 1 wurde als Referenzzelle und Flusszelle Nr. 4 als Messzelle verwendet. Die Referenzzelle wurde nur aktiviert und gecappt.

Die erreichten Belegungen der immobilisierten Verbindungen betragen 85 fmol für Verbindung **12**, 20 fmol für Verbindung **14** und 176 fmol für Verbindung **17**.

Als mobile Komponente wurden Suspensionen von CCR5-überexprimierenden *HOS*-Zellen verwendet. Dies ermöglicht Bindungsstudien mit nativen, membrangebundenen Rezeptoren unter definierten Rahmenbedingungen, die einen Vergleich der gemessenen Bindungsaffinitäten zulassen. Als Negativkontrolle wurden Zellsuspensionen der entsprechenden Parentalzellgeneration vermessen, die den CCR5-Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Zellen wurden in Konzentrationen von 36, 180, 900, 1800 und 3600 Zellen pro μL bei einer Flussrate von $30 \mu\text{L} / \text{min}$ vermessen. Die Zellsuspensionen waren vor den Messungen frisch hergestellt und auf den Anteil von vitalen Zellen untersucht worden. Der Anteil von vitalen Zellen lag in allen durchgeführten Messungen bei mindestens 95 %. Die Bestimmung der Zellanzahl und des Anteils der vitalen Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und dem Farbstoff Trypan-Blau. Vitale Zellen sind in der Lage den blauen Farbstoff für ca. 30 Minuten abzuwehren, bevor er in die Zelle eindringt. Daher zeigte eine blaue Färbung ausgezählter Zellen deren Nicht-Vitalität an. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass Messungen mit Konzentrationen über 3600 Zellen / μL zu Verstopfungen im Flusssystem des Gerätes führten. Für die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der jeweiligen Messungen war es von entscheidender Bedeutung die jeweiligen Messreihen mit einer Zellgeneration durchzuführen. Darüber hinaus wurde eine große Charge PBS-Puffer hergestellt und für alle Messungen verwendet. Frühere SPR-Messungen konnten zeigen, dass die Homogenität des Laufpuffers maßgeblichen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hat.

4.6.1 SPR-Ergebnisse des zyklischen nicht glycosylierten V3-Peptids **12**

Die Aktivierung des verwendeten CM3-Chip erfolgte für zweimal zwölf Minuten bei einer Flussrate von $30 \mu\text{L} / \text{min}$ mit je $370 \mu\text{L}$ NHS/EDC (1:1). Die Immobilisierung des cyclischen V3-Peptids **12** an der Dextran-Matrix erfolgte zweimal für jeweils 5 Minuten. Es wurde zweimal je $160 \mu\text{L}$ Stammlösung injiziert. Die Stammlösung besaß eine Konzentration von $1 \text{ mg Peptid} / \text{mL PBS-Puffer}$. Nach erfolgreicher Immobilisierung wurden die noch aktivierten nicht belegten Bindungsstellen mittels eines 8-minütigen Injektionspulses durch Ethanolamin gecappt. Nach dem *capping* ergab sich eine Differenz der RU-Werte von Referenz- zu Messzelle von 418 RU. Dies entspricht einer immobilisierten Stoffmenge des cyclischen V3-Peptides **12** von 85 fmol auf der Chipoberfläche.

Die gezüchteten, frisch geernteten CCR5-überexprimierenden und parentalen *HOS*-Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypan-Blau ausgezählt und auf ihre Vitalität überprüft. Die Vitalität der verwendeten Zellen betrug jeweils 98 %. Es wurden Zellsuspensionen von 36, 180, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen / μL hergestellt. Die Messungen der Interaktion zwischen Zellen und dem cyclischen Peptid **12** wurden bei einer Flussrate von $30 \mu\text{L} / \text{min}$ über einen Zeitraum von 12 Minuten

durchgeführt. Nach den jeweiligen Messungen wurde die Chipoberfläche mittels kurzer Injektionen (je 30 bis 60 s) des Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) regeneriert. Die Verdünnung der verwendeten 0.1 M SDS-Lösungen betragen 5 %, 10 %, 25 % und 50 %. Nach erfolgreich durchgeführter Regeneration wurde mit der nächsten Messung fortgefahren. Die Zellsuspensionen wurden vor jeder Injektion resuspendiert, um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen in Lösung zu erreichen. Darüber hinaus wurden die Injektionen nicht nur auf- oder absteigend nach der jeweiligen Zellkonzentration durchgeführt, sondern zufällig gewählt. Diese sollte eventuelle Fehlerquellen minimieren.

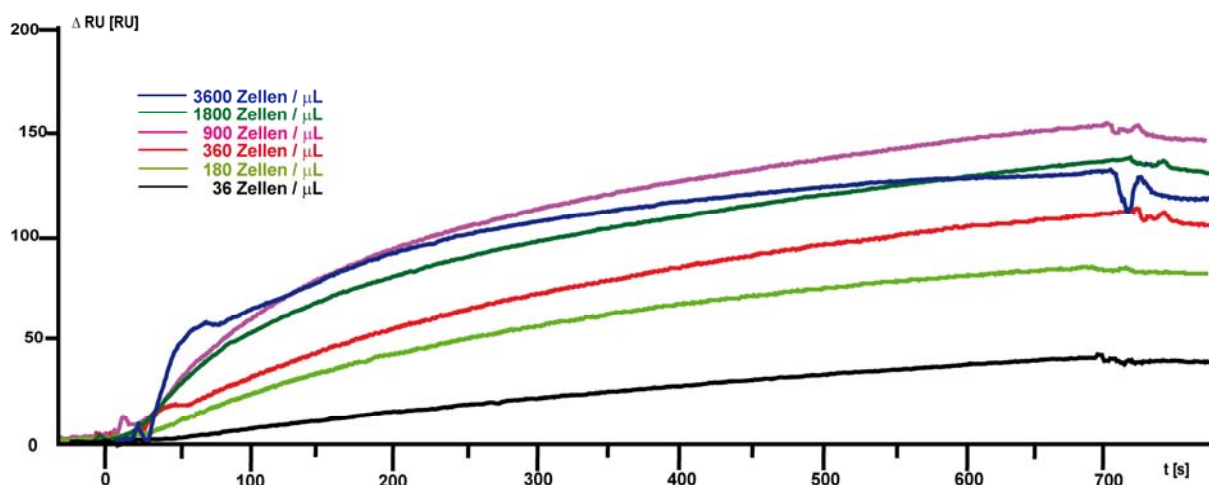


Abbildung 4-46: Differenzkurven des cyclischen V3-Peptids 12 in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Abbildung 4-38 zeigt die Interaktion der injizierten CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen mit dem auf der Sensorchipoberfläche gebundenen cyclischen Peptid 12. Man kann eindeutig die Abhängigkeit der Zellkonzentration zur jeweiligen RU-Antwort erkennen. Die gezeigten Kurven konnten jeweils in drei Messreihen bestätigt werden.

Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgt mittels Injektionspulse einer SDS-Lösung und musste nach Messungen mit hohen Zellkonzentrationen mehrfach durchgeführt werden. Da SDS ein starkes Detergenz darstellt, war nach der Regeneration der Messungen mit hohen Zellkonzentrationen teilweise ein starker *drift* der Basislinie zu beobachten. Dies wird damit erklärt, dass sich SDS auch an die Dextran-Matrix des Sensorchips anheften kann und so einen konstanten Verlauf der Basislinie verhindert. Die Sensorchipoberfläche regeneriert in diesem Falle jedoch von selbst. Auf eine zu häufige Regeneration mit SDS sollte dennoch verzichtet werden, da dadurch ebenfalls eine Denaturierung des Peptids an der Oberfläche verursacht werden kann.

Die Negativkontrolle der Bindung wurde mit parentalen HOS-Zellen durchgeführt, die den CCR5-Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche tragen. Verbindung 12 zeigte in zwei Messungen mit der parentalen Zelllinie geringe Bindungsereignisse an. Da die detektierten Signale in RU

zellkonzentrationsunabhängig waren, wird angenommen, dass es sich um unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensorchipoberfläche handelte. Da sich die Stärke der mit den Parentalzellen gemessenen Bindungen in der Größenordnung von nur 15 RU bewegten ist dies denkbar. Abbildung 4-39 zeigt die Bindungskurven mit injizierten Parentalzellen.

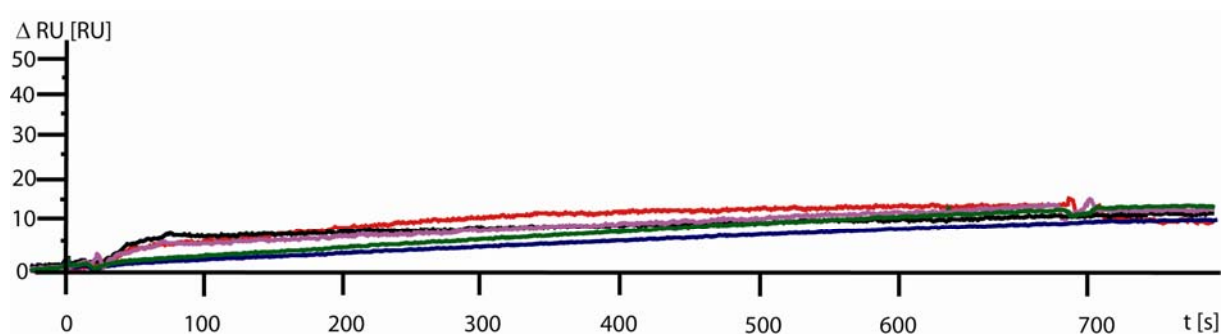


Abbildung 4-47: Differenzkurven des cyclischen V3-Peptids 12 in Kontakt mit HOS-Parentalzellen.

Die Auftragung der ermittelten RU-Werte in Abhängigkeit von der gemessenen Zellkonzentration ergibt nach einem *fitting* gemäß des *one-site-binding* Modells die in Abbildung 4-40 dargestellte Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen an das immobilisierte cyclische V3-Peptid 12. Auf die ermittelten Werte der Bindungskinetik und Bindungsstärke wird vergleichend zu den weiteren vermessenen Verbindungen in Abschnitt 4.6.4 eingegangen.

Die in Abbildung 4-40 verwendeten RU-Werte stellen die Differenzwerte zu den Messungen der Parentalzellen dar.

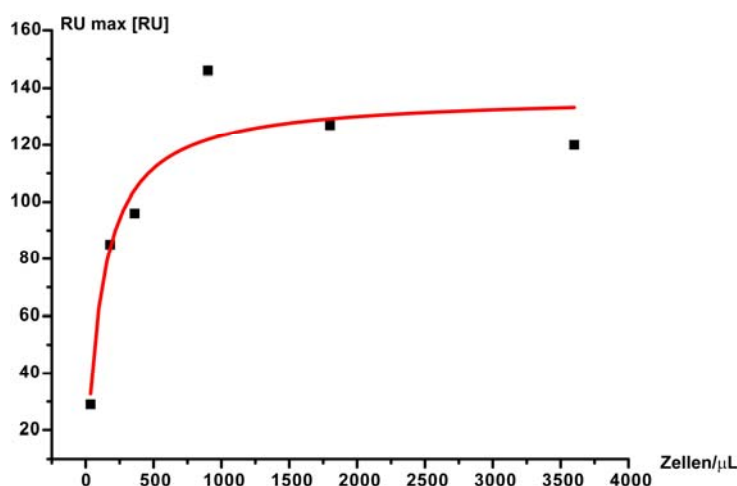


Abbildung 4-48: Bindungsabhängigkeit der injizierten CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen gegenüber dem cyclischen Peptid 12. Das fitting erfolgte nach dem one-site-binding Modell nach der Funktion $RU = RU_{Max} * c_{Zellen} / (K + c_{Zellen})$.

4.6.2 SPR-Ergebnisse des cyclischen glycosylierten V3-Peptids **14**

Die Aktivierung des verwendeten CM3-Chip erfolgte für zweimal zwölf Minuten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ mit je 370 μL NHS/EDC (1:1). Die Immobilisierung des cyclischen V3-Glycopeptids **14** an die Dextran-Matrix erfolgte dreimal für jeweils 5 Minuten. Dabei wurden jeweils 160 μL Stammlösung injiziert. Die Stammlösung besaß eine Konzentration von 1 mg Peptid/mL. Nach erfolgreicher Immobilisierung wurden die noch aktivierten Bindungsstellen durch einen 8-minütigen Injektionspuls mit Ethanolamin gecappt. Die Belegung der Sensorchipoberfläche zeigte zu diesem Zeitpunkt eine Belegung von 735 RU. Anschließend wurde mittels eines Pufferpulses gespült. Nach dem *capping* ergab sich eine Differenz der RU-Werte von Referenz- und Messzelle von nur noch 171 RU. Dies entspricht einer immobilisierten Stoffmenge von 20 fmol des cyclischen V3-Glycopeptids **14** auf der Chipoberfläche. Die immobilisierte Stoffmenge auf der Sensorchipoberfläche kann daher nur als unbefriedigend angesehen werden. Ein identisches Verhalten der Immobilisierung des cyclischen V3-Glycopeptids **14** konnte bereits früher festgestellt werden.¹⁵⁶ Nach dem *capping* wurde durch Spülen ein hoher Prozentsatz des vermeintlich immobilisierten Glycopeptids von der Oberfläche entfernt.

Die gezüchteten, frisch geernteten HOS- und Parental-Zellen wurden mittels Trypan-Blau und einer Neubauerzählkammer ausgezählt und auf ihre Vitalität überprüft. Die Vitalität der verwendeten Zellen betrug jeweils 97 %. Anhand der Auszählung der Zellen wurden Zellsuspensionen von 36, 180, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen / μL hergestellt. Die Messungen der Interaktion zwischen Zellen und dem cyclischen Glycopeptid **14** wurden bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ über einen Zeitraum von 12 Minuten durchgeführt. Nach den jeweiligen Messungen wurde die Chipoberfläche mittels kurzzeitiger SDS-Injektionen regeneriert. Die Sensorchipoberfläche war in diesem Fall nur sehr schwierig zu regenerieren. Nach Messungen mit hohen Zellkonzentrationen erfolgte die Regeneration mittels Injektionen von 50 mM Phosphorsäure. Alternativ wurde die Regeneration mit 0.05 oder 0.1 M SDS-Lösung durchgeführt. Nach erfolgreicher Regeneration wurde mit der nächsten Messung fortgefahren. Nach dem Einsatz von SDS als Regenerationsmittel musste teilweise 12 Stunden bis zu einem konstanten Verlauf der Basislinie gewartet werden.

Die Zellsuspensionen wurden vor jeder Injektion resuspendiert um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen in Lösung zu erreichen. Darüber hinaus wurden die Injektionen nicht nur auf- oder absteigend nach der jeweiligen Zellanzahl durchgeführt, sondern zufällig gewählt. Diese sollte eventuelle Fehlerquellen minimieren.

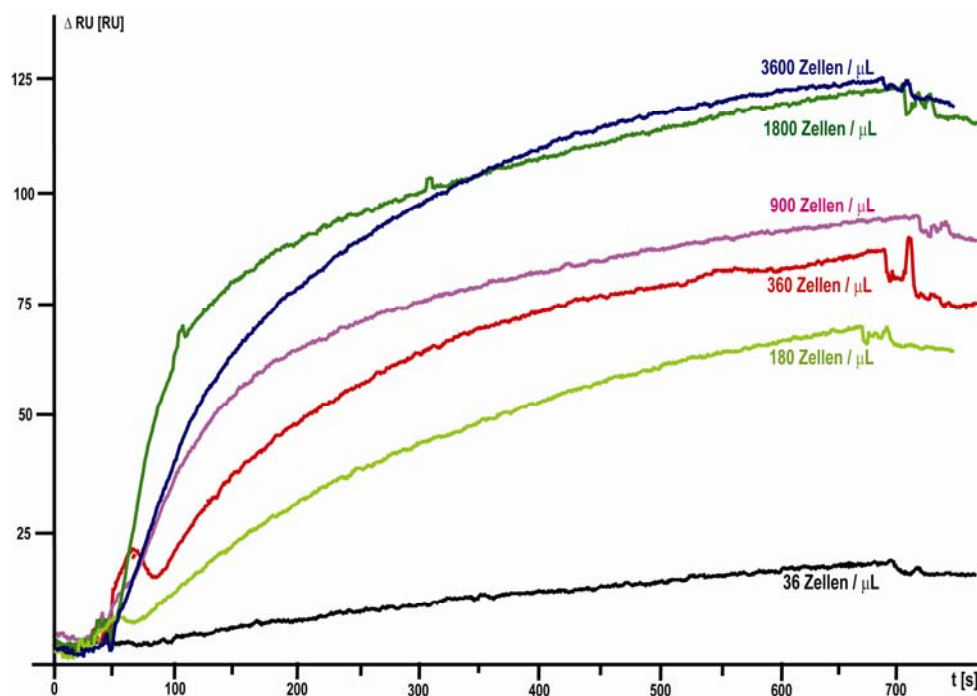


Abbildung 4-49: Differenzkurven des cyclischen glycosylierten V3-Peptids 14 in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Die Negativkontrolle wurde mit parentalen HOS-Zellen durchgeführt. Verbindung 14 zeigte in zwei Messungen mit der parentalen Zelllinie geringe Bindungsereignisse an. Da die detektierten Bindungen in RU zellkonzentrationsunabhängig waren, kann davon ausgegangen werden, daß es sich um unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensorchipoberfläche handelt. Da sich die Stärke der mit den Parentalzellen gemessenen Bindungen im Bereich von 5 RU bewegen sind diese jedoch als nicht relevant anzusehen. Abbildung 4-42 zeigt die Bindungskurven mit injizierten Parentalzellen.

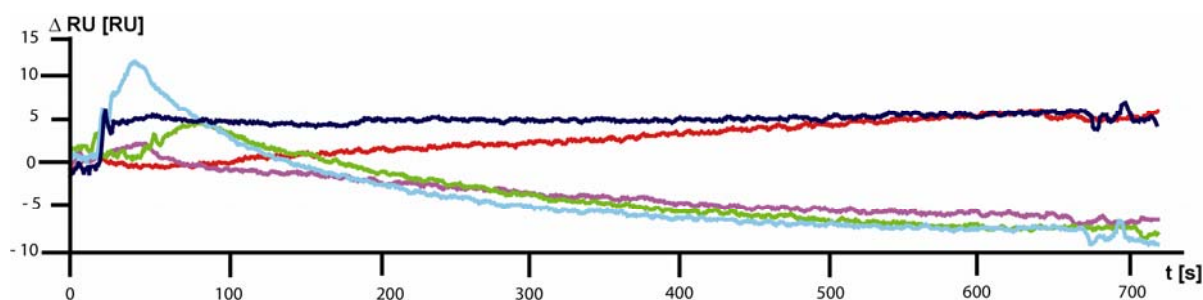


Abbildung 4-50: Differenzkurven des cyclischen V3-Peptids 14 in Kontakt mit HOS-Parentalzellen.

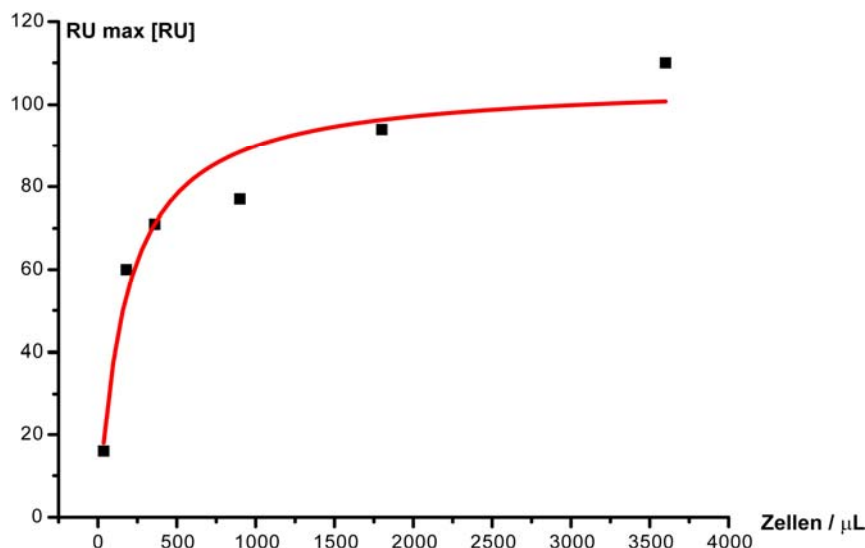


Abbildung 4-51: Bindungsabhängigkeit der injizierten CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen gegenüber dem glycosylierten cyclischen Peptid 14. Das fitting erfolgte nach dem one-site-binding Modell nach der Funktion $RU = RU_{Max} * c_{Zellen} / (K + c_{Zellen})$.

Die Auftragung der ermittelten RU-Werte in Abhängigkeit von der gemessenen Zellkonzentration ergibt nach einem *fitting* gemäß des *one-site-binding* Modells die in Abbildung 4-43 dargestellte Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von CCR5-überexprimierenden Zellen an das immobilisierte glycosylierte cyclische V3-Peptid 14. Auf die ermittelten Werte der Bindungskinetik und Bindungsstärke wird vergleichend mit den weiteren vermessenen Verbindungen in Abschnitt 4.6.4 eingegangen.

Die in Abbildung 4-43 verwendeten RU-Werte stellen die Differenzwerte zu den Messungen mit den Parentalzellen dar.

4.6.3 Biacore Ergebnisse des linearen glycosylierten V3-Peptids 17

Die Aktivierung des verwendeten CM3-Chips erfolgte für dreimal für je zwölf Minuten bei einer Flussrate von 30 µL / min mit je 370 µL NHS/EDC (1:1). Die Immobilisierung des linearen glycosylierten V3-Peptids 17 an der Dextran-Matrix erfolgte zweimal für jeweils 5 Minuten. Dabei wurden je 160 µL Stammlösung injiziert. Die Stammlösung besaß eine Konzentration von 1.2 mg Peptid / mL. Nach erfolgreicher Immobilisierung wurden die noch aktivierten Bindungsstellen mittels eines 8-minütigen Injektionspulses mit Ethanolamin gecappt. Nach dem *capping* und anschließenden spülen ergab sich eine Differenz der RU-Werte von Referenz- und Messzelle von 893 RU. Dies entspricht einer immobilisierten Stoffmenge von 171 fmol des linearen glycosylierten V3-Peptides 17 auf der Chipoberfläche. Die gezüchteten, frisch geernteten HOS- und Parental Zellen wurden mittels Trypan-Blau und einer Neubauerzählkammer ausgezählt und auf ihre Vitalität überprüft. Die Vitalität der verwendeten Zellen betrug jeweils 97 %. Anhand der Auszählung der Zellen wurden Zellsuspensionen von 36, 180, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen / µL hergestellt. Die

Messungen der Interaktion zwischen Zellen und dem glycosylierten Peptid **17** wurden bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} / \text{min}$ über einen Zeitraum von 12 Minuten durchgeführt. Die Regeneration der Sensorchipoberfläche musste nach Messungen mit hohen Zellkonzentrationen mehrmals mittels Injektion von 50 mM Phosphorsäure durchgeführt werden. Alternativ erfolgte die Regeneration mit 0.05 oder 0.1 M SDS-Lösung. Nach dem Einsatz von SDS als Regenerationsmittel musste teilweise 12 Stunden bis zu einem konstanten Verlauf der Basislinie gewartet werden. Nach erfolgreicher Regeneration wurde mit der nächsten Messung fortgefahren.

Die Zellsuspensionen wurden vor jeder Injektion resuspendiert, um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen in Lösung zu erreichen. Darüber hinaus wurden die Injektionen nicht nur auf- oder absteigend nach der jeweiligen Zellanzahl durchgeführt, sondern zufällig gewählt. Diese sollte eventuelle Fehlerquellen minimieren.

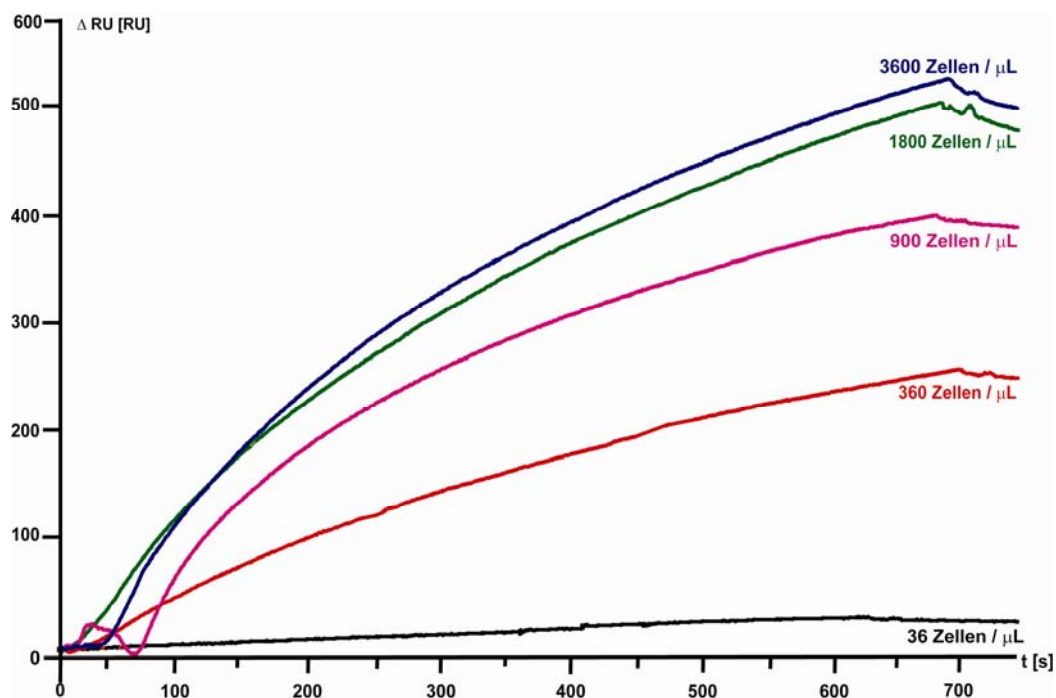


Abbildung 4-52: Differenzkurven des linearen glycosylierten V3-Peptids **17** in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Die Negativkontrolle der Bindung wurde mit parentalen HOS-Zellen durchgeführt. Verbindung **17** zeigte in allen Messungen mit der parentalen Zelllinie geringe Bindungsereignisse an. Da die detektierten Bindungen in RU wie in den vorangegangenen Messungen zellkonzentrationsunabhängig waren, wird angenommen, dass es sich erneut um unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensorchipoberfläche handelt. Da sich die Stärke der mit den Parentalzellen gemessenen Bindungen im Bereich von 15 RU bewegen werden diese jedoch als nicht relevant angesehen. Abbildung 4-45 zeigt die Bindungskurven mit injizierten Parentalzellen.

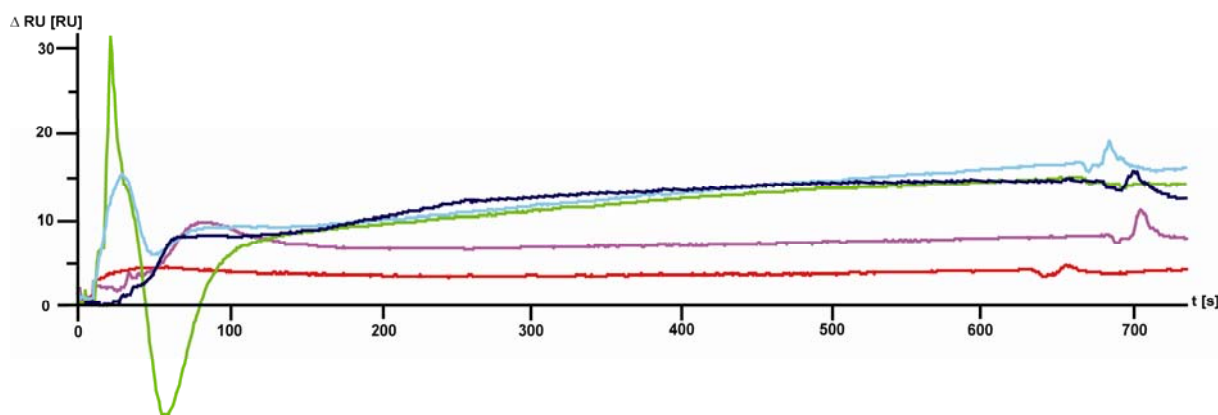


Abbildung 4-53: Differenzkurve des cyclischen V3-Peptids 14 in Kontakt mit HOS-Parentalzellen.

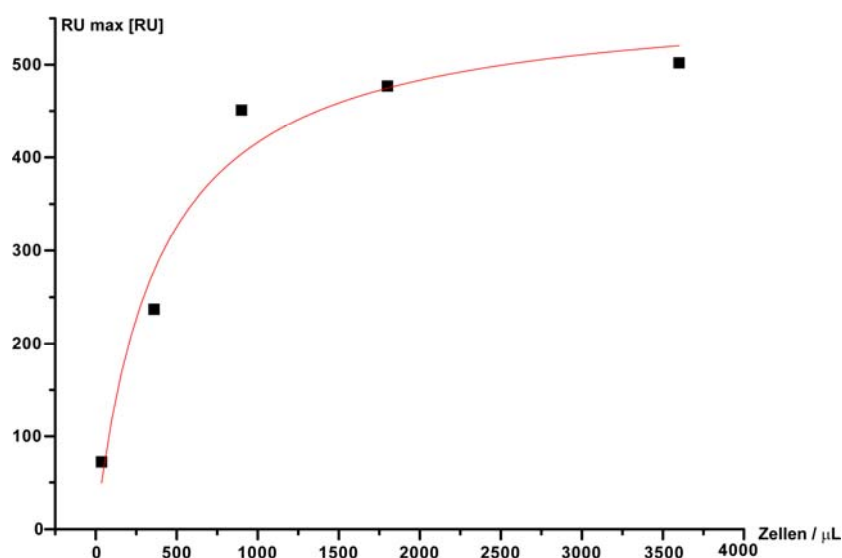


Abbildung 4-54: Bindungsabhängigkeit der injizierten CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen gegenüber dem cyclischen Peptid 12. Das fitting erfolgte nach dem one-site-binding Modell nach der Funktion $RU = RU_{Max} * c_{Zellen} / (K + c_{Zellen})$.

4.6.4 Vergleich der SPR-Ergebnisse der Verbindungen 14, 15 und 17

Ein Vergleich der in den Abschnitten 4.6.1 bis 4.6.3 dargestellten Ergebnisse der SPR-Studien zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Konzentration CCR5-überexprimierender HOS-Zellen und den immobilisierten Verbindungen 12, 14 und 17 auf der Sensorchipoberfläche. Die nach dem *one-site-binding* Modell gefitteten Bindungskurven zeigen dabei Abhängigkeiten von Glycosylierung und Cyclisierung. Die Stärke und der Anstieg der Bindung legen den Schluss nahe, dass sowohl die Oligosaccharidstruktur als auch die Disulfidbrücke entscheidenden Einfluss auf die Bindung haben. Abbildung 4-47 zeigt die drei gefitteten Kurven in direktem Vergleich. Es ist anzumerken, dass das lineare Glycopeptid

17 in den ersten beiden Messungen mit 1800 Zellen / μL einen Maximalwert von 996 RU erreichte. Die durchgeführte Regeneration, die sich außerordentlich schwierig gestaltete, scheint jedoch einen Teil der immobilisierten Moleküle beschädigt zu haben, da anschließend keine Werte über 550 RU gemessen werden konnten.

Die geringste Bindungsaffinität weist das cyclische V3-Peptid **12** auf. Obwohl es eine erkennbar zellkonzentrationsabhängige Bindung zeigt, weist es verglichen mit den drei vermessenen Verbindungen die geringste Affinität auf.

Beide glycosylierte V3-Peptide **14** und **17** zeigen eine starke zellkonzentrationsabhängige Bindung an die CCR5-überexprimierenden Zellen. Obwohl der absolute Wert des linearen Glycopeptids **17** höher liegt als der des cyclischen Glycopeptids **14** wird die Bindungsaffinität des cyclischen V3-Peptides höher eingeschätzt. Eine entsprechende Auftragung der Daten ist in Abbildung 4-48 dargestellt.

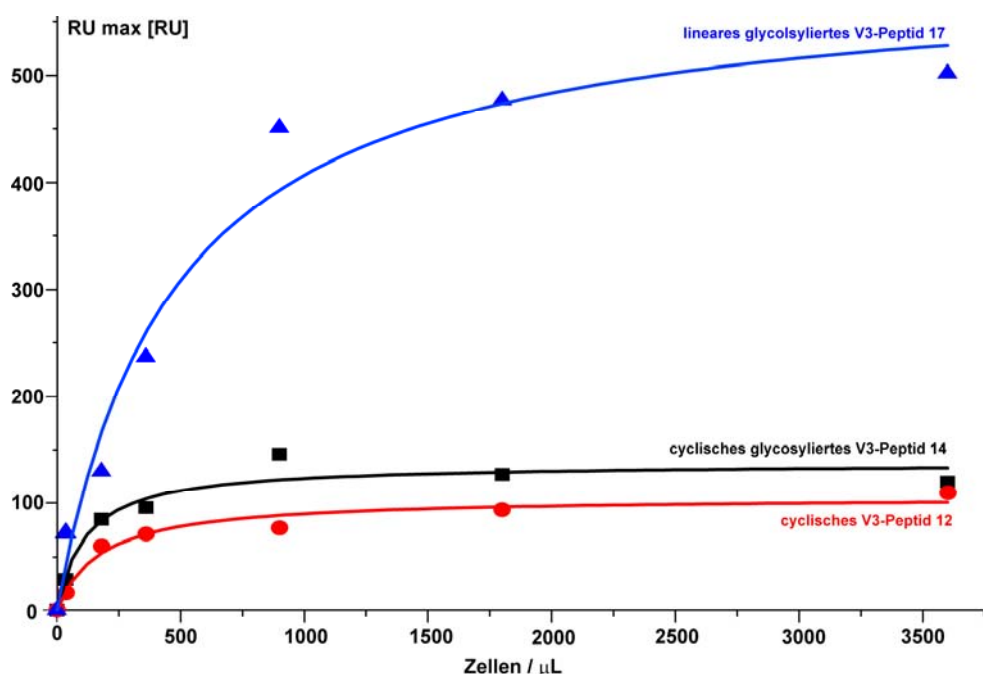


Abbildung 4-55: Bindungsabhängigkeiten der injizierten CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen gegenüber den Verbindungen **12, **14** und **17**. Das fitting erfolgte nach dem one-site-binding Modell anhand der Funktion $\text{RU} = \text{RU}_{\text{Max}} * c_{\text{Zellen}} / (\text{K} + c_{\text{Zellen}})$.**

Alle drei Verbindungen zeigen eine Sättigung der Bindung bei maximaler Zellkonzentration. Ein Vergleich der drei abgebildeten Kurvenverläufe zeigt Unterschiede in der Kinetik der jeweiligen Bindung. Um eine Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Arbeiten gewährleisten zu können wurde für die Charakterisierung der Assoziation eine bereits von J. Tost verwendete Methode verwendet.¹⁵⁴ Dabei wurden an die Messwerte der Sensorgramme bei einer Zellkonzentration von 900 Zellen / μL Funktionsannäherungen nach dem Modell der Langmuirassoziation angelegt. Die erhaltenen k_{on} -Werte wurden mit der Annahme von 10^6 Rezeptoren pro Zelle und einer damit verbundenen Rezeptorkonzentration von 1.5 nM zu

Grunde gelegt. Die ebenfalls erhaltenen Chi^2 -Werte geben dabei ein Maß der Qualität des *fittes* an.

Verbindung	$K_{\text{on}} [\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}]$	Chi^2
cyclisches Peptid 12	$1.15 * 10^6$	2.11
glycosyliertes cyclisches Peptid 14	$1.76 * 10^6$	6.59
glycosyliertes lineares Peptid 17	$3.84 * 10^6$	1.67

Tabelle 9: Berechnete k_{on} -Werte nach der Langmuirassoziation (Zellkonzentration 900 Zellen/ μL , angenommene Rezeptorkonzentration 1.5 nM).

Ein Vergleich der in Tabelle 9 angegebenen k_{on} -Werte zeigt, dass das lineare Glycopeptid **17** den höchsten Wert der Geschwindigkeitskonstanten aufweist. Das cyclische Peptid **12** weist hingegen den geringsten Wert auf. Die Ergebnisse decken sich mit bereits vorliegenden Erkenntnissen. Die vorliegenden Daten belegen, dass Glycopeptide aufgrund ihrer Glycosylstruktur eine schnellere Kinetik und somit eine bessere Assoziation zeigen als Peptide. Zudem ist die cyclische Form im vorliegenden Bindungsfall außerordentlich wichtig. Die aufgeführten Geschwindigkeitskonstanten stellen jedoch allerdings keine wirklichen k_{on} -Werte dar sondern sind nur als relative Werte zu betrachten. Es ist zu berücksichtigen, dass die Rezeptordichte nur mit einem Wert von 10^6 Rezeptoren pro Zelle abgeschätzt werden kann und allenfalls einen groben Richtwert darstellt. Es ist ebenfalls zu beachten, dass die am Sensorchip vorbeigeleiteten Zellen mehrfach an die immobilisierten Verbindungen binden können und es so zu *rebinding* Effekten kommen kann. In der zugrunde liegenden Berechnung kann ebenfalls nicht berücksichtigt werden, dass die bindenden Zellen nur mit der dem Sensorchip zugewandten Seite an die Sensorchipoberfläche binden kann. Ein weiterer Faktor können durch Scherkräfte zerstörte Zellen sein, deren Membrankompartimente noch an der Sensorchipoberfläche Bindungsereignisse simulieren können. Zusammenfassend betrachtet können die gewonnenen Erkenntnisse primär zu einem Vergleich der synthetisierten Verbindungen untereinander herangezogen werden. Sie zeigen deutlich die Beeinflussung der Bindungsaffinität durch eine Glycosylstruktur und die cyclische Form der V3-Struktur.

Die Ergebnis der Bindungsstudien mittels Biacore decken sich mit den Ergebnissen früherer Arbeiten von J. Tost, J. Dojahn und S. Meyer, in denen ebenfalls Bindungsstudien mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen und V3-Verbindungen durchgeführt wurden. Die in diesen Arbeiten getroffenen Aussagen zeigen mit den vorliegenden Ergebnissen eindeutig deren Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit. Cyclische V3-Glycopeptide zeige eine schnellere Bindungskinetik und -stärke als entsprechende Peptide. Frühere Arbeiten belegen durch Strukturdaten, dass die Glycosylstruktur trans-loop Wechselwirkungen verursacht und so die V3-Loop strukturell stabilisiert und beeinflusst. Die vorliegende Arbeit zeigt ebenfalls dass eine Glycosylierung die Bindung um Faktor 2 verbessert bzw. verstärkt. Die stärkste Bindung

unter den besten kinetischen Eigenschaften zeigt das lineare glycosylierte V3-Peptid. Die Glycosylstruktur scheint einen sehr wichtigen strukturellen Einfluss auf das Glycopeptid und so auf die Bindung auszuüben. Die eigentliche Bindung scheint jedoch ebenfalls von der cyclischen Form abzuhängen. Die Bindung des cyclischen glycosylierten V3-Peptids zeigt ebenfalls eine starke Interaktion zu den eingesetzten CCR5-tragenden Zellen. Aus den kinetischen Daten ist die eigentliche Stärke der Bindung nicht ersichtlich, aber die Schwierigkeiten bei der Regeneration der Chipoberfläche sprechen für eine außerordentlich starke Bindung zwischen den Zellen und Verbindung **17**. Es ist ebenfalls anzumerken, dass die Immobilisierung von Verbindung **17** vermutlich nicht über den N-Terminus erfolgt ist. Am N-Terminus dieser Verbindung liegt das voluminöse N-Glycan vor, das vermutlich eine erfolgreiche Peptidkettenverlängerung durch sterische Gründe verhindert hat. Es ist anzunehmen, dass die Immobilisierung über die Seitenketten der Aminosäuren Lysin oder Arginin erfolgt ist. Daher ist ebenfalls anzunehmen, dass das lineare Glycopeptid nicht derart optimal zu den Zellen ausgerichtet war, wie die Verbindungen **12** und **14**. Verbindung **17** zeigt für ein lineares Glycopeptid jedoch eine auffällig starke Bindung und Abhängigkeit von der Zellkonzentration. Die vorliegenden Daten belegen die Bedeutung der Glycosylierung für das Bindungsverhalten der V3-Loop.

5 Zusammenfassung

Das HIV (*Human Immuno Deficiency Virus*) bindet mit dem auf seiner Oberfläche exprimierten GP120 an spezifische Zellen des humanen Immunsystems. Die Interaktion zwischen GP120 und den Zielzellen des Immunsystems verläuft in zwei Stufen. Im ersten Schritt erfolgt der Angriff über den CD4-Rezeptor und im zweiten Schritt über die Chemokin Korezeptoren CCR5 oder CXCR4. Die Auswahl des verwendeten Korezeptors erfolgt vermutlich in engem Zusammenhang mit der Glycosylierung des GP120. In diesem Kontext steht die dritte variable Loop (V3-Loop) des GP120 im Fokus der aktuellen Forschung. Diesem exponierten Teilabschnitt auf der Oberfläche des GP120 und seiner hochkonservierten Glycosylierung wird entscheidender Einfluss bei der Wahl des Korezeptors zugeschrieben. Die exakten molekularen Funktionen der Glycosylierung der V3-Loop des GP120 sind allerdings bis heute nicht geklärt.

Im Laufe dieser Arbeit wurden Peptide und Glycopeptide aus dem V3-Bereich des GP120 dargestellt. Die zugrunde liegende Peptidsequenz entspricht dem Patientenisolat EB1. Die Darstellung der Glycopeptide erfolgte durch Einbau eines Glycosylaminosäurebausteins. Die Aufreinigung aller Verbindungen erfolgte mittels *RP*-HPLC, die Identifizierung mittels ESI-MS, MALDI-TOF-MS und NMR-spektroskopischen Methoden. Die synthetischen Glycopeptide trugen an Position N³⁰¹ eine *N*-Glycosylierung. Dabei handelte es sich um *N*-Acetylglucosamin oder um ein biantennäres Nonasaccharid des Komplextyps. Das Oligosaccharid entsprach in Aufbau und Struktur der nativen Glycosylierung der V3-Loop und somit dem *Core*-Typ aller *N*-Typ Glycoproteine. Die Darstellung erfolgte enzymatisch aus dem Glycoprotein Rinderfibrinogen. Alle Verbindungen sollten eine cyclische Form aufweisen. Die cyclische Form sollte wie in der nativen Struktur durch eine Disulfidverbrückung zwischen den Positionen C²⁹⁶ und C³³⁰ erreicht werden. Die synthetisierten Verbindungen sollten auf Beeinflussungen ihrer räumlichen Konformation und resultierende Änderungen ihrer Bindungseigenschaften durch die Glycosylstruktur in direktem Vergleich mit den unglycosylierten Verbindungen untersucht werden.

Die Synthesen eines cyclischen V3-Glycopeptids mit einer *N*-Acetylglucosamineinheit an Position N³⁰¹ und des entsprechenden cyclischen Referenzpeptids konnten erfolgreich durchgeführt werden. Die Ausbeute des cyclischen Glycopeptids lag deutlich unter der Ausbeute des cyclischen Referenzpeptids, was anscheinend auf den Einfluss der *N*-Acetylglucosamineinheit zurückzuführen ist.

Die Synthese eines cyclischen V3-Glycopeptids mit einer Oligosaccharidstruktur des komplexen Types an Position N³⁰¹ konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Nach erfolgreichem Einbau des Oligosaccharidbausteins in die wachsende Peptidkette konnte keine weitere Kettenverlängerung mehr erreicht werden. Es wurde daher mit dem erhaltenen, 32 Aminosäuren umfassenden, Glycopeptid mit einem terminalen Nonasaccharid des

Komplextyps weitergearbeitet. Die Synthese des entsprechenden linearen Referenzpeptids konnte erfolgreich durchgeführt werden.

Die Untersuchung struktureller Unterschiede zwischen den synthetischen Verbindungen wurde mit Hilfe 2-dimensionaler NMR-spektroskopischer Methoden (TOCSY, NOESY) durchgeführt. Ein direkter Vergleich der cyclischen V3-Verbindungen zeigt deutliche Unterschiede zwischen der unglycosylierten und glycosylierten Loop auf. Die Betrachtung der NOE-Kontakte innerhalb der glycosylierten cyclischen Verbindung legen den Schluss nahe, dass bereits die relativ kleine *N*-Acetylglucosamineinheit in der Lage zu sein scheint, über die Loop hinweg Raumkontakte auf die gegenüberliegende Flanke auszubilden. Dies äußert sich in signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungen der betreffenden Aminosäuren. Zusätzlich wird eine deutlich höhere Bindungsaffinität an CCR5 überexprimierenden HOS-Zellen in den anschließenden SPR-Bindungsstudien beobachtet. Die cyclischen Verbindungen beinhalten das strukturgebende Element einer Disulfidbrücke, was zusätzlich von Bedeutung zu sein scheint. Durch dieses stabilisierende Element liegen die Flanken der cyclischen Verbindungen räumlich nahe gegenüber, was die beobachteten Raumkontakte und Beeinflussungen durch die kleine *N*-Acetylglucosamineinheit erklären können.

Betrachtet man die beiden linearen Verbindungen, fällt im Vergleich zu den cyclischen Verbindungen auf, dass zwischen den linearen Verbindungen keine signifikanten Unterschiede in den chemischen Verschiebungen auftreten. Daraus lässt sich folgern, dass kaum Wechselwirkungen der Flanken vorliegen, was bedeutet, dass die beiden Flanken des Peptids nicht wie in der cyclischen Struktur über räumliche Nähe verfügen.

Der Einfluss der Glycosylierung auf das Bindungsverhalten der synthetisierten Verbindungen wurde durch SPR-Untersuchungen mit Hilfe von CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigen eindeutig, dass alle synthetisierten Verbindungen mit den CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen spezifisch interagieren. Die Ergebnisse belegen jedoch ebenfalls, dass *N*-Glycan Strukturen einen großen Einfluss auf das Bindungsverhalten von V3-Glycopeptiden bewirkt. Der direkte Vergleich beider cyclischer V3-Verbindungen zeigt eine starke Steigerung der Bindungsaffinität des cyclischen Glycopeptids, die ausschließlich durch das Vorhandensein der *N*-Acetylglucosamineinheit erklärt werden kann. Die signifikant stärkste Bindungsaffinität zeigt jedoch das lineare glycosylierte V3-Peptid. Die Bindungsaffinität liegt signifikant über der des cyclischen Glycopeptids, während die unglycosylierte lineare Verbindung die niedrigste Affinität zeigt. Die Glycosylstruktur scheint einen massiven Einfluss auf die Bindung an CCR5 auszuüben. Darüberhinaus zeigen die ermittelten K_{on} -Werte eine schnellere Kinetik der Bindung für das lineare Glycopeptid. Dies unterstützt die Annahme, dass die hochkonservierte Oligosaccharidstruktur innerhalb der V3-Loop maßgeblich an der Bindung an den Korezeptor CCR5 beteiligt ist.

Die vorliegenden Daten belegen, dass die Glycosylstruktur der hochkonservierten Glycosylierungsstelle innerhalb der V3-Loop des GP120 großen Einfluss auf das Korezeptorbindungsverhalten ausübt.

6 Summary

HIV (Human Immuno Deficiency Virus) binds with the GP120 on its surface to specific target cells in the human immune system. The interaction between GP120 and human immune cells occurs in two steps. The first interaction of the CD4 receptor with GP120 is followed by an interaction between the GP120/CD4 complex and the chemokine receptors CCR5 or CXCR4, respectively. The change in coreceptor usage is proposed to be triggered by the glycosylation of an exposed area of GP120, the V3 loop. The molecular function of the highly conserved *N*-type glycosylation site inside the V3 area is yet unknown but is known to play an important role in coreceptor usage.

During these studies peptides and glycopeptides of the V3 sequence were synthesised. The amino acid sequence was taken from a patient isolate EB1. The syntheses of the glycopeptides were carried out by a building block strategy. For purification of all compounds, *RP*-HPLC was used. The characterisations were done by ESI-MS, MALDI-TOF-MS and NMR spectroscopy. The synthetic glycopeptides carried an *N*-type glycosylation site at position N³⁰¹ within their sequence. The *N*-glycans were *N*-acetylglucosamine and a complex type nonasaccharide. The oligosaccharide was structurally similar to the native glycosyl structure of the V3 loop. The synthesis of the oligosaccharide was performed by enzymatic methods starting from bovine fibrinogen. All synthesised compounds were intended to have cyclic forms identical to the native V3 loop. The cyclic form is formed by a disulfide bridge between C²⁹⁶ and C³³⁰. The synthetic compounds were examined in regard to the influence of the *N*-glycan on structural and binding properties. The determination was made by direct comparison between the glycopeptides and the parent peptides.

The syntheses of the cyclic glycopeptides carrying an *N*-acetylglucosamine within the loop and the corresponding cyclic parent peptide were completed successfully. The yield of the cyclic glycopeptide was significantly lower than the yield of the cyclic peptide. The comparatively small *N*-acetylglucosamine seems to have major influence on the yield of the cyclic glycopeptide.

The synthesis of a cyclic glycopeptide carrying a nonasaccharide was not successful. After the integration of the building block the peptide chain could not be elongated further. Therefore only a linear 32 amino acid comprehensive glycopeptide carrying a terminal oligosaccharide structure was synthesised.

The determination of differences between the synthetic compounds was performed by NMR spectroscopic methods (TOCSY, NOESY). NOE contacts of the glycopeptide prove interactions of the *N*-acetylglucosamine unit with the opposite flank of the V3 loop. Also, the affected amino acids show significant changes in their chemical shifts. In addition, there are major differences in the binding capacities in the following binding studies to CCR5 over expressing HOS cells. The cyclic compounds in addition contain the structural feature of a

disulfide bridge. This disulfide bond causes a closer proximity between the two flanks of the V3 loop. The results are in compliance with earlier studies of the V3 loop.

The comparison of the chemical shifts of the two linear compounds show no significant differences between the chemical shifts of the peptide and the glycopeptides. This is due to the missing cyclic structure induced by the disulfide bridge.

The influence of the glycosylation on the binding properties of the synthesised compounds was determined by SPR experiments with CCR5 overexpressing HOS cells. The results of the SPR binding studies verify the specific interaction of all synthesised compounds with over expressing CCR5 HOS cells. The binding studies reveal a strong influence of the *N*-glycans. The comparison of the two cyclic compounds shows a significant higher binding capacity of the glycopeptide. The linear glycopeptide which carries the oligosaccharides reveals the highest binding capacity. In addition, the kinetics of binding shows a faster association rate constant for the linear glycopeptide. This proves the influence of the *N*-glycan on the binding property of synthetic V3 glycopeptides to CCR5 over expressing HOS cells.

In summary the data of this study prove the influence of the *N*-glycosylation site on the coreceptor binding capability. Additionally, the *N*-glycan shows a major influence on the peptide backbone. Therefore, the present data support that the *N*-glycosylation site at N³⁰¹ has a major positive influence on the binding properties of the V3 loop. In addition, the data seem to provide that the *N*-glycan structure has a significant influence on the structural arrangement of the glycopeptide.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien

Acros Organics	Acetonitril (<i>Ultra Gradient HPLC Grade</i>), Triisopropylsilan
Applied Biosystems	Piperidin/DMF (1:4), Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
Biacore AB	NHS, EDC, EA-HCL, SDS, Na-Acetat-Puffer pH 5.5, <i>Biadesorb Solution 1</i> ; <i>Biadesorb Solution 2</i> , <i>Bia Normalize Solution</i> , CM3 Sensor-Chips
Biochrom	FKS, hitzedeaktiviert (20 min, 56 °C)
Bio-Rad	Bio-Gel P-2, 200 - 400 <i>mesh</i>
Calbiochem	α 1-2,3-Mannosidase (rekombinant, <i>E. coli</i>), α 1,6-Mannosidase (rekombinant, <i>E. coli</i>), β 1-2,3,4,6- <i>N</i> -Acetylglucosaminidase (rekombinant, <i>E. coli</i>)
Deutero	Deuteriumoxid 99.9 %, DMSO-d ₆ 99.8 %, CDCl ₃ 99.8 %
Fluka	Dhbt-OH, abs. Dioxan, abs. <i>N,N</i> -Dimethylformamid, n-Hexan, abs. Methanol, abs. THF, abs. DMSO, <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
eigene Herstellung	PBS Puffer: 4.0 g NaCl, 0.10 g KCl, 0.12g KH ₂ PO ₄ , 0.72 g Na ₂ HPO ₄ auf 500 mL mit ddH ₂ O auffüllen (pH 7.4)
Gibco / Invitrogen	Penicillin/Streptomycin, RMPI 1640-Medium, Trypsin-EDTA
Hewlett Packard	ES Tuning Mix
Iris Biotech GmbH	Piperidin, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(<i>O</i> tBu), Fmoc-L-Asp(<i>O</i> tBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(<i>O</i> tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, TBTU, HATU
Merck KGaA	Acetanhydrid, Aceton, Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Dinatriumhydrogenphosphat, Dithiothreitol, Ethanol, Ethylacetat, Hydrazinhydrat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Petrolether, 2-Propanol, Pyridin, Toluol, Trifluoressigsäure

NIH AIDS Research & Reference Program	HOS CCR5-Zellen, HOS Parentalzellen
Proligo	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
Roche Diagnostics	<i>N</i> -Glycosidase F (rekombinant, <i>E. coli</i>), Neuraminidase (<i>Clostridium perfringens</i>)
Sigma-Aldrich	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Fibrinogen (aus Rinderplasma, <i>Fraction 1</i>), β - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase (rekombinant, <i>E. coli</i>), Puromycin, Trypanblau, β -Galactosidase

7.2 Verwendete Geräte, Software und Materialien

CO ₂ -Inkubator	MCO 17AI, Sanyo / Bad Nenndorf, Deutschland
ESI-Massenspektrometer	HP5989B; HP59987A API-Electrospray LC/MS Hewlett Packard / Böblingen, Deutschland
Fraktionssammler	Gilson FC205, GilsonFC 203B " <i>Fraction collector</i> " Gilson / Middleton, WI, USA Advantec SF-3120 " <i>Fraction collector</i> ", Advantec MFS, Inc. / Sierra Court, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4 Christ / Osterode, Deutschland
HERAsafe Sterilwerkbank	HS18, Kendro Laboratory Products GmbH / Langenselbold Deutschland
HPLC-Anlage	Sprint Chromatography Workstation BioCAD / Vancouver, Canada
HPLC-Anlage	Sprint Chromatography Workstation BioCAD 700E, Applied Biosystems /Darmstadt, Deutschland
HPLC-Anlage	Merck/Hitachi <i>LaChrom</i> L-7000-Serie VWR International / Darmstadt, Deutschland
HPLC-Säulen	<i>Nucleodur</i> C-18 <i>Pyramid</i> Reverse phase , (250 mm, 4 mm, 3.93 mL, 5 μ m, 1 mL/min) Macherey-Nagel / Düren, Deutschland <i>Nucleodur</i> C-18 <i>Pyramid</i> Reverse phase (250 mm, 21 mm, 86.59 mL, 5 μ m, 20 mL/min) Macherey-Nagel / Düren, Deutschland <i>Luna</i> NH ₂ 100A Reverse phase (250 mm, 10 mm,

	9.85 mL, 5 μ m, 5 mL/min) <i>Vydac</i> 218TP510 C-18 Reverse phase (250 mm, 20 mm, 19.653 mL, 5 μ m, 5 mL/min) Grace Vydac / Anaheim, USA
Laborautoklav	<i>GLA40</i> , Medizin und Labortechnik F. Gössner Hamburg, Deutschland
MALDI-TOF-Spektrometer	Biflex III Bruker Daltonics / Billerica, MA, USA
Mikroskop	Hund Typ: S200; Okkular: A10 / 0.25 Helmut Hund / Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	(0.1 mm Tiefe/0.0025 mm ²), Mariantal / Königshofen, Deutschland
NMR-Spektrometer	<i>Avance DRX 500</i> 11.67 Tesla, $\omega(^1\text{H})=499.87$ MHz, $\omega(^{13}\text{C})=125.77$ MHz Inverser 5mm Tripelresonanzprobenkopf Bruker BioSpin / Rheinstetten, Deutschland <i>Avance 700 CryoProbe</i> 16.35 Tesla, $\omega(^1\text{H})=700.13$ MHz, $\omega(^{13}\text{C})=176.07$ MHz Inverser 5mm Cryo-Tripelresonanzprobenkopf Bruker BioSpin / Rheinstetten, Deutschland
Peptidsynthesizer	Pioneer Peptide Synthesis System PerSeptive Biosystems/Wiesbaden, Deutschland
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 MO SGwater / Barsbüttel, Deutschland
Rotationsverdampfer	Laborata 4000-efficient Heidolph / Cinnaminson, USA
SPR-Messgerät	Biacore <i>J</i> Biacore Inc / Uppsala, Schweden
Ultrafiltrationszelle	Amico 8050 (400 mL) Millipore Inc / Bellerica, USA
Ultrafiltrationsmembran	YM3 1000 Da, 3000 Da Millipore Inc / Bellerica, USA
Ultraschallbad	Sonorex Super RK512H Bandelin / Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	Sorval Discovery 90S Hitachi Kendro / Langenselbold, Deutschland
UNIX-Workstation	Octane Silicon Graphics / Mountain View, USA Octane2

UV/Vis Spektrometer	Silicon Graphics / Mountain View, USA UV-160A
Zentrifugen	Shimadzu Corp. / Kyoto, Japan Centrifuge 5415D, Centrifuge 5084Rr Eppendorf / Hamburg, Deutschland
Bildbearbeitung	Adobe Illustrator CS2, CorelDraw 12
Molmassenberechnung & Strukturdarstellung	ISIS Draw 2.4, ChemDraw Ultra 9.0
MALDI-TOF	XMass 4.1
Spektrenauswertung	
NMR-Spektrenauswertung	XWIN-NMR 3.1, TopSpin 1.3
SPR-Datenauswertung	Origin PRO 7.5, Microsoft Excel 2003
SPR-Spektrenaufnahme & Spektrenauswertung	Biacore J Control Software V 1.1, Biacore BiaViewer Software V 3.2
Kulturgefäße für Zellzucht	Tissue culture flask, vented cap, 175 cm ² Sarstedt GmbH / Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt GmbH / Nümbrecht, Deutschland
Spin-Tubes	CoStar Centrifuge Filter <i>Spin-X</i> (0.22 µm <i>Cellulose Acetat</i>) CoStar Centrifuge Filter <i>Spin-X</i> (0.22 µm <i>Nylon</i>) Corning Incorp. / Cambridge, USA

7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

7.3.1 AAV 1: Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierten Peptidsynthesen wurden im *continous flow*-Verfahren an einem Peptidsynthesizer (*Pioneer Peptide Synthesis*; PerSeptive Biosystems; Wiesbaden) durchgeführt.

Das PAL-PEG-Harz wird nach Einwiegen in eine Glassäule mit Stempelboden durch mehrmaliges Waschen mit 2 mL 2-Propanol und anschließender destillativer Trocknung im Wasserstrahlpumenvakuum von Feuchtigkeitsspuren befreit. Das Harz wird anschließend 5 Minuten mit 2 mL DMF bedeckt, um es aufquellen zu lassen. Die Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird mittels zweimaliger Bedeckung mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für

jeweils 10 min durchgeführt. Um das Piperidin vollständig zu entfernen wird das Harz dreimal mit DMF gewaschen. Nach dem Waschen des Harzes wird die jeweilige Aminosäure in DMF gelöst und zyklisch durch die Reaktionssäule gepumpt. Als Aktivator wird TBTU (0.5 M in DMF) in Gegenwart der Base DIPEA im jeweils fünffachen Überschuss eingesetzt. Es werden dreifach Kupplungen mit sequenzabhängigen variablen Kupplungszeiten von 30 bis 120 Minuten durchgeführt.

Die Blockierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen erfolgt durch zweimalige Acetylierung für jeweils 10 min mit einer Mischung aus Ac₂O/DMF (1:9). Anschließend wird das Harz fünfmal mit DMF gewaschen, um das Ac₂O vollständig zu entfernen. Der nächste Syntheszyklus beginnt wiederum mit dem Abspalten der terminalen Fmoc-Schutzgruppe. Die o.g. Schritte werden wiederholt bis die gewünschte Sequenzlänge erreicht ist. Abschließend wurde das Harz je zweimal mit Dichlormethan und 2-Propanol gewaschen und im Stickstoffstrom für 10 min getrocknet. Die Fmoc-Schutzgruppe der terminalen Aminosäure wird zur manuellen Bestimmung der Rohausbeute am Harz belassen.

7.3.2 AAV 2: Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens (Fmoc-Wert) zur Bestimmung der Rohausbeute

Die photometrischen Bestimmungen wurden an einem UV-Photometer *UV-160A* der Firma Shimadzu Corp., Kyoto, Japan durchgeführt.

Zur Bestimmung der Rohausbeute mit Hilfe des abgespaltenen Methylenfluorens in Lösung wird das Harz mit 2 mL Piperidin/DMF 1:4 bedeckt und für 15 min geschüttelt. Anschließend wird je viermal mit 2 mL DMF gewaschen und die Reaktionslösung in einen abgedunkelten Kolben überführt. Die o. g. Schritte werden ein zweites Mal durchgeführt und alle Lösungen vereinigt.

Dem Kolben werden zweimal je 100 µL Reaktionslösung entnommen und zu 1.9 mL DMF gegeben. Die Menge an gelöstem Methylenfluoren wird in einer Glasküvette bei 301 nm ($\epsilon = 7950 \text{ mol/l}$) bestimmt und die Rohausbeute mit Hilfe von Gleichung 3 berechnet. Die Bestimmung der Rohausbeute wird dreimal durchgeführt.

$$\text{Stoffmenge} = \frac{\text{Extinktion} * \text{Verdünnung} * \text{Volumen} \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{L/mol}} \right]}{7.950}$$

Gleichung 3: Berechnung der Stoffmenge anhand des detektierten Methylenfluorens in Lösung.

7.3.3 AAV 3: Manuelle Kupplung der N-Glycosylbausteine

Das am Harz befindliche Peptid wird in eine Glasfritte überführt und die an der Festphase vorhandene Menge an Peptid gemäß AAV 2 bestimmt. Bezogen auf das am Harz befindliche Peptid werden 1 eq N-Glycosylbaustein, 1.5 eq TBTU und 1.5 eq DIPEA hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird für 36 h geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abgetrennt und das Harz

dreimal mit je 3 mL abs. DMF gewaschen. Der Kupplungsschritt wird mit 1.2 eq Baustein, 1.8 eq TBTU und 1.8 eq DIPEA wiederholt. Nach mehrmaligem Waschen mit 2 mL DMF wird das Harz im Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet.

7.3.4 AAV 4: O-Deacetylierung der Glycopeptide an der Festphase

Das an der Festphase befindliche am Saccharidanteil peracetylierte Glycopeptid wird fünfmal mit je 2 mL abs. Methanol gewaschen, mit Hydrazinhydrat / abs. Methanol (1:5) bedeckt und anschließend für 6 h am Schütteltisch belassen.

Abschließend wird das Harz fünfmal mit je 2 mL abs. Methanol gewaschen und im Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet.

7.3.5 AAV 5: Abspaltung von (Glyco-)Peptiden von der Festphase unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen

Das am Harz befindliche (Glyco-)Peptid wird zunächst zweimal mit je 5 mL Methanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wird es mit 5 mL TFA/H₂O/TIPS (95:5:2) bedeckt und 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit wird die Reaktionslösung in einen Kolben überführt und das Harz fünfmal mit je 1 mL Abspalllösung gewaschen. Das Harz wird erneut mit 5 mL TFA/H₂O/TIPS (95:5:2) bedeckt, 30 min geschüttelt und mit je 1 mL Abspalllösung gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden im Ölpumpenvakuum bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert und gefriergetrocknet.

7.3.6 AAV 6: Abspaltung von Cys(*Trt*)-enthaltenden (Glyco-)Peptiden von der Festphase und Formierung einer Disulfidbrücke

Sämtliche Arbeiten werden unter einer Stickstoff- bzw. Argon-Schutzgasatmosphäre unter Verwendung der Schlenk-Technik durchgeführt.

Das noch an der Festphase befindliche voll geschützte Peptid wird zunächst für 30 min im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die frisch hergestellte Abspalllösung (TFA/TIPS/H₂O, 95:5:2) wird fünfmal entgast und mit Stickstoff gespült, um eventuell vorhandenen Sauerstoff zu entfernen. Anschließend wird das Harz zweimal mit je 10 mL Abspalllösung bedeckt und für jeweils 90 min geschüttelt. Nach Überführung der Reaktionslösung in einem Dreihalskolben wird das Harz fünfmal mit je 2 mL Abspalllösung gewaschen und jeweils für 5 min auf dem Schütteltisch belassen.

Die Lösungen werden vereinigt und das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum bis zur Trockene eingeengt. Anschließend wird zum erhaltenen Rohprodukt vorsichtig vollständig entgast und mit Helium gesättigte 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (Richtwert: 50 mL

Lösung auf 1 μmol Peptid) zugegeben. Die erhaltene Suspension wird für 30 min unter Argon im Ultraschallbad homogenisiert. Die Schutzgasbedingungen werden aufgehoben, die Lösung zunächst im offenen Kolben für 2 h und anschließend für 72 h unter Einleitung von Luft-Sauerstoff gerührt.

Nach Ultrafiltration (*cut off* 3000 Da) zur Entsalzung und Abtrennung von Abbruchpeptiden wird der Rückstand gefriergetrocknet und das Rohprodukt erhalten.

7.3.7 AAV 7: Ultrafiltration der Rohprodukte

Die Ultrafiltrationen wurden mit einer Ultrafiltrationszelle *Amicon Modell 8400* und Membranen des Typs *YM3* (*cut off* 1000 und 3000 Da) der Firma Millipore durchgeführt.

Die Ultrafiltrationen werden unter einem Druck von 4.5 bar durchgeführt. Das Rohprodukt wird in 300 mL bidestilliertem H_2O aufgenommen und bis auf 20 mL konzentriert. Der Rückstand wird wiederum mit bidestilliertem H_2O auf 300 mL aufgefüllt. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt und der Rückstand gefriergetrocknet.

7.3.8 AAV 8: Reinigung der Rohprodukte mittels RP-HPLC

Die Aufreinigungen mittels HPLC erfolgten je nach Rohprodukt an einer *BioCad Sprint* Anlage der Firma *Perseptive*, einer *BioCad Sprint 700E* Anlage der Firma *Applied Biosystems* oder einer *LaChrom 7000 series* Anlage der Firma *Merck/Hitachi*.

1 bis 10 mg des jeweiligen gefriergetrockneten Rohproduktes werden je nach verwendeter RP-HPLC-Säule in 1 mL Wasser/Acetonitril/TFA (Verhältnis 95:5:0.1, bzw. 80:20:0.1) oder 1 mL Wasser/Acetonitril (Verhältnis 95:5, bzw. 80:20) aufgenommen. Das Probengemisch wird 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und in ein *Spin-Tube* (Filter: Zelluloseacetat oder Nylon; 0.22 μm) überführt. Anschließend wird die Lösung durch fünfminütige Zentrifugation bei 14000 U/min filtriert.

Das Filtrat wird über die Probenschleife auf eine Trennsäule als stationäre Phase gegeben. Als mobile Phase dienen unterschiedliche Gradienten zwischen den Eluenten C (Wasser/Acetonitril/TFA 95:5:0.1) und Eluent D (Wasser/Acetonitril/TFA 5:95:0.1). Die Elution erfolgt bei Raumtemperatur und einer Flussrate von 1, 5 oder 20 mL/min, die Detektion je nach HPLC-System mittels eines systeminternen UV-Detektors bei 215 nm oder eines DAD-Array-Detektors (Bereich 200-300 nm). Die einzelnen Fraktionen werden über einen angeschlossenen Fraktionssammler gesammelt. Die gemäß UV- bzw. DAD-Diagramm produktenthaltenden Fraktionen werden gefriergetrocknet und mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert.

7.3.9 AAV 9: Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren

Die Aufnahme der MALDI-TOF-MS-Massenspektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma *Bruker*.

Auf einen gerätespezifischen Probenhalter werden 0.5 μL einer Matrixlösung aufgebracht. Als Matrixlösungen für die (Glyco-)Peptidcharakterisierung mittels MALDI-TOF-MS haben sich 2,5-Dihydroxybenzoesäure in 50 % Ethanol / 50 % Acetonitril ($c = 10 \mu\text{M/L}$) und ges. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure in 50 % Ethanol / 50 % Wasser bewährt. Nach Kristallisation der aufgetragenen Matrix werden 0.5 μL der gelösten Probensubstanz (idealerweise $c = 10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) darauf aufgetragen. Je nach Probe werden nach Kristallisation nochmals 0.5 μL Matrix aufgetragen (Schichtpräparation). Nach linearer Kalibrierung an Hand der Vermessung eines bekannten Substanzgemisches (*ES-Tuning Mix*) werden die Proben vermessen. Die Messungen erfolgen bei einer Attenuation von 30-45 AU, einer Beschleunigungsspannung von 19 kV und einer Spannung des Sekundär-Elektronenflusses von 3425 V. Die Anzahl der Laserpulse pro Messung beträgt 10 bis 250.

7.3.10 AAV 10: Aufnahme der ESI-Massenspektren

Die Aufnahme der ESI-Massenspektren erfolgte an einem HP5989B MS *Engine* Massenspektrometer, Ionenquelle HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface, der Firma Hewlett Packard, Böblingen. Je nach Bedarf auch als LC/MS-Kombination mit vorgeschaltetem HPLC-System der *1100 Serie* der Firma *Agilent*, Waldbronn. Als stationäre Phase diente eine *Nucleodur C-18 Pyramid Reverse phase* Säule (250 mm, 4 mm, 3.93 mL, 5 μm , 1 mL/min) der Firma *Macherey-Nagel*, Düren.

1 mg des Rohproduktes wird in 1 mL Lösungsmittel aufgenommen und mit Hilfe eines Zentrifugenfilters filtriert. Je nach Probensubstanz wird für eine bessere Ionisierung Triethylamin zugegeben.

Es werden je nach eingesetzter Probenschleife zwischen 50 und 100 μL Probensubstanz in das Gerät injiziert und die enthaltenen Produkte detektiert. Im Falle des Einsatzes als LC/MS-System wird der Gradientenverlauf dem Verlauf der Reinigung der Rohprodukte (siehe AAV 8) exakt angepasst. Die Detektion der enthaltenen Substanzen erfolgt dann entsprechend zeitabhängig von der Auftrennung und dem Gradientenverlauf.

7.3.11 AAV 11: Aufnahme der NMR-Spektren

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte an einem *DRX 500 MHz*- und einem *Avance 700 MHz*-Spektrometer. Als Probenköpfe wurden ein 5 mm Tripelresonanzprobenkopf (*DRX 500*, $B_0=11.67 \text{ T}$, $\omega(^1\text{H})=499.87 \text{ MHz}$, $\omega(^{13}\text{C})=125.77 \text{ MHz}$) und ein 5 mm Cryo-Tripelresonanzprobenkopf (*Avance 700*, $B_0=16.35$, $\omega(^1\text{H})=700.13 \text{ MHz}$, $\omega(^{13}\text{C})=176.07 \text{ MHz}$) verwendet.

Die NMR-Spektren der (Glyco-)Peptide werden in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei einem pH-Wert von 3.5 bis 4.0 und einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Die Zuordnung der

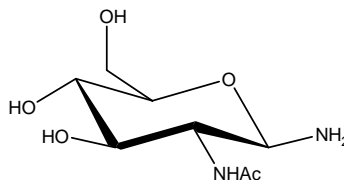
^1H -chemischen Verschiebungen erfolgt mit Hilfe von 1D- ^1H - (Pulsprogramme zg, p3919gp, w5gp, zggpw5) sowie 2D-TOCSY- (Pulsprogramme mlevgpph19, mlevgpphw5) und 2D-NOESY- (Pulsprogramme ngptp19v9, noesygpphw5) Experimenten. Die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals wird durch die WATERGATE-Pulssequenz erreicht.

Die NMR-Spektren der Kohlenhydrate werden in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei einem pH-Wert von 7 und einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Die Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebungen erfolgt mit Hilfe von 1D- ^1H - (Pulsprogramme zg, p3919gp, w5gp, zggpw5) sowie 2D-TOCSY- (Pulsprogramme mlevgpph19, mlevgpphw5), HMBC- (Pulsprogramm inv4gslplrndpr), und HSQC (Pulsprogramm invietgppsp) -Experimenten. Die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals wird durch die WATERGATE-Pulssequenz erreicht.

Die 2D-Spektren werden mit 128 bis 512 Inkrementen in F1 aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm werden 8 bis 40 Scans mit 4k Datenpunkten pro Inkrement aufsummiert. Alle Spektren werden mittels TPPI-Verfahren phasensensitiv aufgenommen. Der Phasenfehler der Spektren wird korrigiert und anschließend eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades durchgeführt. Als *Window*-Funktionen werden in beiden Dimensionen verschobene Quadrat-Sinusfunktionen eingesetzt. Die Nomenklatur der Aminosäuren erfolgt nach der IUPAC-Empfehlung zur Präsentation NMR-spektroskopischer Daten von Proteinen.^{136;136}

7.4 Synthese des *N*-Acetyl-glucosaminasparaginybausteins

7.4.1 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosamin¹⁵⁷ **1**



Die Synthese erfolgte anhand der Vorschrift von Likhoshevstov¹⁵⁷ und wurde in der Umsetzungstemperatur und in der Umsetzungsdauer modifiziert. 500 mg (2.26 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose wurden in 40 mL frisch hergestellter gesättigter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde für 72 h bei 50°C gerührt, wobei in regelmäßigen Abständen portionsweise Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben wurde, um eine Sättigung der Lösung zu gewährleisten. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Laufmittel: EE/MeOH/H₂O; Verhältnis 4:3:2). Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde das Reaktionsgemisch mehrmals bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Eine weitere Aufreinigung wurde nicht vorgenommen.

Ausbeute:

Die Ausbeute betrug 489 mg (2.21 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosamin. Dies entsprach einer Ausbeute von 98 % bezogen auf die eingesetzte 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose.

Charakterisierung

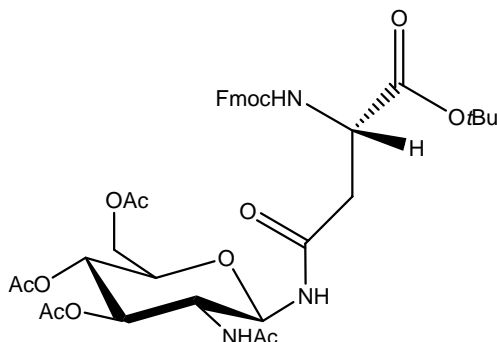
C₈H₁₇N₂O₅; MW = 220.11 g/mol; weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.64 (EE/MeOH/H₂O; 4:3:2)

ESI-MS (10 kV): [M+Na]⁺ = 244.02 m/z; [M+K]⁺ = 261.71 m/z.

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ [ppm] = 1.982 (s, 3H, -CH₃), 3.357 (dd, 1H, ³J_{H4, H5}=8.4 Hz, ³J_{H4, H3}=7.9 Hz, -H₄), 3.458 (dd, 1H, ³J_{H5, H6α}=5.2 Hz, ²J_{H6β, H6α}=3.8 Hz, -H_{6α}), 3.540 (dd, 1H, ³J_{H2, H3}=9.6 Hz, ³J_{H2, H1α}=8.1 Hz, -H₂), 3.562 (dd, 1H, ³J_{H3, H4}=8.5 Hz, ³J_{H3, H2}=7.1 Hz, -H₃), 3.647 (dd, 1H, ³J_{H5, H6β}=12.2 Hz, ²J_{H6α, H6β}=4.7 Hz, -H_{6β}), 3.803 (ddd, 1H, ³J_{H5, H6α}=5.6 Hz, ³J_{H5, H6β}=9.9 Hz, ³J_{H5, H4}=7.0 Hz, -H₅), 4.087 (dd, 1H, ³J_{H2, H3}=9.9 Hz, ³J_{H1α, H2}=6.9 Hz, -H₂), 5.135 (d, 1H, ³J_{H1α, H2}=8.3 Hz, -H_{1α}).

7.4.2 Synthese von C_{α} -*tert*-butyl- N_{α} -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_{γ} -[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin^{154,155,156} **2**



Die Synthese erfolgte anhand der Arbeiten von J.Tost¹⁵⁴, S. Meyer¹⁵⁵ und C. Flügge¹⁵⁶ und wurde auf die Umsetzung mit 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosamin **1** übertragen.

578 mg Fmoc-Asp-*Ot*Bu (1 eq, 1.50 mmol), 600 mg TBTU (1.2 eq, 1.87 mmol) und 320 μ L DIPEA (1.2 eq, 424 μ g, 1.87 mmol) wurden unter Schutzgasatmosphäre in 5 mL abs. DMF gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 10 min gerührt und anschließend unter Schutzgas zu einer auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung aus 332 mg (1 eq, 1.50 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosamin in 15 mL abs. DMF getropft. Die Gesamtlösung wurde anschließend unter Schutzgas bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, wobei die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde (Laufmittel: EE/MeOH/H₂O; 4:3:2). Nach Ablauf von 5 Stunden konnte keine Veränderung des Reaktionsumsatzes mehr beobachtet werden. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt wiederum in 2 mL DMF aufgenommen. Anschließend wurden langsam 20 mL Pyridin/Ac₂O (Verhältnis 2:1) hinzugetropft und für 18 h gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Laufmittel: CHCl₃/MeOH; 9:1). Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde das Rohprodukt erhalten. Abschließend wurde das Rohprodukt mehrfach mit Toluol kodestilliert, um enthaltenes Pyridin zu entfernen.

Die Aufreinigung des Rohproduktes wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mittels einer Mitteldrucksäule durchgeführt (Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1).

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 830 mg (1.13 mmol) Produkt. Dies entsprach einer Ausbeute von 75 % bezogen auf das eingesetzte 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosamin.

Charakterisierung

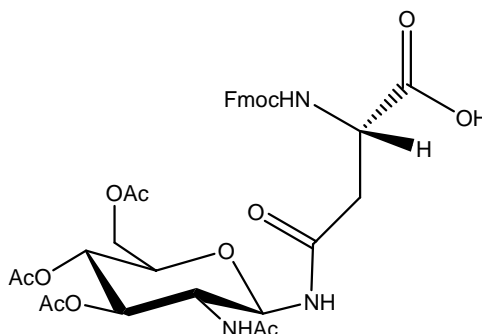
C₃₇H₄₅N₃O₁₃; MW = 739.77 g/mol; bräunlicher Feststoff

R_f -Wert: 0.59 (CHCl₃/MeOH; 9:1)

ESI-MS (10 kV): [M+Na]⁺ = 763.29 m/z

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.480 (s, 9H, -*t*Bu), 1.993 (s, 3H, -NHCOCH₃), 2.079 (s, 3H, -COCH₃), 2.090 (s, 3H, -COCH₃), 2.108 (s, 3H, -COCH₃), 2.731 (dd, 1H, ³J_{AsnCH₂, AsnH α} = 4.3 Hz, ³J_{AsnCH₂, AsnH β} = 7.2 Hz, Asn-CH₂), 2.882 (dd, 1H, ³J_{AsnCH₂', AsnH α} = 4.9 Hz, ³J_{AsnCH₂', AsnH β} = 7.3 Hz, Asn-CH₂'), 3.761 (dd, 1H, ³J_{H₅, H 6α} = 4.8 Hz, ³J_{H_{6\beta}, H 6α} = 3.3 Hz, -H_{6 α}), 4.258 (d, 1H, ³J_{FmocCH, FmocAr} = 7.4 Hz, Fmoc-CH), 4.340 (dd, 1H, ³J_{H₃, H₄} = 8.1 Hz, ³J_{H₅, H₄} = 6.9 Hz, -H₄), 4.345 (dd, 1H, ³J_{H₅, H_{6\beta}} = 11.9 Hz, ³J_{H_{6\alpha}, H_{6\beta}} = 5.9 Hz, -H_{6 β}), 4.459 (t, 1H, ³J_{FmocCH, FmocCH₂} = 4.10 Hz, Fmoc-CH₂), 4.457 (dd, 1H, ³J_{H₄, H₅} = 7.8 Hz, ³J_{H₅, H_{6 $\alpha\beta$}} = 7.9 Hz, -H₅), 4.551 (dd, 1H, ³J_{FmocCH, FmocCH₂'} = 6.4 Hz, ³J_{FmocCH₂, FmocCH₂'} = 4.9 Hz, Fmoc-CH₂'), 5.059 (dd, 1H, ³J_{H₂, H₃} = 8.30 Hz, ³J_{H₁, H₂} = 9.70 Hz, -H₂), 5.156 (dd, 1H, ³J_{H₅, H_{6 $\alpha\beta$}} = 8.1 Hz, ³J_{H₅, H₄} = 9.0 Hz, -H₅), 6.020 (d, 1H, ³J_{H_{1 α} , H₂} = 6.3 Hz, -H_{1 α}), 7.342 - 7.792 (m, 8H, Fmoc).

7.4.3 Synthese von *N* _{α} -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*N* _{γ} -[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-L-asparagin **3**



Die Umsetzung erfolgte anhand der Arbeiten von J.Tost¹⁵⁴, S. Meyer¹⁵⁵ und C. Flügge¹⁵⁶ und wurde auf die Umsetzung von **2** übertragen.

830 mg (1.13 mmol) **2** wurden in 20 mL TFA/H₂O gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt.

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 768 mg (1.13 mmol) Produkt. Dies entsprach einer Ausbeute von 100 % bezogen auf das eingesetzte Edukt **2**.

Charakterisierung

C₃₃H₃₇N₃O₁₃; MW = 683.23 g/mol, bräunlicher Feststoff

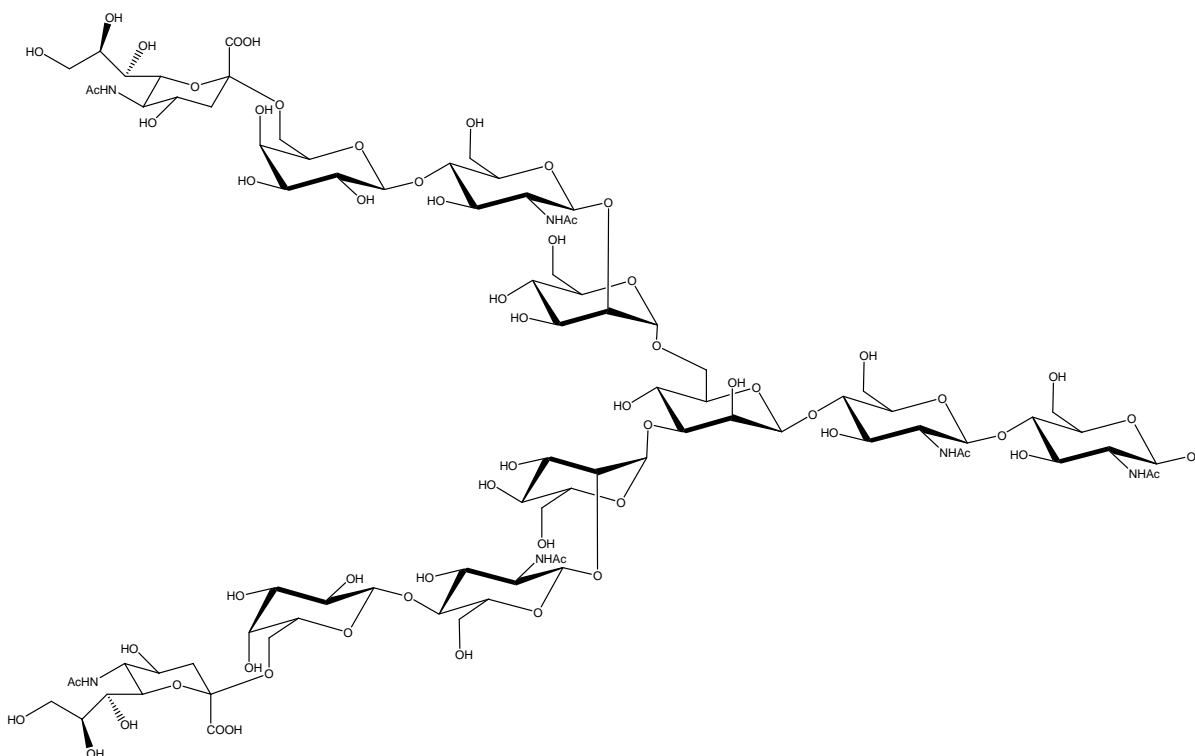
R_f -Wert: 0.69 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; 5:1)

ESI-MS (10 kV): $[\text{M}+\text{Na}] = 706.39 \text{ m/z}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 2.01 (s, 3H, $-\text{NHCOCH}_3$), 2.082 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 2.087 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 2.112 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 2.729 (dd, 1H, $^3J_{\text{AsnCH}_2, \text{AsnH}\alpha} = 4.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{AsnCH}_2, \text{AsnH}\alpha} = 6.8 \text{ Hz}$, $-\text{Asn-CH}_2$), 2.889 (d, 1H, $^3J_{\text{AsnCH}_2', \text{AsnH}\alpha} = 4.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{AsnCH}_2', \text{AsnH}\beta} = 6.5 \text{ Hz}$, $\text{Asn-CH}_2'$), 3.759 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_6\alpha} = 4.9 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H}_6\beta, \text{H}_6\alpha} = 4.0 \text{ Hz}$, $-\text{H}_{6\alpha}$), 4.263 (d, 1H, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocAr}} = 7.4 \text{ Hz}$, Fmoc-CH), 4.352 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 8.0 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_4} = 7.2 \text{ Hz}$, $-\text{H}_4$), 4.351 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_6\beta} = 11.5 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H}_6\beta, \text{H}_6\alpha} = 3.5 \text{ Hz}$, $-\text{H}_{6\beta}$), 4.461 (t, 1H, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocCH}_2} = 4.02 \text{ Hz}$, Fmoc-CH_2), 4.464 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_{4,5}} = 7.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_{4,5}} = 7.5 \text{ Hz}$, $-\text{H}_4$), 4.553 (dd, 1H, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocCH}_2'} = 4.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{FmocCH}, \text{FmocCH}_2'} = 4.7 \text{ Hz}$, $\text{Fmoc-CH}_2'$), 5.068 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 8.30 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7.9 \text{ Hz}$, $-\text{H}_2$), 5.179 (dd, 1H, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_6\alpha} = 8.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_4} = 7.8 \text{ Hz}$, $-\text{H}_5$), 6.101 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_{1\alpha}, \text{H}_2} = 6.4 \text{ Hz}$, $-\text{H}_{1\alpha}$), 7.179 - 7.801 (m, 8 H, Fmoc).

7.5 Synthese des Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-Asparaginylnbausteins

7.5.1 Synthese von NeuNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(NeuNAc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc 4



Die Umsetzung erfolgte basierend der Arbeiten von S. Meyer¹⁵⁵, wurde jedoch in allen Punkten modifiziert, angepasst und optimiert.

Zunächst wurden 30.6 g (320 mmol) Guanidiniumhydrochlorid in 40 mL 0.2 M TRIS-Puffer (pH 8.2) unter Rühren gelöst und 5 g Rinderfibrinogen zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde bis zur völligen Auflösung des Fibrinogens in einem 250 mL Rundkolben in ein Ultraschallbad gegeben. Nach Auftreten einer vollständig klaren Lösung wurden 1.2 g (10 mmol) 1,4-D/L-Threitol zur Lösung gegeben und für 2 Stunden bei RT gerührt.

Anschließend wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch (Sigma D-0405, regenerierte Cellulose, *cut off* 10 kDa) überführt und für 24 h unter fließendem bidestilliertem Wasser dialysiert.

Der während der Dialyse ausgefallene weiße Niederschlag wurde aus dem Dialyseschlauch entfernt und in einer Lösung aus 9.17 g (100 mmol) Guanidiniumhydrochlorid in 12 mL TRIS-Puffer aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde zunächst für 15 min in ein Ultraschallbad gegeben und nach Ablauf der Zeit mit weiteren 100 mL 0.2 M TRIS-Puffer (pH 8.2) versetzt. Nach 15 min Ultraschalleinwirkung bildete sich eine klare Lösung, die mit Hilfe von verdünnter Essigsäure auf pH 7.6 eingestellt wurde. Nach Zugabe von 150 mg Trypsin wurde die Lösung für 48 h bei 37 °C am Schütteltisch inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch (Sigma D-0815, regenerierte Cellulose, *cut off* 1 kDa) überführt und 72 Stunden unter fließendem bidestilliertem Wasser dialysiert. Der ausgefallene Niederschlag wurde bei 3000 U/min in der Zentrifuge abgetrennt und die überstehende Lösung gefriergetrocknet.

Der erhaltene weiße Rückstand wurde unter Ultraschalleinwirkung in 25 mL 50 mM Ammoniumacetat-Lösung aufgenommen und der pH-Wert der Lösung auf pH 8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung für 10 Minuten am Rotationsverdampfer auf 95 °C erhitzt und der pH-Wert geprüft. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurden 25 Einheiten rekombinante N-Glycosidase F hinzugegeben und für 120 Stunden bei 37 °C am Schütteltisch inkubiert.

Die Lösung wurde ultrafiltriert (*cut off* 10.000 Da), der Überstand mit dem enthaltenen Enzym zurückgewonnen und das Filtrat gefriergetrocknet.

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 36 mg (16 µmol) Produkt **4**. Dies entsprach einer theoretischen Ausbeute von 72 % bezogen auf das eingesetzte Edukt, unter der Annahme von 1 % Glycosylierungsanteil im eingesetzten Rinderfibrinogen (siehe Kapitel 4.2).

Charakterisierung

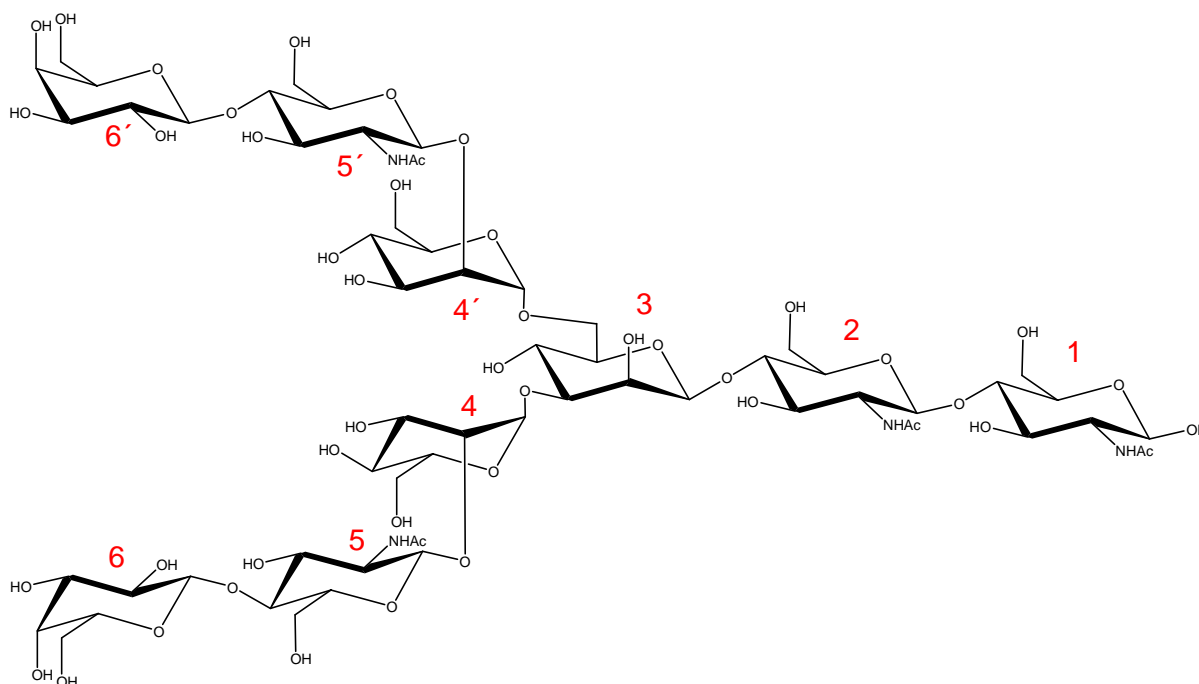
C₈₄H₁₄₂N₆O₆; MW = 2206.79 g/mol; weißer Feststoff

MALDI-TOF-MS (19 kV): $[M+Na] = 2229.7$ m/z; $[M+K] = 2246.7$ m/z

ESI-MS (10 kV): $[M]^{2+} = 1111.99$ m/z

Es wurde keine Charakterisierung mittels NMR vorgenommen, da das Produkt sofort weiter umgesetzt wurde.

7.5.2 Synthese von Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc **5**



30 mg (13.30 μ mol) **4** wurden in 200 mL 2mM Essigsäure aufgenommen. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M Essigsäure auf pH 5 eingestellt. Es wurden 100 μ L Sialidase (150 u) zugegeben und für 96 h bei 37 °C am Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet und ein weißer Rückstand erhalten.

Der Rückstand wurde in 6 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und über eine gemischte Ionentauscher-Säule vorgereinigt. Der Verlauf der Trennung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Laufmittel: 2-Propanol/EE/H₂O; 6:1:3). Nach Vereinigung der produktenthaltenden Fraktionen, deren Detektion mittels MALDI-TOF erfolgte, wurde das Rohprodukt gefriergetrocknet. Der erhaltene weiße Rückstand wurde in 2 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und über eine Biogelsäule (Laufmittel: Wasser) über Nacht aufgereinigt. Alternativ wurde ebenfalls eine Reinigung mittels HPLC an einer RP-NH₂ Säule bei isokratischem Lösungsmittelverlauf vorgenommen.

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 25 mg (15.20 μmol) Produkt **5**. Dies entsprach einer Ausbeute von 95 % bezogen auf das eingesetzte Edukt **4** und 68 % bezogen auf das eingesetzte Glycoprotein (Annahme: 1 % Glycosylierungsanteil^{161, 162}).

Charakterisierung

$\text{C}_{62}\text{H}_{104}\text{N}_4\text{O}_{46}$; MW = 1640.59 g/mol; weißer Feststoff

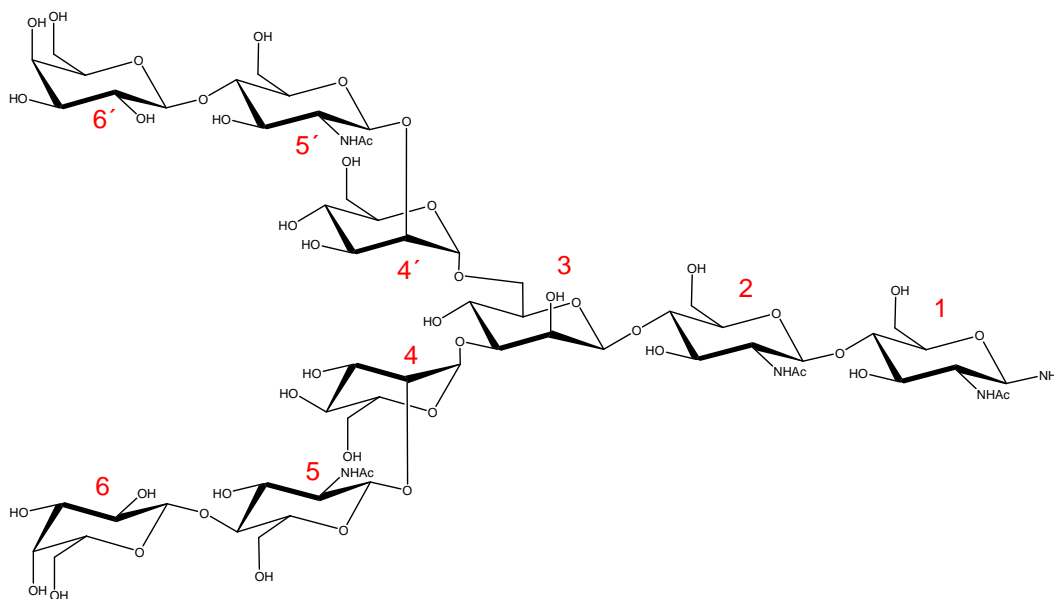
R_f -Wert: 0.18 (2-Propanol/EE/ H_2O ; 6:1:3)

MALDI-TOF-MS (19 mV): $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1663.73 \text{ m/z}$ und $[\text{M}+\text{K}]^+ = 1680.51 \text{ m/z}$

ESI-MS (10 kV): $[\text{M}]^+ = 1641.65 \text{ m/z}$

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 9:1, 500 MHz): δ [ppm] = 1.976 (s, 3H, -1-NAcCH₃), 1.983 (s, 3H, -2-NAcCH₃), 1.985 (s, 3H, -5'-NAcCH₃), 2.017 (s, 3H, -5-NAcCH₃), 3.379 - 3.945 (m, 58H, -H_{sac}), 4.043 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 3.9 \text{ Hz}$, -4'-H2), 4.125 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 4.4 \text{ Hz}$, -4-H2), 4.244 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 3.3 \text{ Hz}$, -3-H2), 4.394 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 4.3 \text{ Hz}$, -6-H1), 4.408 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 4.3 \text{ Hz}$, -6'-H1), 4.513 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 6.3 \text{ Hz}$, -5-H1), 4.520 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \alpha, \text{H}_2} = 6.6 \text{ Hz}$, -5'-H1), 4.559 (d, 1H, -2-H1 β), 4.623 (d, 1H, -2-H1 α), 4.860 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.9 \text{ Hz}$, -4'-H1), 5.052 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 2.2 \text{ Hz}$, -4-H1), 5.128 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \alpha, \text{H}_2} = 2.8 \text{ Hz}$, -1-H1 α), 8.078 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-1, \text{H}\beta} = 8.3 \text{ Hz}$, -1 β -NH), 8.134 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-5, \text{H}\alpha} = 9.4 \text{ Hz}$, -5-NH), 8.173 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-5', \text{H}\alpha} = 8.8 \text{ Hz}$, -5'-NH), 8.268 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-1, \text{H}\alpha} = 9.7 \text{ Hz}$, -1 α -NH), 8.358 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-2, \text{H}\alpha} = 9.2 \text{ Hz}$, -NH₂).

7.5.3 Synthese von Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -NH₂ **6**



25 mg (15.20 μmol) **5** wurden in 20 mL frisch hergestellter gesättigter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde für 72 h bei 50 °C gerührt, wobei in regelmäßigen Abständen portionsweise Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben wurde, um die Sättigung der Lösung zu gewährleisten. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch überwacht (Laufmittel: 2-Propanol/EE/H₂O; 6:1:3). Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde das Reaktionsgemisch mehrfach bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Eine weitere Aufreinigung wurde nicht vorgenommen.

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 25 mg (15.20 μmol) Produkt **6**. Dies entsprach einer Ausbeute von 99 % bezogen auf das eingesetzte Edukt **5**.

Charakterisierung

C₆₂H₁₀₅N₅O₄₅; MW = 1639.51 g/mol; weißer Feststoff

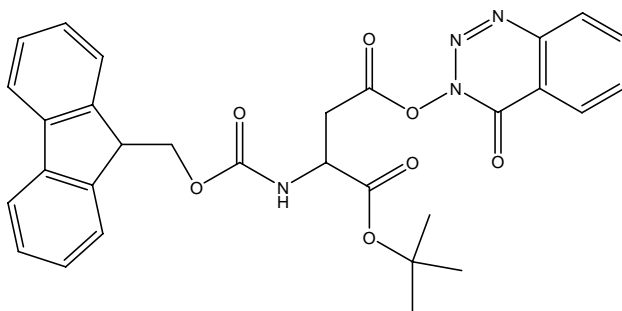
R_f-Wert: 0.25 (2-Propanol/EE/H₂O; 6:1:3)

MALDI-TOF-MS (19 kV): [M+Na]⁺ = 1662.34 m/z und [M+K]⁺ = 1679.51 m/z

ESI-MS (10 kV): [M]⁺ = 1639.01 m/z

¹H-NMR (H₂O/D₂O, 9:1, 500 MHz): δ [ppm] = 1.979 (s, 3H, -1-NAcCH₃), 1.987 (s, 3H, -2-NAcCH₃), 1.999 (s, 3H, -5'-NAcCH₃), 2.006 (s, 3H, -5-NAcCH₃), 3.384 - 3.975 (m, 58H, -H_{sac}), 4.051 (d, 1H, ³J_{H₂,H₃} = 4.0 Hz, -4'-H₂), 4.130 (d, 1H, ³J_{H₂,H₃} = 4.2 Hz, -4-H₂), 4.156 (d, 1H, ³J_{H₂,H₃} = 3.9 Hz, -3-H₂), 4.209 (d, 1H, ³J_{H₁ α ,H₂} = 4.2 Hz, -1-H₁ α), 4.401 (d, 1H, ³J_{H₁,H₂} = 4.2 Hz, -6-H₁), 4.412 (d, 1H, ³J_{H₁,H₂} = 4.1 Hz, -6'-H₁), 4.521 (d, 1H, ³J_{H₁,H₂} = 6.0 Hz, -5-H₁), 4.529 (d, 1H, ³J_{H₁ α ,H₂} = 8.3 Hz, -5'-H₁), 4.568 (d, 1H, -2-H₁ β), 4.650 (d, 1H, -2-H₁ α), 4.868 (d, 1H, ³J_{H₁,H₂} = 4.3 Hz, -4-H₁), 5.088 (d, 1H, ³J_{H₁,H₂} = 3.9 Hz, -4-H₁), 8.085 (d, 1H, ³J_{NH-1,H β} = 8.1 Hz, -1 β -NH), 8.138 (d, 1H, ³J_{NH-5, H α} = 9.7 Hz, -5-NH), 8.189 (d, 1H, ³J_{NH-5', H α} = 8.9 Hz, -5'-NH), 8.279 (d, 1H, ³J_{NH-1, H α} = 9.9 Hz, -1 α -NH), 8.375 (d, 1H, ³J_{NH-2, H α} = 9.4 Hz, -NH₂).

7.5.4 Synthese von Fmoc-Asp(ODhbt)-OtBu¹⁶⁶ **8**



Die Synthese erfolgte anhand der Arbeiten von Meinjohanns, Meldal, Paulsen Dwek und Bock¹⁶⁶ und wurde in den Umsetzungszeiten und Reaktionsbedingungen modifiziert und optimiert.

2.0 g (4.87 mmol) Fmoc-Asp-OtBu wurden in 20 mL abs. THF gelöst und auf -30 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 1.06 g (4.87 mmol) DCC wurde die Lösung 30 min ruhen gelassen und 794 mg (4.87 mmol) Dhbt-OH zugegeben. Anschließend wurde für 4 Stunden bei -30 °C gerührt und danach langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe eines Frittenfilters filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpevakuum destillativ entfernt. Abschließende säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 1:1) ergab Produkt **8**.

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 2.21 g (3.95 mmol) Produkt. Dies entsprach einer Ausbeute von 81 % bezogen auf die eingesetzten Edukte.

Charakterisierung

C₃₀H₂₈N₄O₇; MW = 556.7 g/mol; orange-brauner Feststoff

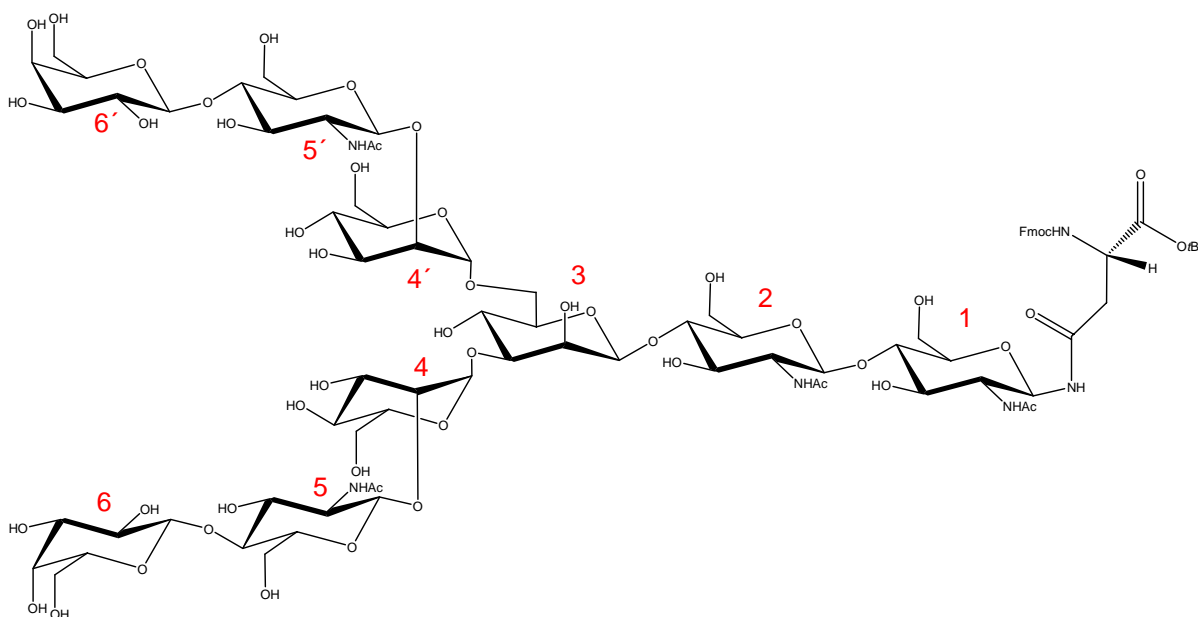
R_f-Wert: 0.39 (PE/EE; 1:1)

ESI-MS (10 kV): [M+Na]⁺ = 579.68 m/z.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.384 (s, 9H, -tBu), 2.563 (dd, 1H, ³J_{HAsp-β',Hα} = 7.9 Hz, ²J_{HAspβ,HAspβ'} = 3.2 Hz, -AspCH₂β'), 2.699 (dd, 1H, ³J_{HAspβ,Hα} = 5.7 Hz, ³J_{HAspβ,HAspα} = 3.1 Hz, -AspCH₂-β), 4.239 (d, 1H, ³J_{CH,CH2} = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 4.288 (t, 2H, ²J_{CH2,CH2'} = 7.1 Hz, Fmoc-CH₂), 4.306 (d, 1H, ³J_{AspHα,AspHβ/β'} = 6.9 Hz, -AspHα), 6.287 (s, 1H, -FmocNH), 7.329 - 7.901 (m, 12 H, Fmoc, Dhbt).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ [ppm] = 28.18 (*-t*Bu), 34.78 (Asn- C_β), 47.99 (Fmoc- CH_2), 50.85 (Asn- C_α), 67.55 (Fmoc-CH), 82.78 (*-t*Bu), 116.05 (Dhbt- Ar_6), 118.78 (Dhbt- Ar_4), 120.44 (Fmoc- $\text{Ar}_{4,4'}$), 125.66 (Fmoc- $\text{Ar}_{3,3'}$), 126.33 (Fmoc- $\text{Ar}_{2,2'}$), 127.50 (Fmoc- $\text{Ar}_{5,5'}$), 130.56 (Dhbt- Ar_5), 132.19 (Dhbt- Ar_7), 136.98 (Fmoc- $\text{Ar}_{6,6'}$), 138.99 (Fmoc- $\text{Ar}_{1,1'}$).

7.5.5 Synthese von C_α -*tert*-butyl- N_α -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_γ -[Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc]-L-asparagin **9**



22.0 mg (14.4 μmol) NH_2 -(GlcNAc) $_2$ Man[(Man-GlcNAc-Gal)] $_2$ **6** wurden in 1.5 mL abs. DMSO aufgenommen und 3.1 μl (1.2 eq, 2.2 μg , 17.3 μmol) DIPEA zugegeben. Die Lösung wurde 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde portionsweise insgesamt 1 eq (8.0 mg, 14.4 μmol) Fmoc-Asp(ODhbt)-*Ot*Bu **8** zugegeben, worauf sich die Lösung tiefgelb färbte. Die Kupplungsreaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Laufmittelgemisch: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 10:4:1). Nach 1 Stunde konnte Edukt **6** nicht mehr nachgewiesen werden, woraufhin das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde zunächst zweimal aus Ethanol umkristallisiert. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer präparativen *RP*- C_{18} -Säule (Eluent C / Eluent D 90/10 \rightarrow 80/20 1CV) \rightarrow 65/35 (8 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), Flussrate 20 mL).

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 21 mg (10 μ mol) Produkt. Dies entsprach einer Ausbeute von 73 % bezogen auf das eingesetzte Edukt **6**.

Charakterisierung

$C_{85}H_{128}N_6O_{50}$; MW = 2032.77 g/mol; tiefbrauner Feststoff

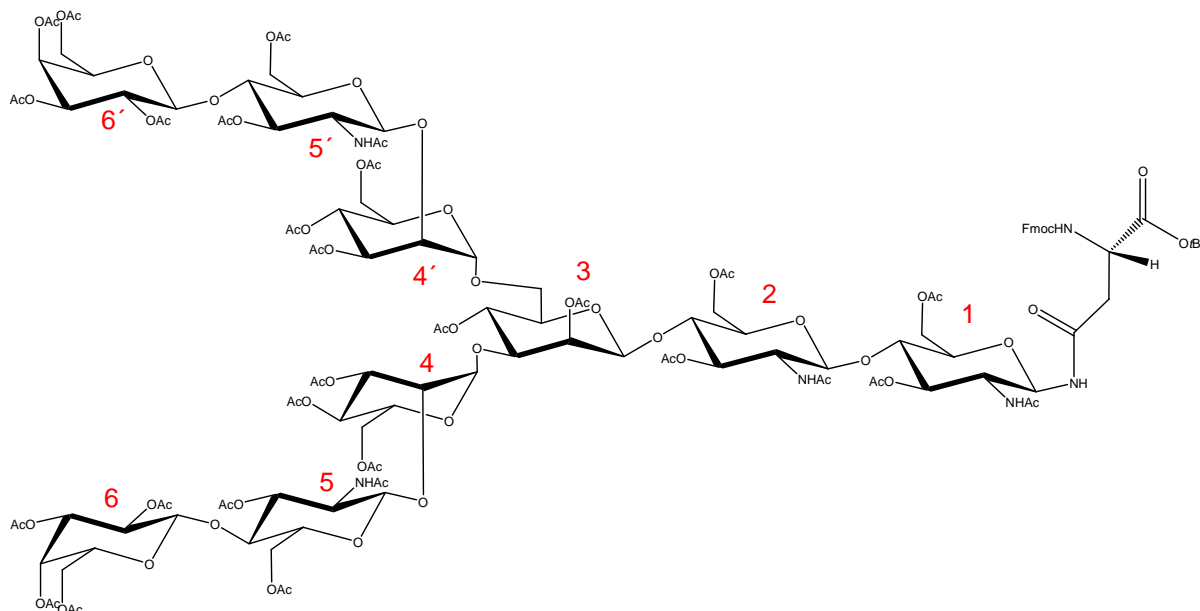
Produkt **9** eluierte nach 35 Minuten bei einem Anteil von 27 % des Eluenten D.

R_f -Wert: 0.35 ($CHCl_3/MeOH/H_2O$; 10:4:1)

MALDI-TOF-MS (19 kV): $[M]^+ = 2032.5$ m/z

1H -NMR (H_2O/D_2O , 9:1, 500 MHz): δ [ppm] = 1.404 (s, 9H, -*t*Bu), 1.963 (s, 3H, -NAcCH₃), 1.969 (s, 3H, -NAcCH₃), 1.974 (s, 3H, -NAcCH₃), 1.994 (s, 3H, -NAcCH₃), 2.819 (d, 1H, $^3J_{CH_2,AsnH\alpha} = 9.4$ Hz, Asn-CH₂), 2.885 (d, 1H, $^3J_{CH_2',AsnH\alpha} = 4.4$ Hz, Asn-CH_{2'}), 3.225 - 4.014 (m, 80 H, -H_{sac}), 4.029 (d, 1H, $^3J_{H_2,H_3} = 4.3$ Hz, -**4'**-H₂), 4.114 (d, 1H, $^3J_{H_2,H_3} = 4.4$ Hz, -**4**-H₂), 4.175 (d, 1H, $^3J_{H_2,H_3} = 4.7$ Hz, -**3**-H₂), 4.388 (d, 1H, $^3J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz, -**6'**-H₁), 4.396 (d, 1H, $^3J_{H_1,H_2} = 3.2$ Hz, -**6**-H₁), 4.516 (m, 2H, -**5**-H₁, -**5'**-H₁), 4.559 (d, 1H, -**2**-H_{1 β}), 4.849 (d, 1H, $^3J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, -**4**-H₁), 5.048 (d, 1H, $^3J_{H_1,H_2} = 2.4$ Hz, -**4**-H₁), 5.114 (d, 1H, $^3J_{H_{1\alpha}, H_2} = 3.4$ Hz, -**1**-H_{1 α}), 5.181 (d, 1H, $^3J_{H_{1\beta}, H_2} = 2.4$ Hz, -**1**-H_{1 β}), 6.157 (d, 1H, -H_{1 α}), 6.909 (d, 1H, (d, 1H, $^3J_{AsnNH,AsnH\alpha} = 11.1$ Hz, -**4**-H₁) -NH), 7.299 - 7.842 (m, 8H, Fmoc), 8.078 (d, 1H, $^3J_{NH-1, H\beta} = 7.6$ Hz, -**1 β** -NH), 8.132 (d, 1H, $^3J_{NH-5, H\alpha} = 9.8$ Hz, -**5**-NH), 8.165 (d, 1H, $^3J_{NH-5', H\alpha} = 9.2$ Hz, -**5'**-NH), 8.250 (d, 1H, $^3J_{NH-1, H\alpha} = 9.7$ Hz, -**1 α** -NH), 8.357 (d, 1H, $^3J_{NH-2, H\alpha} = 9.2$ Hz, -NH₂).

7.5.6 Synthese von C_{α} -*tert*-butyl- N_{α} -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_{γ} -{[Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc]-tetracosyl}-L-asparagin **10**



10.2 mg (5 μ mol) von **9** wurden in 1 mL DMSO aufgenommen. Unter Eiskühlung wurden zu dieser Lösung langsam 5 mL eines Gemisches aus Pyridin in Essigsäureanhydrid (Verhältnis 2:1) zugetropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch und mittels MALDI-TOF MS verfolgt. Nachdem kein weiterer Reaktionsumsatz mehr beobachtet werden konnte wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt in Toluol aufgenommen und mehrfach kodestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde einmal aus Ethanol und einmal aus Methanol umkristallisiert.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer semipräparativen *RP*- C_{18} -Säule (Eluent C / Eluent D 90/10 \rightarrow 80/20 1CV) \rightarrow 65/35 (10 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), Flussrate 5 mL).

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 29 mg (9.6 μ mol) Produkt. Dies entsprach einer Ausbeute von 96 % bezogen auf das eingesetzte Edukt **9**.

Charakterisierung

$C_{133}H_{176}N_6O_{74}$; MW = 3041.02 g/mol; tiefbrauner Feststoff

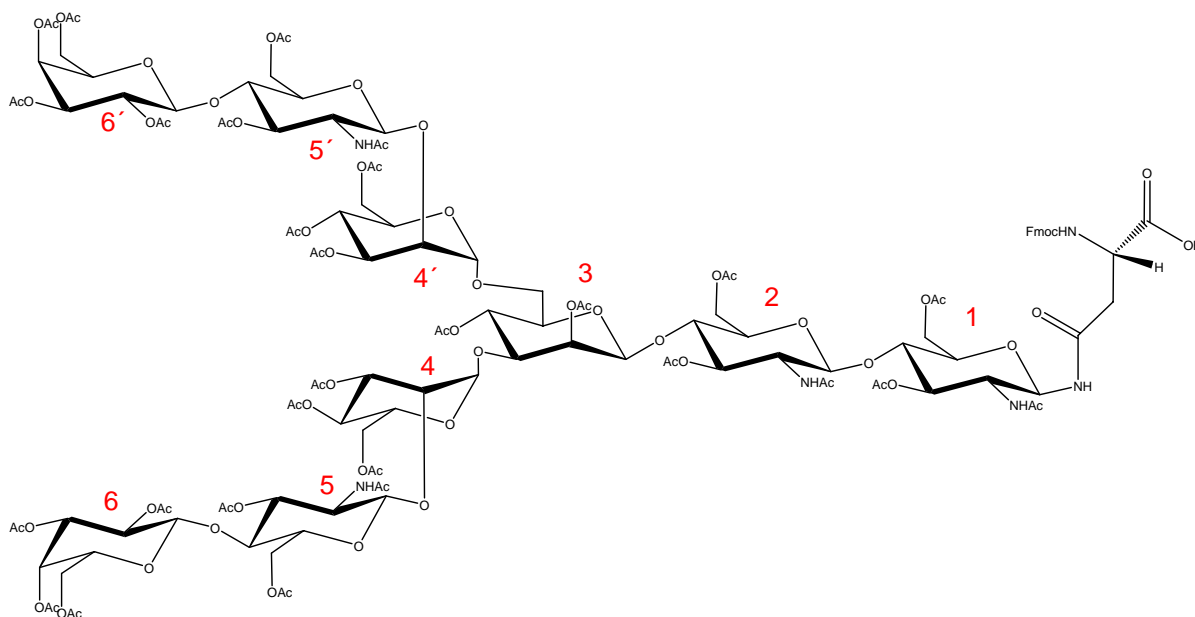
Produkt **10** eluierte nach 35 Minuten bei einem Anteil von 27 % des Eluenten D.

R_f -Wert: 0.42 ($CHCl_3/MeOH$; 1:5)

MALDI-TOF-MS: $[M+Na]^+ = 3040.99 \text{ m/z}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.279 (s, 9H, *-t*Bu), 1.501 (m, 72H, $-\text{H}_{\text{Ac}}$), 2.039 (s, 3H, $-\text{NHCH}_3$), 2.080 (s, 3H, $-\text{NHCH}_3$), 2.104 (s, 6H, $-\text{NHCH}_3$), 2.835 (d, 1H, $^3J_{\text{CH}_2, \text{AsnH}\alpha} = 9.3 \text{ Hz}$, Asn- CH_2), 2.905 (d, 1H, $^3J_{\text{CH}_2', \text{AsnH}\alpha} = 4.9 \text{ Hz}$, Asn- CH_2'), 3.406 - 4.473 (m, 80 H, $-\text{H}_{\text{sac}}$), 4.509 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 5.3 \text{ Hz}$, **-4'-H2**), 4.565 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 4.4 \text{ Hz}$, **-4-H2**), 4.613 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 4.8 \text{ Hz}$, **-3-H2**), 4.696 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.5 \text{ Hz}$, **-6'-H1**), 4.708 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.0 \text{ Hz}$, **-6-H1**), 4.750 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 6.0 \text{ Hz}$, **-5-H1**), 4.756 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1\alpha, \text{H}_2} = 8.3 \text{ Hz}$, **-5'-H1**), 5.079 (d, 1H, **-2-H1 β**), 4.833 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.7 \text{ Hz}$, **-4-H1**), 5.213 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 2.4 \text{ Hz}$, **-4-H1**), 5.281 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1\alpha, \text{H}_2} = 3.4 \text{ Hz}$, **-1-H1 α**), 5.319 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1\beta, \text{H}_2} = 2.4 \text{ Hz}$, **-1-H1 β**), 5.999 (d, 1H, $-\text{H}_{1\alpha}$), 6.809 (d, 1H, (d, 1H, $^3J_{\text{AsnNH}, \text{AsnH}\alpha} = 7.5 \text{ Hz}$, **-4-H1-NH**), 7.341 - 7.893 (m, 8H, Fmoc).

7.5.7 Synthese von N_α -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_γ -[Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc]-L-asparagin **11**



15 mg (5 μmol) von **10** wurden zunächst in 5 mL TFA aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die TFA wurde im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt und das erhaltene Rohprodukt aus Ethanol umkristallisiert.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer semipräparativen *RPC*₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 90/10 \rightarrow 80/20 1CV) \rightarrow 65/35 (10 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), Flussrate 5 mL).

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 14.5 mg (5 μmol) Produkt. Dies entsprach einer Ausbeute von 100 % bezogen auf die eingesetzten Edukte.

Charakterisierung

$\text{C}_{129}\text{H}_{168}\text{N}_6\text{O}_{74}$; MW = 2984.96 g/mol; bräunlicher Feststoff

Produkt **11** eluierte nach 35 Minuten bei einem Anteil von 24 % des Eluenten D

ESI-MS (10 kV): $[\text{M}]^{2+} = 1495.82 \text{ m/z}$

MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 3010.6 \text{ m/z}$.

7.6 Synthese des nicht glycosylierten cyclischen V3-Peptids **12**



7.6.1 Synthese des nicht glycosylierten cyclisierten V3-Peptids **12**

Die Peptidsynthese wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 313 mg eines PAL-PEG-PS-Harzes mit einer Belegung von 160 $\mu\text{mol/g}$ als feste Phase eingesetzt. Dies entsprach 50 μmol freier Bindungsstellen am Harz. Die erste Aminosäure wurde jeweils dreimal 120 min an das Harz gekuppelt, die nachfolgenden Aminosäuren ebenfalls in Dreifachkupplungen für je 30, 60 und 90 Minuten. Aufgrund der gerätespezifischen Kapazität des Synthesizers musste die Peptidsynthese in zwei Abschnitte unterteilt werden. Der erste Sequenzabschnitt umfasste die 33 Aminosäuren $\text{H}_2\text{N}^{301}\text{NNTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS}^{333}\text{-COOH}$. Nach erfolgreich verlaufener Synthese der ersten Teilsequenz wurde direkt mit dem zweiten Teil der Gesamtsynthesesequenz gemäß AAV 1 fortgefahren. Dabei wurde die am Harz befindliche erste Teilsequenz als Festphase verwendet. Auf eine qualitative Bestimmung der Reaktionsausbeute gemäß AAV2 wurde in diesem Zwischenschritt verzichtet, da das automatisierte *Fmoc-monitoring* des Synthesizers auf eine befriedigende Ausbeute schließen ließ. Nach erfolgreich verlaufender Kupplung des zweiten Teilsequenz $\text{H}_2\text{N}^{289}\text{NESVEINCTRPS}^{300}\text{-COOH}$ wurde eine qualitative Bestimmung der Gesamtsyntheseausbeute gemäß AAV 2 vorgenommen. Die Bestimmung ergab einen Wert von 18.5 μmol , dies entspricht einer Gesamtausbeute von 37 % bezogen auf das eingesetzte PAL-PEG-PS Harz.

Das an der Festphase befindliche Peptid wurde gemäß AAV 6 vom Harz abgespalten. Das vollständig entschützte zu cyclisierende Rohprodukt wurde unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in 1 L entgaster, mit Helium gesättigter 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde für 120 min unter Schutzgasbedingungen (Argon) durch

Einwirkung von Ultraschall homogenisiert. Der das Rohprodukt in Lösung enthaltene Kolben wurde geöffnet um den benötigten Luftsauerstoff für die oxidative Bildung einer Disulfidbrücke hinzuzufügen und der offene Kolben für 180 Minuten stark gerührt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde zusätzlich Luftsauerstoff mittels einer Gasfritte in die Lösung gepumpt und für weitere 72 h gerührt. Die Bildung des Produktes **12** konnte durch Detektion mittels MALDI-TOF-MS aus dem Rohprodukt nachgewiesen werden. Die Lösung die das zyklisierte Rohprodukt enthielt wurde filtriert um unlösliche Schutzgruppenreste zu entfernen und das Filtrat gemäß AAV 7 ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung des Filtrates wurde das Rohprodukt erhalten.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer semipräparativen RP-C₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 100/0 → 82/18 (2 CV) → 74/26 (15 CV) → 0/100 (1 CV) → 100/0 (1 CV), Flussrate 5 mL).

Ausbeute:

Es wurden 12 mg (2.4 µmol) des Produktes **12** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 4.8 % bezogen auf die Gesamtbelegung des Harzes und 10 % Cyclisierungsausbeute bezogen auf das eingesetzte Rohprodukt.

Charakterisierung

C₂₀₇H₃₃₂N₆₈O₆₈S₂; MW = 4924.42 g/mol; weißer Feststoff

Das Produkt eluierte nach 35 Minuten bei einem Anteil von 25.75 % des Eluenten D

MALDI-TOF-MS: [M]⁺ = 4925.24 m/z

Die eindeutige Identifizierung des cyclischen Peptids **12** erfolgte durch Aufnahme eines TOCSY-Spektrums und eines NOESY-Spektrums bei 300 K in H₂O/D₂O, pH 3.5 an einem 700 MHz Spektrometer gemäß AAV 11. Nach erfolgter Identifizierung der einzelnen Spinsysteme im TOCSY konnte die Sequenzfolge im NOESY bestätigt werden. Die Tabelle auf der folgenden Seite zeigt die chemischen Verschiebungen der Spin-Systeme der einzelnen Aminosäuren.

AS	NH	α	α'/β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Asn ²⁸⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu ²⁹⁰	8.7017	4.4186	1.9431	2.0850	2.4158	2.4158			
Ser ²⁹¹	8.3921	4.4249	3.7958	3.7958					
Val ²⁹²	8.0818	4.1065	2.0076		0.8581	0.8581			
Glu ²⁹³	8.3027	4.3769	1.8961	1.9955	2.3561	2.3561			
Ile ²⁹⁴	8.1351	4.0691	1.7620		1.2670	1.0852	0.7382		γ'' : 0.8190
Asn ²⁹⁵	8.4339	4.7488	2.7928	2.7003			7.1712	7.4837	
Cys ²⁹⁶	8.4178	4.7232	2.9428	3.1821					
Thr ²⁹⁷	8.2199	4.3104	4.0535	4.0535		1.1302			
Arg ²⁹⁸	8.2079	4.2947	1.7181	1.8086	1.5929	1.5377	3.1244	3.1244	ϵ : 7.107
Pro ²⁹⁹		4.3772	2.353	2.208	1.895	1.969	3.577	3.803	
Ser ³⁰⁰	8.1406	4.4005	3.7634	3.7634					
Asn ³⁰¹	8.1873	4.6583	2.8421	2.7530			7.0650	7.2321	
Asn ³⁰²	8.5369	4.6672	2.8006	2.7349			7.06290	7.2349	
Thr ³⁰³	8.2483	4.3761	3.8041			1.2891			
Arg ³⁰⁴	8.0547	4.2620	1.8084	1.7059	1.5892	1.5237	3.1145	3.1145	ϵ : 7.5759
Lys ³⁰⁵	7.9889	4.4674	1.7430	1.7430	0.7679	0.7679	1.3989	1.3989	ϵ/ϵ' : 2.9034
Ser ³⁰⁶	8.1716	4.4030	3.7560	3.7560					
Ile ³⁰⁷	7.9621	4.1179	1.7472		1.2690	1.1602	0.7641		γ'' : 0.7641
His ³⁰⁸	8.4841	4.6787	3.1434	3.0453			7.1095	7.1095	ϵ' : 8.0313
Ile ³⁰⁹	8.0563	4.2610	1.8025		1.3610	1.2729	0.8730		γ'' : 0.8730
Gly ³¹⁰	8.2010	3.802	3.802						
Pro ³¹¹		4.3886	2.361	2.208	1.959	1.906	3.588	3.755	
Gly ³¹²	8.3578	3.8550	3.7821	3.7821					
Arg ³¹³	8.0297	4.2249	1.7320	1.6370	1.5031	1.5031	3.0883	3.0883	ϵ : 7.0890
Ala ³¹⁴	8.2709	4.2360	1.1743						
Phe ³¹⁵	8.0446	4.4274	2.8241	2.8730			6.7251	6.7251	ϵ/ϵ' : 7.1010
Tyr ³¹⁶	7.8836	4.4693	2.7827	2.9427			7.0650	7.0650	ϵ/ϵ' : 6.7320
Ala ³¹⁷	8.0457	4.2681	1.3203						
Thr ³¹⁸	8.3197	4.2422	3.8803		1.1694				
Gly ³¹⁹	8.4463	3.9078	3.9078						
Glu ³²⁰	8.1204	4.2473	2.0388	1.8956	2.2824	2.2824			
Ile ³²¹	8.1493	4.1018	1.7830		1.3970	1.1051	0.7875		γ'' : 0.7875
Ile ³²²	8.1376	4.0642	1.7651		1.2659	1.0829	0.7581		γ'' : 0.8271
Gly ³²³	8.2991	3.9356	3.8605						
Asp ³²⁴	8.1598	4.6421	2.8260	2.7345					
Ile ³²⁵	8.0040	4.1409	1.7430		1.3091	1.1250	0.8341		γ'' : 0.7657
Arg ³²⁶	8.2664	4.2349	1.7873	1.7126	1.5356	1.5955	3.1309	3.1309	ϵ : 7.1928
Gln ³²⁷	8.0244	4.3017	2.005	1.9039	2.3379	2.3379			ϵ/ϵ' : 7.0892
Ala ³²⁸	8.2065	4.2921	1.1316						
His ³²⁹	8.3711	4.6659	3.2365	3.1290			7.170	7.170	8.2780
Cys ³³⁰	8.3422	4.6722	2.9191	3.1075					
Asn ³³¹	8.6114	4.7341	2.7920	2.7005			7.4121	7.4121	
Val ³³²	7.9278	4.1177	1.7460		0.7639	0.7639			
Ser ³³³	8.0643	4.3841	3.7675	3.7675					

Tabelle 10: ¹H-NMR chemische Verschiebungen des nicht glycosylierten cyclischen V3-Peptids 12.

7.7 Synthese des glycosylierten cyclischen V3-Peptids 14



7.7.1 Synthese des glycosylierten cyclischen V3-Peptids 14

Die Synthese des cyclischen Glycopeptids 14 wurde durch eine Kombination der automatischen Festphasenpeptidsynthese gemäß AAV 1 und der manuellen Kupplung des *N*-Glycosylbausteins 3 gemäß AAV 2 durchgeführt.

626 mg eines PAL-PEG-PS-Harzes mit einer Belegung von 160 $\mu\text{mol/g}$ wurden als feste Phase eingesetzt. Dies entsprach 100 μmol an freien Bindungsstellen auf dem Harz. Die erste Aminosäure wurde dreimal je 120 min in vierfachem Überschuss an das Harz gekuppelt, die nachfolgenden Aminosäuren in Dreifachkupplungen unter vierfachem Überschuss für je 30, 60 und 90 Minuten. Der erste Teilabschnitt umfasste die 32 Aminosäuren umfassende Sequenz ${}_{\text{H}_2\text{N}}\text{-}^{302}\text{NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS}^{333}\text{-COOH}$. Nach erfolgreich verlaufener Synthese wurde eine qualitative Bestimmung der Reaktionsausbeute gemäß AAV2 vorgenommen. Die Bestimmung ergab einen Wert von 72 μmol . Das entspricht einer Gesamtausbeute von 72 % bezogen auf das eingesetzte PAL-PEG-PS Harz.

Das Harz wurde in zwei gleiche Teile geteilt und eine Hälfte im Tiefkühlschrank für spätere Synthesen verwahrt. Die zweite Hälfte wurde für die manuelle Kupplung des *N*-Glycosylbausteins 3 verwendet.

Der Einbau des *N*-Glycosylbausteins 3 erfolgte gemäß AAV 2. Das Harz wurde zum Quellen unter Schutzgasbedingungen für 15 min mit 1 mL abs. DMF bedeckt. Das DMF wurde im Wasserpumpenstrahlvakuum abgesaugt und das Harz wiederum mit 1 mL abs. DMF bedeckt. Die manuelle Kupplung erfolgte zweimal mit je 1.0 eq 3 (36.0 μmol , 24.6 mg), 1.5 eq TBTU (54.0 μmol , 18.0 mg) und 1.5 eq DIPEA (54.0 μmol , 7.1 mg, 9.4 mL) für je 24 h. Die qualitative Ausbeutebestimmung gemäß AAV 2 ergab nach der durchgeführten manuellen Kupplung einen Wert von 27 μmol . Das entspricht einer Glycosylierungsausbeute von 75 %.

Der zweite Abschnitt des Glycopeptids wurde wiederum mittels automatisierter Festphasensynthese an den ersten Abschnitt gekuppelt. Die zwölf Aminosäuren umfassende zweite Teilsequenz ${}_{\text{H}_2\text{N}}\text{-}^{289}\text{NESVEINCTRPS}^{300}\text{-COOH}$ wurde jeweils in Dreifachkupplungen unter vierfachem Überschuss für je 30, 60 und 90 min an die erste Sequenz gekuppelt, wobei die Kupplung der ersten Aminosäure für dreimal je 120 min unter vierfachem Überschuss durchgeführt wurde. Die qualitative Ausbeutebestimmung nach der erfolgreich verlaufenen Synthese gemäß AAV 2 ergab eine Ausbeute von 16 μmol , dies entspricht einer Ausbeute von 59 % gezogen auf den Fmoc-Wert nach der Bausteinkupplung. Das am Harz befindliche am Glycosylanteil peracetylierte Glycopeptid wurde anschließend gemäß AAV 4 *O*-deacetyliert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Das Glycopeptid wurde unter Schutzgasbedingungen gemäß AAV 6 vom Harz abgespalten und das vollständig entschützte zu cyclisierende Rohprodukt in 1 L entgaster, mit Helium gesättigter 1 L 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung für 120 min unter Schutzgas (Argon) mittels Ultraschall homogenisiert. Der das Rohprodukt in Lösung enthaltene Kolben wurde geöffnet um den benötigten Luftsauerstoff für die oxidative Bildung einer Disulfidbrücke hinzuzufügen und der offene Kolben für zunächst für 180 Minuten stark gerührt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde zusätzlich Luftsauerstoff mittels einer Gasfritte eingeleitet und für weitere 72 h gerührt. Die Lösung die das zyklisierte Rohprodukt erhielt wurde filtriert, um unlösliche Schutzgruppenreste zu entfernen und das Filtrat gemäß AAV 7 ultrafiltriert. Nach Gefriertrocknung des Filtrates wurde das Rohprodukt erhalten.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer semipräparativen *RP*-C₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 90/10 → 80/20 1CV) → 65/35 (10 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), Flussrate 5 mL).

Ausbeute:

Es wurden 2.8 mg (0.55 μmol) des Produktes **14** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 1.8 % bezogen auf den gewählten 50 μmol Reaktionsansatz und 3.4 % Cyclisierungsausbeute bezogen auf das eingesetzte Rohprodukt.

Charakterisierung

C₂₁₆H₃₄₉N₆₉O₇₂S₂; MW = 5125.48 g/mol; weißer Feststoff

Produkt **14** eluierte nach 35 Minuten bei einem Anteil von 27 % des Eluenten D.

MALDI-TOF-MS: [M]⁺ = 5125.01 m/z

Die eindeutige Identifizierung des cyclischen Glycopeptids **14** erfolgte durch Aufnahme eines TOCSY-Spektrums und eines NOESY-Spektrums bei 300 K in H₂O/D₂O, pH 3.5 an einem 500 MHz Spektrometer gemäß AAV 11. Nach der durchgeführten Identifizierung der einzelnen Spinsysteme im TOCSY konnte die Sequenzfolge im NOESY bestätigt werden. Die folgenden Tabellen zeigen die chemischen Verschiebungen der glycosidischen Protonen und der Spin-Systeme der einzelnen Aminosäuren.

AS	NH	α	α'/β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Asn ²⁸⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu ²⁹⁰	8.1587	4.2378	2.0355	1.8989	2.2948	2.2948	-	-	-
Ser ²⁹¹	8.3851	4.4320	3.7990	3.7990					
Val ²⁹²	7.8057	4.0925	2.1420		1.0509	1.0509			
Glu ²⁹³	8.3261	4.1090	1.9487	1.8629	2.1819	2.1819			
Ile ²⁹⁴	8.1976	4.0939	1.7841		1.3202	1.1232	0.781		γ'' : 0.855
Asn ²⁹⁵	8.5757	4.6995	2.7875	2.7059			7.0213	7.1034	
Cys ²⁹⁶	8.3434	4.6265	3.1295	3.2065					
Thr ²⁹⁷	8.1193	4.3055	4.3055		1.1625				
Arg ²⁹⁸	8.2906	4.2080	1.7629	1.7630	1.5802	1.5802	3.1321	3.1321	ϵ : 7.1487
Pro ²⁹⁹		4.3249	2.0435	2.0435	1.8961	1.8961	3.8045	3.8045	
Ser ³⁰⁰	8.2383	4.3710	3.8095	3.8095					
Asn ³⁰¹	8.0919	4.5581	2.6591	2.5442			7.0021		ϵ : 7.1689
Asn ³⁰²	8.5183	4.6851	2.7855	2.7053			7.0158		ϵ : 7.2568
Thr ³⁰³	7.9857	4.381		4.7105	1.1641				
Arg ³⁰⁴	8.2975	4.2140	1.7632	1.7632	1.5861	1.5861	3.1430	3.1430	ϵ' : 7.2998
Lys ³⁰⁵	8.1404	4.2290	1.8990	1.7735	1.3070	1.3070	1.6260	1.6260	ζ : 7.5820
Ser ³⁰⁶	8.2589	4.3561	3.798	3.9351					
Ile ³⁰⁷	8.0701	4.1051	1.8710		1.2751	1.1562	0.8562		γ'' : 0.8562
His ³⁰⁸	7.9151	4.4893	3.2353	3.2353					ϵ : 7.7621
Ile ³⁰⁹	8.1342	4.1161	1.7450	1.8950	1.311	1.168	0.8022		γ'' : 0.8022
Gly ³¹⁰	8.2790	3.904	3.904						
Pro ³¹¹		4.3601	2.2190	2.2.2190	1.9546	1.9546	3.7760	3.7760	
Gly ³¹²	8.4190	3.866	3.866						
Arg ³¹³	8.3038	4.2291	1.7672	1.7672	1.5770	1.5770	3.1430	3.1430	ϵ : 7.3852
Ala ³¹⁴	8.2221	4.0905	1.3181						
Phe ³¹⁵	8.0389	4.4780	2.9771	2.8361			6.9821	6.9821	ζ : 7.2356
Tyr ³¹⁶	7.8836	4.4662	2.9542	2.7823			7.0978	7.0978	ϵ : 7.2356
Ala ³¹⁷	7.9310	4.2312	1.2651						
Thr ³¹⁸	8.2742	4.3281	4.1151	1.3071					
Gly ³¹⁹	8.3643	3.8772	3.8772						
Glu ³²⁰	8.0919	4.2130	1.9572	1.8593	2.1583	2.1583			
Ile ³²¹	8.0408	4.1090	1.8821	1.8821	1.1515	1.2782	0.8462		ϵ : 0.8462
Ile ³²²	8.0857	4.0983	1.8710	1.8710	1.1680	1.2775	0.8510		ϵ : 0.8510
Gly ³²³	8.18865	3.8092	3.8092						
Asp ³²⁴	7.9664	4.4903	2.7641	2.9055					
Ile ³²⁵	8.1853	4.0920		1.7840	1.1345	1.3182	0.7710		ϵ : 0.8632
Arg ³²⁶	8.3172	4.2350	1.7731	1.7731	1.5832	1.5832	3.1425	3.1425	ϵ : 7.3045
Gln ³²⁷	8.0918	4.2129	2.1780	2.1780	1.9462	1.8722			ϵ : 6.9898 ϵ' : 7.4999
Ala ³²⁸	8.2454	4.3681	1.3325						
His ³²⁹	7.9035	4.4730	3.2350	3.2350				7.2351	
Cys ³³⁰	8.0432	4.4602	3.0390	3.0390					
Asn ³³¹	8.5184	4.7082	2.7821	2.6912					ϵ : 7.2650
Val ³³²	7.9834	4.1270	2.0985		0.8841	0.8841			
Ser ³³³	8.1457	4.2351	3.8621	3.8621					

Tabelle 11: ¹H-NMR chemische Verschiebungen des glycosylierten cyclisierten V3-Peptids 14.

	NH	NH _{Ac}	1	2	3	4	5	6 _α / 6 _β	Ac
GlcNAc	8.5325	8.0683	4.989	3.762	3.695	3.434	3.554	3.767 3.874	1.9762

Tabelle 12: ¹H-chemische Verschiebungen der glycosidischen Protonen des glycosylierten cyclisierten V3-Peptids **14**.

7.8 Synthese des nicht glycosylierten linearen V3-Peptids **16**



7.8.1 Synthese des nicht glycosylierten linearen V3-Peptids **15**



Die automatisierte Peptidsynthese wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. 313 mg eines PAL-PEG-PS-Harzes mit einer Belegung von 160 μmol/g wurden als feste Phase eingesetzt. Dies entsprach 50 μmol an freien Kupplungspositionen an der Festphase. Die erste Aminosäure wurde jeweils dreimal 120 min an das Harz gekuppelt, die nachfolgenden Aminosäuren ebenfalls in Dreifachkupplungen für je 30, 60 und 90 Minuten. Zunächst wurde die Sequenz ${}_{\text{H}_2\text{N}^-}{}^{302}\text{NTRKSIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHCNVS}{}^{333}\text{.COOH}$ synthetisiert, um das an der Festphase befindliche Peptid in ausreichender Menge für folgende Synthese zur Verfügung zu haben. Nach der erfolgreich verlaufenen Synthese wurde keine qualitative Bestimmung der Gesamtsyntheseausbeute gemäß AAV 2 vorgenommen. Das Harz mit dem noch an der Festphase befindlichen Peptid wurde in vier gleiche Teile unterteilt. Ein Viertel sollte jeweils in den Synthesen **7.9.1** und **7.9.2** eingesetzt werden, während ein Viertel mittels manueller Kupplung zum linearen Peptid **16** umgesetzt wurde. Das verbleibende Viertel des Peptides **15** an der Festphase wurde für spätere Synthesen aufbewahrt.

Ausbeute:

Es wurde keine Ausbeute ermittelt.

7.8.2 Synthese des nicht glycosylierten linearen V3-Peptids **16**

Ein Viertel des noch am Harz befindlichen Peptids **15** wurde in eine Stickstoffritze überführt und zunächst gemäß AAV 2 die freien Aminofunktionen des Peptids bestimmt. Die qualitative Bestimmung ergab einen Wert von 8.1 μmol freier Aminofunktionen.

Das am Harz befindliche terminal ungeschützte Peptid wurde fünfmal mit je 2 mL abs. DMF gewaschen und anschließend mit 1 mL abs. DMF bedeckt. Es wurden 4.0 eq (11 mg, 32 μ mol) TBTU und 4.0 eq (5.6 mL, 4.3 μ g, 32 μ mol) DIPEA in 1 mL abs. DMF gelöst, für 2 min ruhen gelassen und 4 eq (20 mg, 32 μ mol) Fmoc-L-Asn(*Trt*)-OH zugegeben. Die Lösung wurde zum Harz gegeben und das bedeckte Harz für 3 Stunden am Schütteltisch belassen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Eine qualitative Bestimmung der Rohausbeute gemäß AAV 2 ergab einen Wert von 7.9 μ mol. Dies entspricht einer Ausbeute von 98 % bezogen auf die freien Bindungsstellen am eingesetzten Peptid.

Ausbeute:

Es wurden 7.9 μ mol des Produktes **16** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 98 % bezogen auf die Gesamtbelegung des Harzes.

7.8.3 Abspaltung und Aufreinigung des nicht glycosylierten linearen V3-Peptids **16**

Nach mehrmaligem Waschen mit je 2 mL DMF wurde das Peptid **16** unter Schutzgasbedingungen gemäß AAV5 vom Harz abgespalten. Die Lösungsmittel wurden im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde in Wasser aufgenommen, unter Ultraschall homogenisiert und gefriergetrocknet.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in Wasser aufgenommen und zur Entfernung von Schutzgruppenresten filtriert. Das Filtrat wurde gemäß AAV 7 ultrafiltriert (*cut off* 1000 Da). Nach erneuter Gefrier Trocknung wurde das Rohprodukt erhalten.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels RP-HPLC an einer semipräparativen RP-C₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 90/10 → 80/20 1CV) → 65/35 (10 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), Flussrate 5 mL).

Ausbeute:

Es wurden 28 mg (7.8 μ mol) des Produktes **16** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 98 % bezogen auf die Gesamtbelegung des Harzes.

Charakterisierung

C₁₅₄H₂₄₇N₅₁O₄₇S; MW = 3595.75 g/mol; weißer Feststoff

Das Produkt eluierte nach 28 Minuten bei einem Anteil von 26 % des Eluenten D.

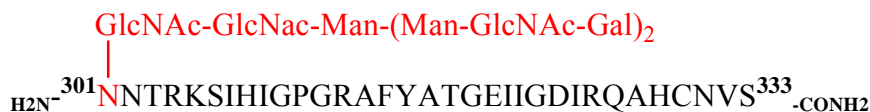
MALDI-TOF-MS: [M+Na]⁺ = 3617.3 m/z

Die eindeutige Identifizierung des linearen nicht glycosylierten Peptids **16** erfolgte durch Aufnahme eines TOCSY-Spektrums und eines NOESY-Spektrums bei 300 K in H₂O/D₂O, pH 3.5 an einem 700 MHz Spektrometer gemäß AAV 11. Nach der durchgeführten Identifizierung der einzelnen Spinsysteme im TOCSY konnte die Sequenzfolge im NOESY bestätigt werden. Die folgende Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Spinsysteme der einzelnen Aminosäuren.

AS	NH	α	α'/β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere
Asn ³⁰¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asn ³⁰²	8.2214	4.6589	2.8339	2.7634			7.2702	7.5990	
Thr ³⁰³	8.0310	4.2290	4.0721			1.1412			
Arg ³⁰⁴	8.3156	4.2570	1.7645	1.7120	1.5599	1.5356	3.107	3.107	ϵ' :7.1965
Lys ³⁰⁵	8.36921	4.2662	1.7489	1.7489	1.3439	1.3105	1.6858	1.3439	ϵ :2.8519
Ser ³⁰⁶	8.2093	4.2478	3.8651	3.7542					
Ile ³⁰⁷	8.1882	4.0720		1.7781	1.2783	1.1860	0.7913		γ'' :0.7913
His ³⁰⁸	8.4279	4.6435	3.2209	3.1175			7.2421	8.4467	
Ile ³⁰⁹	8.1438	4.2071		1.7841	1.3055	1.1551	0.7810		γ'' :0.8590
Gly ³¹⁰	8.4550	3.8810	3.8810						
Pro ³¹¹		4.3740	2.1989	2.1902	1.9305	1.9302	3.6009	3.6009	
Gly ³¹²	8.3581	3.8990	3.8990						
Arg ³¹³	8.0635	4.2120	1.7340	1.7340	1.6375	1.5069	2.8999	2.8999	ϵ : 7.2065
Ala ³¹⁴	8.1150	4.2791	1.1640						
Phe ³¹⁵	8.0245	4.4438	2.8999	2.8999	7.0015	7.0015			ϵ : 7.1120
Tyr ³¹⁶	7.8836	4.4439	2.9346	2.7849					ϵ : 7.1089
Ala ³¹⁷	7.9960	4.2072	1.1642						
Thr ³¹⁸	8.6274	4.3181	4.1394	1.1660					
Gly ³¹⁹	8.2970	3.9947	3.7980						
Glu ³²⁰	8.2335	4.6602	2.0031	1.8851	2.2772	2.2772			
Ile ³²¹	8.0548	4.2949	1.8924	1.3230	1.3075		0.8430		γ'' :0.7606
Ile ³²²	8.0676	4.0939	1.7336	1.3145	1.3105		0.8590		γ'' :0.7678
Gly ³²³	8.2951	3.7985	3.7485						
Asp ³²⁴	8.0940	4.4532	2.9596	2.8471					
Ile ³²⁵	8.2153	4.1004	1.7641	1.3058	1.1799		0.8378		γ'' :0.8378
Arg ³²⁶	8.4292	4.2787	1.7779	1.7066	1.3150	1.3150	1.5725	1.5725	ϵ : 2.9299
Gln ³²⁷	8.0489	4.2896	2.3409	2.010	1.9025				ϵ :7.1621 ϵ' :7.002
Ala ³²⁸	8.2661	4.3692	1.2793						
His ³²⁹	8.4650	4.6355	3.2200	3.1239					ϵ : 7.6998
Cys ³³⁰	8.5590	4.6771	3.1404	3.0419					
Asn ³³¹	8.6372	4.6969	2.8009	2.6999			7.2954	7.1854	
Val ³³²	8.1192	4.0577	2.0715	0.8432					
Ser ³³³	8.4052	4.4470	3.8820	3.8140					

Tabelle 13: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen des nicht glycosylierten linearen V3-Peptids **16**.

7.9 Synthese des glycosylierten linearen V3-Peptids 17



7.9.1 Synthese des glycosylierten linearen Glycopeptids 17

Alle nachfolgenden Schritte wurden unter Schutzgasbedingungen (Argon) durchgeführt. 8 mg (3 μmol) Fmoc-Asn-(GlcNAc)₂Man[(Man-GlcNAc-Gal)]₂ 11 wurden in 0.5 mL abs. DMF aufgenommen. Separat wurden 1.5 eq (1.5 mg, 4.5 μmol) TBTU und 1.5 eq (783 μL , 591 μg , 4.5 μmol) DIPEA in 1 mL abs. DMF aufgenommen und für 5 min ruhen gelassen. Beide Lösungen wurden vereinigt, und unter Schutzgas zu 3.5 μmol des bereits am Harz befindlichen Peptids 15 gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 72 Stunden bei Raumtemperatur am Schütteltisch belassen und die oben angeführten Schritte ein zweites Mal wiederholt.

Nach destillativer Entfernung der Lösungsmittel im Wasserstrahlpumpenvakuum wurde die Rohausbeute des Kupplungsschrittes gemäß AAV 2 bestimmt.

Ausbeute:

Es wurden 750 nmol des am Harz befindlichen Produktes 17 bestimmt. Dies entspricht einer Gesamtausbeute des Glycosylierungsschrittes von 25 % bezogen auf die Belegung des Harzes vor dem Kupplungsschritt.

Charakterisierung

Es wurde keine weitere Charakterisierung vorgenommen.

Das am Harz befindliche und am Glycosylanteil peracetylierte Glycopeptid wurde zunächst für 24 Stunden gemäß AAV 4 *O*-deacetyliert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Das Glycopeptid wurde nach Bedeckung mit 1 mL abs. DMF gemäß AAV5 unter Schutzgasbedingungen vom Harz abgespalten und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde wiederum in Wasser aufgenommen und filtriert, um Schutzgruppenreste zu entfernen. Das erhaltene Filtrat wurde gemäß AAV 7 ultrafiltriert (*cut off* 1000 Da). Nach erneuter Gefrier Trocknung wurde das Rohprodukt erhalten.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels *RP*-HPLC an einer semipräparativen *RPC*₁₈-Säule (Eluent C / Eluent D 90/10 \rightarrow 80/20 1CV) \rightarrow 65/35 (10 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), Flussrate 5 mL).

Ausbeute:

Es wurden 3.8 mg (0.4 μmol) des Produktes **17** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 1.5 % bezogen auf die Gesamtbelegung des Harzes.

Charakterisierung

$\text{C}_{218}\text{H}_{361}\text{N}_{55}\text{O}_{93}\text{S}$; MW = 5264.98 g/mol; weißer Feststoff

Das Produkt eluierte nach 35 Minuten bei einem Anteil von 32 % des Eluenten D.

MALDI-TOF-MS: $[\text{M}]^+ = 5266.6 \text{ m/z}$

Die eindeutige Identifizierung des linearen Glycopeptids **17** erfolgte durch Aufnahme eines TOCSY-Spektrums und eines NOESY-Spektrums bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 3.5 an einem 700 MHz Spektrometer gemäß AAV 11. Nach der durchgeführten Identifizierung der einzelnen Spinsysteme im TOCSY konnte die Sequenzfolge im NOESY bestätigt werden. Die folgenden Tabellen zeigen die chemischen Verschiebungen der glycosidischen Protonen und der Spin-Systeme der einzelnen Aminosäuren.

	NH	NH _{Ac}	1	2	3	4	5	6 _a / 6 _b	Ac
GlcNAc-1-	8.5529	8.0993	5.1220	4.4560	3.7951	3.7021	3.5640	3.8231	1.9311
GlcNAc'-1-		8.2545	4.4851	3.744	3.4591	-	-	3.3471	1.9619
GlcNAc-2-		8.3772	4.7912	4.5392	3.6781	3.5470	3.5210	3.740	1.9710
Man-3-		-							
Man-4-		-							
Man-4'-		-							
GlcNAc-5-		8.1546	4.7590	3.6921	3.6471	3.4930	3.3741	3.6950	1.9469
GlcNAc-5'-		8.1942	4.7570	3.6470	3.6852	3.5191	3.4931	4.513	1.9381
Gal-6-		-							
Gal-6'-		-							

Tabelle 14: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen der glycosidischen Protonen des linearen V3-Glycopeptids **17**.

AS	NH	α	α'/β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Asn ³⁰¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asn ³⁰²	8.2251	4.6682	2.8421	2.7713			7.2421	7.5021	
Thr ³⁰³	7.9945	4.2190	4.2190			1.1583			
Arg ³⁰⁴	8.3139	4.7512	1.7191	1.7191	1.5601	1.2769	2.8483	2.8483	ϵ : 7.2070
Lys ³⁰⁵	8.3676	4.2781	1.7460	1.7460	1.3650	1.3650	1.6661	1.6661	ϵ : 2.8570
Ser ³⁰⁶	8.2051	4.2465	3.8711	3.8711					
Ile ³⁰⁷	8.1848	4.0891		1.7730	1.2763	1.2763	0.8180		γ'' : 0.8180
His ³⁰⁸	8.4268	4.6448	3.2358	3.1231					ϵ : 7.5412
Ile ³⁰⁹	8.1493	4.1360		2.0680	1.1641	1.1641	0.8690		γ'' : 0.8690
Gly ³¹⁰	8.2118	3.7510	3.8630						
Pro ³¹¹		4.3875	2.2120	2.2120	1.9108	1.9108	3.6538	3.6538	
Gly ³¹²	8.3606	3.8821	3.8821						
Arg ³¹³	8.0848	4.3020	1.7430	1.7430	1.6432	1.5070	3.0795	3.0795	ϵ : 7.116
Ala ³¹⁴	8.1219	4.284	1.1580						
Phe ³¹⁵	8.0225	4.4403	2.8974	2.8974	6.9994	6.9994			ϵ : 7.1020
Tyr ³¹⁶	7.8836	4.4389	2.9490	2.7830					ϵ : 7.1085
Ala ³¹⁷	7.9937	4.2170	1.1529						
Thr ³¹⁸	8.6246	4.7075	4.4059	1.1646					
Gly ³¹⁹	8.2945	3.9940	3.8402						
Glu ³²⁰	8.2368	4.2231	2.2830	2.0110					
Ile ³²¹	8.0531	4.2944	1.8931	1.3070	1.3070		0.8580		γ'' : 0.7630
Ile ³²²	8.0654	4.0930	1.7330	1.3130	1.3130		0.8590		γ'' : 0.7571
Gly ³²³	8.2860	3.9690	3.9690						
Asp ³²⁴	8.1001	4.39570	2.9728	2.8425					
Ile ³²⁵	8.2142	4.0999	1.7632	1.2953	1.1822		0.8333		γ'' : 0.8333
Arg ³²⁶	8.4308	4.2728	1.7793	1.7080	1.5720	1.3248	2.9135	2.9135	ϵ' : 7.3115
Gln ³²⁷	8.0475	4.2880	2.3420	2.005	1.9001				ϵ : 7.2325
Ala ³²⁸	8.2675	4.3702	1.2687						
His ³²⁹	8.4643	4.6310	3.2180	3.1230					ϵ : 7.7952
Cys ³³⁰	8.5566	4.6921	3.1491	3.0670	2.706				
Asn ³³¹	8.6247	4.7140	2.8035	2.7049			7.5375	7.4231	
Val ³³²	8.1180	4.0570	2.070	0.8600					
Ser ³³³	8.4106	4.4490	3.8751	3.8751					

Tabelle 15: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen des glycosylierten linearen V3-Peptids 17.

7.10 Versuch der Kettenverlängerung des glycosylierten linearen V3-Peptids 17

7.10.1 Synthese des glycosylierten linearen Glycopeptids 17

Alle nachfolgenden Schritte wurden unter Schutzgasbedingungen (Argon) durchgeführt.

18 mg (6 μ mol) Fmoc-Asn-(GlcNAc)₂Man[(Man-GlcNAc-Gal)]₂ **11** wurden in 0.5 mL abs. DMF gelöst. Separat wurden 1.5 eq (3 mg, 9 μ mol) TBTU und 1.5 eq (1.6 mL, 1.2 mg, 9 μ mol) DIPEA in 0.5 mL abs. DMF gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und unter Schutzgas zu 6 μ mol des bereits am Harz befindlichen Peptids **15** gegeben. Anschließend wurde das bedeckte Harz für 72 Stunden bei Raumtemperatur am Schütteltisch belassen.

Nach Entfernung der Reaktionslösung im Wasserstrahlpumpenvakuum und mehrmaligem Waschen mit 1 mL abs. DMF wurde der Kupplungsschritt wiederholt. Es wurden 14 mg (4.8 μmol) **11** in der Anwesenheit von 1.5 eq TBTU (3 mg, 7.2 μmol) und 1.5 eq (1.6 mL, 1.2 mg, 7.2 μmol) DIPEA zum Harz gegeben und das bedeckte Harz für 72 Stunden am Schütteltisch belassen.

Nach Entfernung der Lösungsmittel im Wasserstrahlpumpenvakuum wurde das Harz mehrmals mit je 1 mL DMF gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend wurde die Rohausbeute gemäß AAV 2 bestimmt.

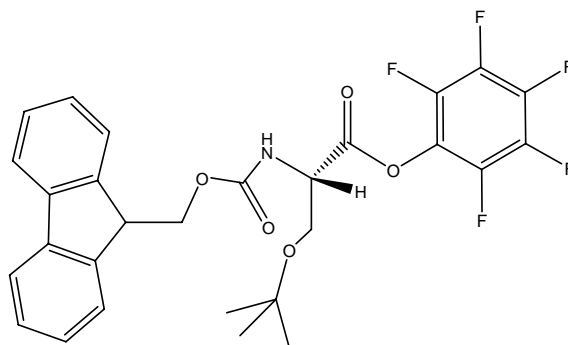
Ausbeute:

Es wurden 2.7 μmol des noch am Harz befindlichen Produktes **17** bestimmt. Dies entspricht einer Gesamtausbeute des Glycosylierungsschrittes von 45 % bezogen auf die Belegung des Harzes vor dem Kupplungsschritt

Charakterisierung

Es wurde keine weitere Charakterisierung vorgenommen.

7.10.2 Synthese des Aktivesters Fmoc-Ser(OtBu)-OPfp^{127,128} **18**



Die Synthese erfolgte anhand der Vorschriften Atherton^{127, 128} und wurde in der Umsetzungstemperatur und Umsetzungsdauer modifiziert.

1.9 mg (5.0 μmol) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH wurden in 2 mL abs. Dioxan aufgenommen und mit einer Lösung aus 1.1 mg (6.0 μmol) Pentafluorphenol in 1 mL abs. Dioxan vereinigt. Die vereinigte Lösung wurde unter Rühren im Eisbad auf -10 °C heruntergekühlt und eine Lösung von 1.24 mg (6.0 μmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 1 mL abs. Dioxan hinzugegeben. Die Gesamtreaktionslösung wurde für 150 min unter Eiskühlung bei -10 °C gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und für 8 Stunden weitergerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Laufmittel: CHCl_3 /MeOH/EE, Verhältnis: 17:2:1). Nach 5 Stunden konnte kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum destillativ entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 1 mL n-Hexan aufgenommen und aus n-Hexan umkristalliert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur fiel das Rohprodukt aus und wurde nach 12 stündiger

Lagerung im Kühlschrank abfiltriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: EE/PE; 1:3) und Produkt **17** erhalten.

Ausbeute:

Es wurden 1.5 mg (2.7 μmol) des Produktes **18** erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 54 % bezogen auf die eingesetzten Edukte.

Charakterisierung

$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{F}_5\text{NO}_5$; MW = 549.16 g/mol; weißer Feststoff

R_f -Wert: 0.41 (EE/PE; 1:3)

ESI-MS (10 kV): $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 582,79 \text{ m/z}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.141 (s, 9H, -tBu), 3.637 (dd, 1H, $^3J_{\text{CH}_2, \text{H}\alpha} = 2.7 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2'} = 2.8 \text{ Hz}$, -CH₂), 3.963 (dd, 1H, $^3J_{\text{CH}_2', \text{H}\alpha} = 2.7 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{CH}_2', \text{CH}_2} = 2.6 \text{ Hz}$ -CH₂'), 4.192 (t, 1H, $^3J_{\text{CH}, \text{CH}_2} = 7.0 \text{ Hz}$, Fmoc-CH), 4.578 (m, 2H, Fmoc -CH₂), 4.807 (m, 1H, $^3J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_2} = 9.1 \text{ Hz}$, -CH _{α}), 7.012 (s, 1H, -NH), 7.235 - 7.690 (m, 8H, Fmoc).

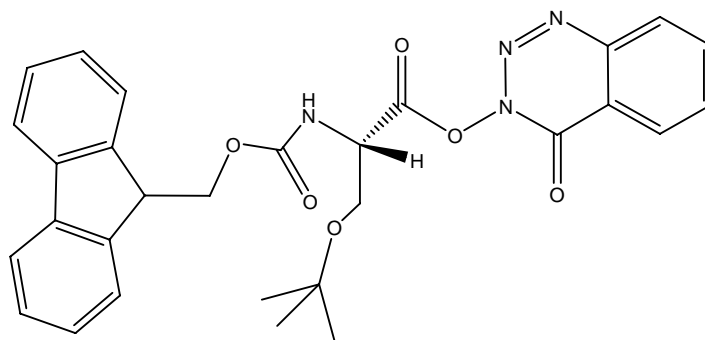
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 27.61 (-tBu), 47.55 (Fmoc-CH₂), 55.10 (Ser-C _{α}), 62.38 (Ser-C _{β}), 67.90 (Fmoc-CH), 120.41 (Fmoc-Ar_{4,4'}), 125.45 (Fmoc-Ar_{3,3'}), 125.49 (Fmoc-Ar_{2,2'}), 127.49 (Fmoc-Ar_{5,5'}), 128.18 (Pfp_{3,3'}), 141.72 (Fmoc-Ar_{6,6'}), 144.07 (Fmoc-Ar_{1,1'}), 144.27 (Pfp₄), 156.46 (Pfp₂), 167.65 (Pfp₂).

7.10.3 Versuch der Kettenverlängerung des Glycopeptids **17** durch Umsetzung mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OPfp **18**

1 μmol des noch am Harz befindlichen Glycopeptids **17** wurde mit 0.25 mL DMF bedeckt. Separat wurden wurden 3 eq Fmoc-Ser(*t*Bu)-OPfp (1.7 mg, 3 μmol) in abs. DMF gelöst, zum Harz gegeben und für 15 Minuten in einen Mikrowellenreaktor gegeben. Dieser Schritt wurde nach Waschen mit DMF viermal wiederholt. Nach der vierten Kupplung wurde gemäß AAV 2 die Rohausbeute der Kupplung bestimmt.

Ausbeute:

Es konnte keine Umsetzung von **17** mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OPfp beobachtet werden. Eine Kettenverlängerung des am Harz befindlichen Peptids konnte nicht erreicht werden.

7.10.4 Synthese des Aktivesters Fmoc-Ser(OtBu)-ODhbt¹⁶⁶ **22**

Die Synthese erfolgte anhand der Arbeiten von Meinjohanns, Meldal, Paulsen Dwek und Bock¹⁶⁶ und wurde in den Umsetzungszeiten und Reaktionsbedingungen modifiziert und optimiert.

1.9 mg (5.0 μmol) Fmoc-Ser(OtBu)-OH wurden in 1 mL abs. THF gelöst und die Lösung auf $-35\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Nach Zugabe von 1.1 mg (5.0 μmol) DCC wurde die Lösung 10 Minuten ruhen gelassen und 1 mg (5 μmol) Dhbt-OH zugegeben. Anschließend wurde die Lösung für 2 Stunden bei $-35\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Das Rohprodukt wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel destillativ am Rotationsverdampfer entfernt. Abschließende säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (Laufmittel: PE/EE 1:1) ergab Produkt **22**.

Ausbeute

Die Ausbeute betrug 2.25 mg (4.25 μmol) Produkt **22**. Dies entsprach einer Ausbeute von 85 % bezogen auf das eingesetzte Edukt Fmoc-Ser(OtBu)-OH.

Charakterisierung

$\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$; MW = 528.56 g/mol; gelblicher Feststoff

R_f -Wert: 0.29 (PE/EE; 1:1)

ESI-MS (10 kV): $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 552.16\text{ m/z}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.316 (s, 9H, -tBu), 3.330 (d, 1H, $^3J_{\text{H}\beta',\text{H}\alpha} = 7.4\text{ Hz}$, Ser- $\text{CH}_2\beta'$), 3.578 (d, 1H, $^3J_{\text{H}\beta,\text{H}\alpha} = 6.2\text{ Hz}$, -Ser- $\text{CH}_2\text{-}\beta$), 4.453 (d, 1H, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 6.8\text{ Hz}$, Fmoc-CH), 4.569 (t, 2H, $^2J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2'} = 7.3\text{ Hz}$, Fmoc- CH_2), 4.756 (m, 1H, $^3J_{\text{SerH}\alpha,\text{SerH}\beta,\text{H}\beta'} = 7.2\text{ Hz}$, -SerH α), 6.987 (s, 1H, -FmocNH), 7.329 (d, 1H, $^3J_{\text{Ar}2,\text{Ar}2'} = 7.2\text{ Hz}$, -FmocArH2/FmocArH2'), 7.398 - 7.893 (m, 12 H, Fmoc, Dhbt).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta[\text{ppm}] = 28.98$ ($-\text{tBu}$), 51.67 (Ser- C_α), 53.58 (Fmoc-CH), 61.74 (Ser- C_β), 68.12 (Fmoc- CH_2), 118.19 (Dhbt- Ar_5), 122.78 (Dhbt- Ar_7), 123.04 (Fmoc- $\text{Ar}_{4,4'}$), 124.69 (Fmoc- $\text{Ar}_{3,3'}$), 127.75 (Fmoc- $\text{Ar}_{2,2'}$), 127.50 (Fmoc- $\text{Ar}_{5,5'}$), 129.78 (Dhbt- Ar_5), 133.13 (Dhbt- Ar_7), 142.11 (Fmoc- $\text{Ar}_{6,6'}$), 146.52 (Fmoc- $\text{Ar}_{1,1'}$), 148.67 (Dhbt- Ar_4).

7.10.5 Versuch der Kettenverlängerung des Glycopeptids **17** durch Umsetzung mit Fmoc-Ser(*O*tBu)-ODhbt **22**

1 μmol des noch am Harz befindlichen Glycopeptids **17** wurde mit 0.25 mL abs. DMF bedeckt. Anschließend wurden jeweils 1 eq (1 mg, 2 μmol) Fmoc-Ser(*t*Bu)-ODhbt und 1 eq (0.4 mg, 2 μmol) DCC gelöst in 0.25 mL abs. DMF zum Harz gegeben. Das bedeckte Harz wurde für 15 min in einen Mikrowellenreaktor gegeben. Diese Schritte wurde nach Waschen mit DMF viermal wiederholt. Nach der vierten Kupplung wurde gemäß AAV 2 die Rohausbeute der Kupplung bestimmt.

Ausbeute:

Es konnte keine Umsetzung von **17** mit Fmoc-Ser-OH beobachtet werden. Eine Kettenverlängerung des am Harz befindlichen Peptids konnte nicht erreicht werden.

7.10.6 Versuch der Kettenverlängerung des Glycopeptids **17** durch Umsetzung mit TBTU als Aktivator

1 μmol des noch am Harz befindlichen Glycopeptids wurde mit 0.25 mL abs. DMF bedeckt. Separat wurden 4 eq (1.3 mg, 4 μmol) Fmoc-Ser-OH, 6 eq (1.1 mL, 788 μg , 6 μmol) DIPEA und 6 eq (1.9 mg, 6 μmol) TBTU in abs. DMF aufgenommen. Die Lösung wurde zum Harz gegeben und das bedeckte Harz für 2 Stunden am Schütteltisch belassen. Nach mehrmaligem Waschen mit abs. DMF wurde die Kupplung viermal wiederholt. Nach der vierten Kupplung wurde gemäß AAV 2 die Rohausbeute der Kupplung bestimmt.

Ausbeute:

Es konnte keine Umsetzung von **17** mit Fmoc-Ser-OH beobachtet werden. Eine Kettenverlängerung des am Harz befindlichen Peptids konnte nicht erreicht werden.

7.10.7 Versuch der Kettenverlängerung des Glycopeptids **17** durch Umsetzung mit HATU als Aktivator

1 μmol des noch am Harz befindlichen Glycopeptids **17** wurde mit 0.25 mL abs. DMF bedeckt. Separat wurden 4 eq (1.3 mg, 4 μmol) Fmoc-Ser-OH, 6 eq (2.3 mg, 6 μmol) HATU und 6 eq (1.0 μL , 0.8 mg, 6 μmol) DIPEA in abs. DMF aufgenommen. Die Lösung wurde zum Harz gegeben und das bedeckte Harz für 2 Stunden am Schütteltisch belassen. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 mL abs. DMF wurden die Kupplungsschritte viermal wiederholt. Nach der vierten Kupplung wurde gemäß AAV 2 die Rohausbeute der Kupplung bestimmt.

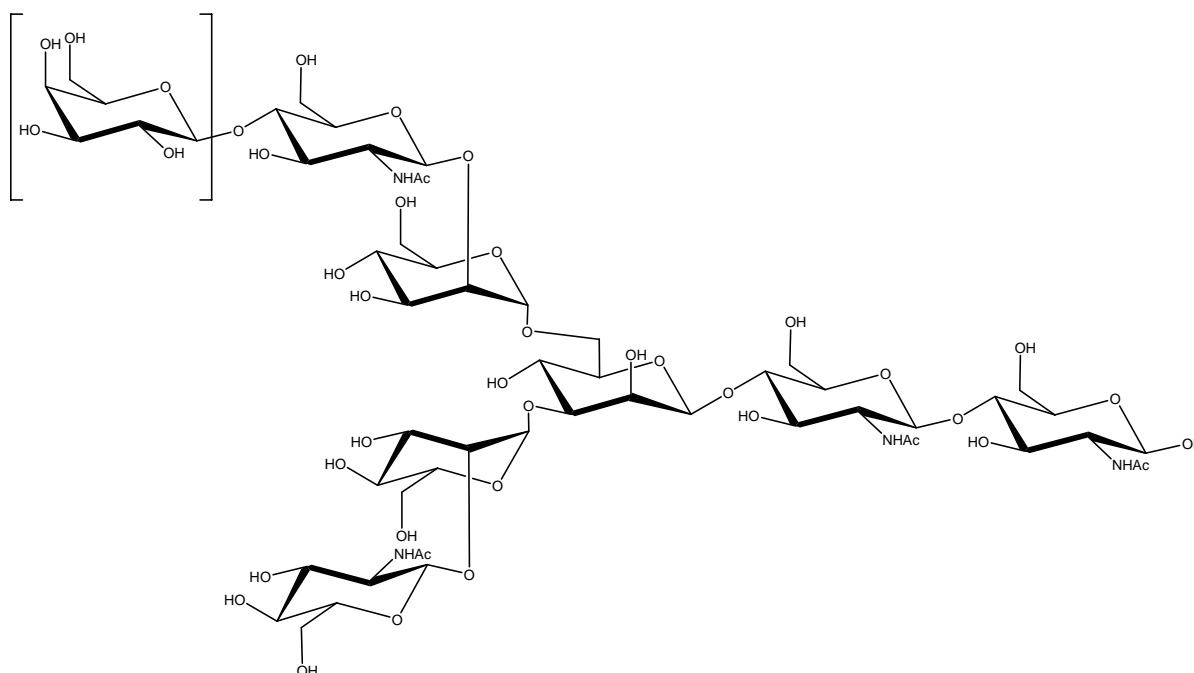
Ausbeute:

Es konnte keine Umsetzung von **17** mit Fmoc-Ser-OH beobachtet werden. Eine Kettenverlängerung des am Harz befindlichen Peptids konnte nicht erreicht werden.

7.11 Enzymatische Modifikationen von Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc

Es wurden verschiedene Versuche unternommen die Kohlenhydratstruktur **5** zu modifizieren bzw. die antennären Seitenketten zu verkürzen.

7.11.1 Synthese von GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc **19** und (Gal β 1-4)GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc **20**



9.5 mg β -Galactosidase (1.27 units/mg Protein) wurden in 1 mL TRIS HCl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Mercaptoethanol, 10 mM Natriumchlorid) aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 10 μ L Natriumphosphat Puffer (0.1 M Natriumphosphat, pH 7.0) hinzugegeben, so dass der Phosphatpuffer zu 1 % im Enzympuffer gelöst wurde. Diese Lösung wurde zu 39.4 mg (24 μ mol) **5** gelöst in 3 mL TRIS Acetat Puffer (10 mM TRIS Acetat, pH 7.5, 10 mM Magnesiumchlorid). Die vereinigten Lösungen wurden für 72 Stunden bei konstanten 37 °C am Schütteltisch belassen. Der Reaktionsverlauf wurde mittels MALDI-TOF-MS verfolgt, wobei das Reaktionsgemisch nach 24, 48 und 72 Stunden vermessen wurde. Nach jeweils 12-stündiger Inkubationszeit wurde der pH-Wert überprüft und auf den ursprünglichen Wert von pH 7.5 eingestellt. Nach 72-stündiger Inkubationszeit konnte kein Edukt mehr festgestellt werden.

Die Reaktionslösung wurde zweimal mittels einer Ultrafiltrationszelle (Membran: regenerierte Cellulose, Durchlässigkeit 1. Filtration: 3000 Da, 2. Filtration: 500 Da) unter einem Druck von 3 bar ultrafiltriert. Der erhaltene Überstand, der sowohl das Heptasaccharid als auch das Octasaccharid beinhaltet, wurde gefriergetrocknet.

Der erhaltene Rückstand wurde in 1 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und gemäß AAV 8 mittel HPLC an einer *RP-NH₂* Säule aufgereinigt (isokratische Aufreinigung, Flussrate 5 mL/min). Die Identifikation erfolgte mittels MALDI-TOF-MS.

Ausbeute:

Es wurden 8.2 mg (6.2 μ mol) des Heptasaccharids **19** erhalten. Dies entspricht 26 % Ausbeute bezogen auf das eingesetzte Edukt. Darüberhinaus wurden 6.5 mg (4.3 μ mol) des Octasaccharids **20** erhalten, was einer Ausbeute von 18 % bezogen auf das Edukt entspricht.

Charakterisierung:

Heptasaccharid:

$C_{50}H_{84}N_4O_{36}$, $M = 1317.21$ g/mol, weißer Feststoff

Das Produkt eluierte nach 4.75 Minuten.

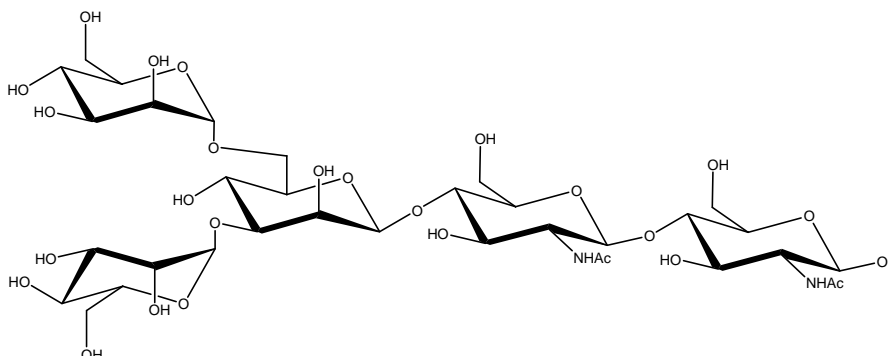
MALDI-TOF-MS (19 kV): $[M+Na]^+ = 1339.5$ g/mol

Octasaccharid:

$C_{54}H_{94}N_4O_{41}$, $M = 1478.54$ g/mol, weißer Feststoff

Das Produkt eluierte nach 6.43 Minuten

MALDI-TOF-MS (19 kV): $[M + Na]^+ = 1501.6$ g/mol

7.11.2 Synthese von $\text{Man}\alpha\text{1-3}(\text{Man}\alpha\text{1-6})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}$ **21**

1.3 mg (1.0 μmol) **19** wurden in 1 mL Tris-HCl Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 175 mM Natriumchlorid) gelöst. Parallel wurde 1 mg *N*-Acetylglucosaminidase (1.27 Units/mg Protein) in 0.25 mL TRIS HCl Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 175 mM Natriumchlorid, 20 mM Mercaptoethanol) in einem separatem Gefäß gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2.5 μL Natriumphosphat Puffer (0.1 M Natriumphosphat, pH 7.0) gegeben, so dass der Phosphatpuffer zu 1 % im Enzympuffer gelöst wurde. Anschließend wurden die Substrat- und Enzymlösungen vereint und am Schütteltisch für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Der Reaktionsverlauf wurde mittels MALDI-TOF-MS verfolgt, wobei das Reaktionsgemisch nach 24, 48 und 72 Stunden vermessen wurde. Nach 12-stündiger Inkubationszeit wurde jeweils der pH-Wert bestimmt und auf den ursprünglichen Wert von pH 7.5 eingestellt. Nach 72-stündiger Inkubationszeit konnte keine weitere Umsetzung der Zwischenprodukte festgestellt werden.

Die Reaktionslösung wurde zweimal mittels einer Ultrafiltrationszelle (Membran: regenerierte Cellulose, *cut off* 1. Filtration: 3000 Da, 2. Filtration: 500 Da) unter einem Druck von 3 bar filtriert. Der erhaltene Überstand wurde gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in 0.25 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und gemäß AAV 8 mittels HPLC an einer *RP-NH*₂ Säule aufgereinigt (isokratische Aufreinigung, Flussrate 5 mL/min).

Ausbeute: 680 μg (0.75 μmol) Pentasaccharid **21**.

Charakterisierung:

$\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{26}$, $M = 910.33$ g/mol, weißer Feststoff

Das Produkt eluierte nach 6.54 Minuten

MALDI-TOF-MS (19 kV): $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 912.2$ g/mol

ESI-MS (10 kV): $[\text{M}]^+ = 910.76$ g/mol

7.12 SPR-Bindungsstudien

7.12.1 Allgemeines zu den SPR-Bindungsstudien

Die SPR-Bindungsstudien wurden an einem *Biacore J* Gerät der Firma *Biacore AB* bei 25 °C durchgeführt. Als Sensorchips wurden CM3 Chips der Firma *Biacore AB* mit kurzer carboxymethylierter Dextran-Matrix und als Laufmittel 0.2 µm-sterilfiltrierter, entgaster PBS-Puffer verwendet. Die Aufnahme der Messdaten erfolgte mit der *Biacore J Control Software*. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der *Biacore J Control Software* und dem Programm *BiaViewer*.

7.12.2 Anzucht und Kultivierung der verwendeten Zellen

Die Zellkulturen der HOS-Zellen wurden bei 37 °C in Kulturschalen mit jeweils 25 mL Wachstumsmedium inkubiert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt bzw. zur Lagerung aliquotiert.

Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 mL sterilem PBS-Puffer gewaschen. Das Ablösen der adhärent wachsenden Zellen von der Oberfläche der Kulturschale wurde durch Zugabe von 8 mL Trypsin-EDTA und anschließender Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C erreicht. Nach der Inkubation wurden 12 mL Wachstumsmedium (94 % RMPI 1640, 5 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in eine Falcon-Tube überführt und bei 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgetrennt und das verbleibende Zellpellet in 20 mL Wachstumsmedium resuspendiert. Je 5 mL Zellsuspension wurden in eine neue Kulturschale überführt, 20 mL Wachstumsmedium zugegeben und bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Da Zellen für eine spätere Kultivierung aufbewahrt werden sollten, wurden diese bei -80 °C gelagert. In diesem Falle wurden nicht alle Zellen in frisches Wachstumsmedium in neuen Kulturschalen überführt. Es wurde zunächst mittels einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop die Zellanzahl pro mL Wachstumsmedium bestimmt. Anschließend wurden die aufzubewahrenden Zellen in Einfriermedium (70 % RMPI 1640, 10 % DMSO, 20 % FKS) resuspendiert, so dass eine Konzentration von ca. $6 \cdot 10^6$ Zellen / mL vorlag. Die Zellsuspension wurde nun in Aliquots von jeweils 1 mL aufgeteilt und bei -80 °C tiefgefroren gelagert.

Um Kontaminationen zu unterbinden wurden alle 4 Wochen Antibiotika zugegeben gegen die die gezüchteten Zellen Resistenzfaktoren besitzen. Die HOS-CCR5-Zellen wurden mittels Zugabe von Puromycin, die HOS-Parentalzellen mittels Zugabe von Neomycin zu einer frischen Zellkultur selektiert.

7.12.3 Präparation der verwendeten Zellen für die SPR-Messungen

Für die SPR-Messungen mit Zellen wurden jeweils täglich zwei Kulturschalen mit den entsprechenden Zellen (HOS-CCR5- oder HOS-Parentalzellen) geerntet. Die Zellen wurden wie in 7.12.2 beschrieben von der Zelloberfläche abgelöst, dreimal in je 1 mL sterilem PBS-Puffer resuspendiert und anschließend mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Hierzu wurden 10 μL Zellsuspension entnommen und mit 30 μL PBS-Puffer versetzt. Dieser Suspension wurden wiederum 10 μL entnommen und mit 10 μL Trypanblau zugegeben. Dieser Suspension wurden 10 μL entnommen und in eine Neubauer Zählkammer überführt. Die Zellen können jetzt ausgezählt und das Verhältnis von vitalen zu nicht-vitalen Zellen bestimmt werden. Zellen die sich durch das Trypanblau schnell blau färben sind nicht-vital, da diese den Farbstoff absorbieren. Es ist zu beachten, dass sich nach ca. 30 Minuten auch vitale Zellen färben. Es wurden nur Zellchargen verwendet, die zu mindestens 90 % vitale Zellen aufwiesen.

Ausgehend von der bestimmten Zellanzahl wurden mit sterilem PBS-Puffer die Konzentrationen von 3600, 1800, 900, 360, 180 und 36 Zellen / mL hergestellt.

7.12.4 Immobilisierung der Verbindungen an CM3-Sensorchips

Die Immobilisierungen erfolgten bei 25 °C mit steril filtriertem und entgastem PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4).

Zunächst wurden Stammlösungen der zu immobilisierenden Produkte hergestellt. Hierfür wurde zunächst 1 mg Produkt in 1 mL PBS-Puffer gelöst, von dieser Lösung 50 μL abgenommen und mit 200 μL Acetatpuffer (10 mM, pH 5.5) aufgefüllt. Flusszelle 1 dient als Messzelle und Flusszelle 4 als Referenzzelle.

Die Aktivierung der Oberflächen der beiden verwendeten Flusszellen erfolgte mittels einer frisch hergestellten Lösung aus 0.05 M NHS und 0.2 M EDC im Verhältnis 1:1. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei einer Flussrate von 30 μL / min über die Chips geleitet.

Anschließend wurde die jeweilige Verbindung immobilisiert. Hierfür wurden jeweils bei einer Flussrate von 30 μL / min für einen Zeitraum von vier bis sechs Minuten die o.g. Stammlösungen injiziert und die gemessenen RU beobachtet. Die erwünschte Chip-Belegung konnte durch mehrfache Injektion der Stammlösungen, über höherkonzentrierte Stammlösungen oder längere Injektionszeiten erreicht werden. Die erwünschte Belegung war vorher berechnet worden und sollte 250 fmol betragen.

Nach erfolgreicher Belegung wurden die noch freien, aktivierten Carboxymethylgruppen auf der Chipoberfläche blockiert. Es wurde einer neuer Lauf gestartet, indem wieder beide Flusszellen angesprochen wurden. Bei einer Flussrate von 30 μL / min wurde für 8 Minuten eine 1 M Ethanolamin/HCL-Lösung (pH 8.5) über beide Flusszellen geleitet, die dadurch *gecappt* wurden.

7.12.5 Durchführung der SPR-Messungen

Die Durchführung der SPR-Messungen erfolgte bei 25 °C und einer Flussrate von 15 µL / min. Als Laufpuffer wurde autoklavierter, steril filtrierter und entgaster PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4) verwendet. Es wurden zunächst Konzentrationsreihen der zu vermessenden Zellen hergestellt. Die Konzentrationen betragen 3600, 1800, 900, 360, 180 und 36 Zellen / mL PBS-Puffer.

Die Zellen wurden sorgfältig resuspendiert und über einen Zeitraum von 12 Minuten in das Gerät injiziert. Die Messungen wurden zunächst bei niedrigen Konzentrationen begonnen und anschließend von hohen Konzentrationen ausgehend wiederholt. Um eine bessere Aussagekraft der Messergebnisse zu erhalten, wurden nach dem Zufallsprinzip auch vereinzelte Messungen der mittleren Konzentrationen als erste einer Messreihe vorgenommen. Nach der Assoziationsphase folgte eine Dissoziationsphase von 3 bis 5 Minuten. Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgte je nach RU-Antwort durch einmütige Injektionspulse von einer SDS-Lösung (0.17 mM bis 1.7 mM) oder einer 50 mM H₃PO₄-Lösung. Nach erfolgter Dissoziation wurde das Flusssystem gespült und bis zur Anzeige einer konstanten Basislinie gewartet.

7.12.6 SPR-Bindungsstudien von V3-Peptiden und –Glycopeptiden mit vitalen Zellen

Für die Untersuchung der spezifischen Bindung der synthetisierten V3-Peptide und V3-Glycopeptide mit dem HIV-Korezeptor CCR5 wurden *HI5-osteosarcoma Zellen* verwendet. Nach Immobilisierung der synthetisierten Peptide und Glycopeptide auf der Sensorchipoberfläche wurden die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen in PBS-Puffer über die Chipoberfläche geleitet. Die Negativkontrolle erfolgte mittels vitaler Parentalzellen, die den CCR5-Korezeptor nicht auf ihrer Oberfläche überexprimieren. Die Präparation und Zucht der Zellen, die Immobilisierung der Peptide und Glycopeptide und die Durchführung der Messungen sind in den Abschnitten 7.12.1 bis 7.12.6 angegeben.

8 Sicherheitshinweise und Toxikologie

Verbindungsname	Gefahrenstoff- symbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
1-Butanol	Xi	10-36/37-67	7/9-13-24/25-26-46
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	
CDCl ₃	Xn	20/22-38-40-48	36/37
Chloroform	Xn	20/22-38-40-48	36/37
Dhbt-OH	Xi	2-36/37/38	26-35
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
2,4-Dihydroxybenzoesäure			24/25
Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45- 61
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
1,4-D/L-Dithiothreitol	Xn	22-36/37/38	22-36
EDC	Xi	37/38-41	26-36/37/39
Ethanol	F	11	7-16
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-23-29-33
HATU	Xi	36/37/38	26-36
n-Hexan	F, Xn, N	11-38-40/20-62-65- 67-51/53	S: (2)-9-16-29-33- 36/37-61-62
Guanidiniumhydrochlorid	Xn	22-36/38	22
Hydrazin	T, N	45-E23/24/25-34- 43-50/53	53-26-36/37/39-45- 60-61
Iodacetamid	T	25-42/43	22-36/37-45
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
NHS	-	-	22-24/25
N,N-Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Natriumazid	T ⁺ , N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Petrolether	F, N	11	9-16 -29-33
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	2-7-16-24/25-26

Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
PNGaseF	Xi	37/38-41	26-36/37/39
Pyridin	F; Xn	11-20/21/22	26-28.1
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Xn	21/22-36/37/38	21/22-36/37/38
TBTU	Xi	36/37/38	26-36
THF (Tetrahydrofuran)	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	Xn	11-20-47	16-25-29-33
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36
Trypan-Blau	T	45	53-45
Trypsin	Xn	36/37/38-42	22-24-26-36/37

9 Literaturverzeichnis

1. Blair W. S., Lin P. F., Meanwell N. A., Wallace O. B., HIV-1 entry - an expanding portal for drug discovery, *Drug Discov Today*, **2000**, 5, 183-94.
2. Gottlieb G. J., Ragaz A., Vogel J. V., Friedman-Kien A., Rywlin A. M., Weiner E. A., Ackerman A. B., A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men, *Am J Dermatopathol*, **1981**, 3, 111-4.
3. Vogt M., Luthy R., Siegenthaler W., The GRID syndrome, *Dtsch Med Wochenschr*, **1982**, 107, 1539-42.
4. 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., Montagnier L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*, **1983**, 220, 868-71.
5. UNAIDS, 2006 - Report on the global AIDS epidemic, **2006**.
6. 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., White G.; Foster P., Markham, P. D., Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS, *Science*, **1984**, 224, 500-3.
7. Johnson W. E., Desrosiers R. C., Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion, *Annu Rev Med*, **2002**, 53, 499-518.
8. Turner B. G., Summers M. F., Structural biology of HIV, *J Mol Biol*, **1999**, 285, 1-32.
9. Franzusoff A., Volpe A. M., Josse D., Pichuantes S., Wolf J. R., Biochemical and genetic definition of the cellular protease required for HIV-1 gp160 processing, *J Biol Chem*, **1995**, 270, 3154-9.
10. Dewhurst S., Whetter L., Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments, *Front Biosci*, **1997**, 2, d147-59.
11. Zhu P., Liu J., Bess J. Jr, Chertova E., Lifson J. D., Grise H., Ofek G. A., Taylor K. A., Roux K. H., Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes, *Nature*, **2006**, 441, 847-52.
12. Berger E. A., Doms R. W., Fenyo E. M., Korber B. T., Littman D. R., Moore J. P., Sattentau Q. J., Schuitemaker H., Sodroski J., Weiss R. A., A new classification for HIV-1, *Nature*, **1998**, 391, 240.
13. Sattentau Q. J., Clapham P. R., Weiss R. A., Beverley P. C., Montagnier L., Alhalabi M. F., Gluckmann J. C., Klatzmann D., The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with

- similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule, *AIDS*, **1988**, 2, 101-5.
14. Dalglish A. G., Beverley P. C., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F., Weiss R. A., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature*, **1984-1985**, 312, 763-7.
 15. Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S., Gruest J., Guetard D., Hercend T., Gluckman J. C., Montagnier L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV, *Nature*, **1984-1985**, 312, 767-8.
 16. Maddon P. J., Dalglish A. G., McDougal J. S., Clapham P. R., Weiss R. A., Axel R., The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain, *Cell*, **1986**, 47, 333-48.
 17. Brady R. L., Barclay A. N., The structure of CD4, *Curr Top Microbiol Immunol*, **1996**, 205, 1-18.
 18. Zhang L. Q., MacKenzie P., Cleland A., Holmes E. C., Brown A. J., Simmonds P., Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection, *J Virol*, **1993**, 67, 3345-56.
 19. Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A., Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature*, **1998**, 393, 648-59.
 20. Kwong P. D., Wyatt R., Sattentau Q. J., Sodroski J., Hendrickson W. A., Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus, *J Virol*, **2000**, 74, 1961-72.
 21. Rizzuto C. D., Wyatt R., Hernandez-Ramos N., Sun Y., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Sodroski J., A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding, *Science*, **1998**, 280, 1949-53.
 22. Sattentau Q. J., Moore J. P., Vignaux F., Traincard F., Poignard P., Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding, *J Virol*, **1993**, 67, 7383-93.
 23. Moore J. P., McKeating J. A., Weiss R. A., Sattentau Q. J., Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4, *Science*, **1990**, 250, 1139-42.
 24. Hart T. K., Kirsh R., Ellens H., Sweet R. W., Lambert D. M., Petteway S. R. Jr, Leary J., Bugelski P. J., Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**, 88, 2189-93.

25. Malashkevich V. N., Singh M., Kim P. S., The trimer-of-hairpins motif in membrane fusion: Visna virus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98, 8502-6.
26. Kay M. S., Silent, but deadly--eliminating reservoirs of latent HIV, *Trends Biotechnol*, **2003**, 21, 420-3.
27. Sharon M., Kessler N., Levy R., Zolla-Pazner S., Gorlach M., Anglister J., Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity, *Structure*, **2003**, 11, 225-36.
28. Scheib H., Sperisen P., Hartley O., HIV-1 coreceptor selectivity: structural analogy between HIV-1 V3 regions and chemokine beta-hairpins is not the explanation, *Structure*, **2006**, 14, 645-7; discussion 649-51.
29. Edelmann. Coloured TEM of HIV Virus Penetrating a T Cell. [www.sciencephoto.com M050/502](http://www.sciencephoto.com/M050/502). 2006.
30. Stilianakis N. I., Schenzle D., On the intra-host dynamics of HIV-1 infections, *Math Biosci*, **2006**, 199, 1-25.
31. Wei X., Ghosh S. K., Taylor M. E., Johnson V. A., Emini E. A., Deutsch P., Lifson J. D., Bonhoeffer S., Nowak M. A., Hahn B. H., Michael S. Saag & George M. Shaw, Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection, *Nature*, **1995**, 373, 117-22.
32. Mocroft A., Ledergerber B., Katlama C., Kirk O., Reiss P., d'Arminio Monforte A., Knysz B., Dietrich M., Phillips A. N., Lundgren J. D., Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study, *Lancet*, **2003**, 362, 22-9.
33. Fernandez E. J., Lolis E., Structure, function, and inhibition of chemokines, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2002**, 42, 469-99.
34. Berger E. A., Murphy P. M., Farber J. M., Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease, *Annu Rev Immunol*, **1999**, 17, 657-700.
35. Horuk R., Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields, *Immunol Today*, **1999**, 20, 89-94.
36. Alexander, S P H, Mathie, A, and Peters, J A. Chemokine. S26-S28. 2006.
37. McNicholl J. M., Smith D. K., Qari S. H., Hodge T., Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele, *Emerg Infect Dis*, **1997**, 3, 261-71.

38. Berson J. F., Long D., Doranz B. J., Rucker J., Jirik F. R., Doms R. W., A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains, *J Virol*, **1996**, 70, 6288-95.
39. Alkhatib G., Combadiere C., Broder C. C., Feng Y., Kennedy P. E., Murphy P. M., Berger E. A., CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1, *Science*, **1996**, 272, 1955-8.
40. Moore J., Trkola A., HIV type 1 coreceptors, neutralization serotypes, and vaccine development, *AIDS Res Hum Retroviruses*, **1997**, 13, 733-6.
41. Dimitrov D. S., Xiao X., Chabot D. J., Broder C. C., HIV coreceptors, *J Membr Biol*, **1998**, 166, 75-90.
42. Rucker J., Edinger A. L., Sharron M., Samson M., Lee B., Berson J. F., Yi Y., Margulies B., Collman R. G., Doranz B. J., Parmentier M., Doms R. W., Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses, *J Virol*, **1997**, 71, 8999-9007.
43. Choe H., Farzan M., Konkel M., Martin K., Sun Y., Marcon L., Cayabyab M., Berman M., Dorf M. E., Gerard N., Gerard C., Sodroski J., The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1, *J Virol*, **1998**, 72, 6113-8.
44. Tersmette M., Gruters R. A., de Wolf F., de Goede R. E., Lange J. M., Schellekens P. T., Goudsmit J., Huisman H. G., Miedema F., Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates, *J Virol*, **1989**, 63, 2118-25.
45. Bjorndal A., Deng H., Jansson M., Fiore J. R., Colognesi C., Karlsson A., Albert J., Scarlatti G., Littman D. R., Fenyo E. M., Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype, *J Virol*, **1997**, 71, 7478-87.
46. Cheng-Mayer C., Seto D., Tateno M., Levy J. A., Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host, *Science*, **1988**, 240, 80-2.
47. Connor R. I., Sheridan K. E., Ceradini D., Choe S., Landau N. R., Change in coreceptor use coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals, *J Exp Med*, **1997**, 185, 621-8.
48. Scarlatti G., Tresoldi E., Bjorndal A., Fredriksson R., Colognesi C., Deng H. K., Malnati M. S., Plebani A., Siccardi A. G., Littman D. R., Fenyo E. M., Lusso P., In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression, *Nat Med*, **1997**, 3, 1259-65.

49. Polzer S., Dittmar M. T., Schmitz H., 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*, **2002**, 304, 70-80.
50. Polzer S., Dittmar M. T., Schmitz H., Meyer B., Muller H., Krausslich H. G., Schreiber M., Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1, *Glycobiology*, **2001**, 11, 11-9.
51. BreLOT A., Heveker N., Adema K., Hosie M. J., Willett B., Alizon M., Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses, *J Virol*, **1999**, 73, 2576-86.
52. Chabot D. J., Broder C. C., Substitutions in a homologous region of extracellular loop 2 of CXCR4 and CCR5 alter coreceptor activities for HIV-1 membrane fusion and virus entry, *J Biol Chem*, **2000**, 275, 23774-82.
53. Pontow S., Ratner L., Evidence for common structural determinants of human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity provided through functional analysis of CCR5/CXCR4 chimeric coreceptors, *J Virol*, **2001**, 75, 11503-14.
54. Clevestig P., Pramanik L., Leitner T., 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*, **2006**, 87, 607-12.
55. Hu Q., Napier K. B., Trent J. O., Wang Z., Taylor S., Griffin G. E., Peiper S. C., Shattock R. J., Restricted variable residues in the C-terminal segment of HIV-1 V3 loop regulate the molecular anatomy of CCR5 utilization, *J Mol Biol*, **2005**, 350, 699-712.
56. Platt E. J., Shea D. M., Rose P. P., Kabat D., Variants of human immunodeficiency virus type 1 that efficiently use CCR5 lacking the tyrosine-sulfated amino terminus have adaptive mutations in gp120, including loss of a functional N-glycan, *J Virol*, **2005**, 79, 4357-68.
57. Bieniasz P. D., Cullen B. R., Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection, *Front Biosci*, **1998**, 3, d44-58.
58. Littman D. R., Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis?, *Cell*, **1998**, 93, 677-80.
59. Varki A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130.
60. Sharon N., Lis H., Carbohydrates in cell recognition, *Sci Am*, **1993**, 268, 82-9.
61. Rudd P. M., Elliott T., Cresswell P., Wilson I. A., Dwek R. A., Glycosylation and the immune system, *Science*, **2001**, 291, 2370-6.

62. Freeze H. H., Genetic defects in the human glycome, *Nat Rev Genet*, **2006**, 7, 537-51.
63. Lis H., Sharon N., Protein glycosylation. Structural and functional aspects, *Eur J Biochem*, **1993**, 218, 1-27.
64. Maia, Leite. N-Glycosylation in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* 24, 231-234. 2001.
65. Voet, D. Voet J. G. Pratt C. W. *Lehrbuch der Biochemie*.
66. Berger E. G., How Golgi-associated glycosylation works, *Cell Biol Int Rep*, **1985**, 9, 407-17.
67. Gavel Y., von Heijne G., Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering, *Protein Eng*, **1990**, 3, 433-42.
68. Mellquist J. L., Kasturi L., Spitalnik S. L., Shakin-Eshleman S. H., The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency, *Biochemistry*, **1998**, 37, 6833-7.
69. Kasturi L., Chen H., Shakin-Eshleman S. H., Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors, *Biochem J*, **1997**, 323, 415-9.
70. Montreuil J., Spatial conformation of glycans and glycoproteins, *Biol Cell*, **1984**, 51, 115-31.
71. Leonard C. K., Spellman M. W., Riddle L., Harris R. J., Thomas J. N., 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*, **1990**, 265, 10373-82.
72. Lasky L. A., Groopman J. E., Fennie C. W., Benz P. M., Capon D. J., Dowbenko D. J., Nakamura G. R., Nunes W. M., Renz M. E., Berman P. W., Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein, *Science*, **1986**, 233, 209-12.
73. Modrow S., Hahn B. H., Shaw G. M., Gallo R. C., Wong-Staal F., Wolf H., Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions, *J Virol*, **1987**, 61, 570-8.
74. Moore J. P., Sodroski J., Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein, *J Virol*, **1996**, 70, 1863-72.
75. Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A., Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature*, **1998**, 393, 648-59.

76. Wülfken, J. Entwicklung CD4 bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion. Dissertation . 2001.
77. 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., Kwong P. D., Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core, *Science*, **2005**, 310, 1025-8.
78. Fenouillet E., Gluckman J. C., Jones I. M., Functions of HIV envelope glycans, *Trends Biochem Sci*, **1994**, 19, 65-70.
79. Reitter J. N., Desrosiers R. C., Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein, *J Virol*, **1998**, 72, 5399-407.
80. 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., Shaw G. M., Antibody neutralization and escape by HIV-1, *Nature*, **2003**, 422, 307-12.
81. Gruters R. A., Neeffjes J. J., Tersmette M., de Goede R. E., Tulp A., Huisman H. G., Miedema F., Ploegh H. L., Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase, *Nature*, **1987**, 330, 74-7.
82. Gruters R. A., Neeffjes J. J., Tersmette M., de Goede R. E., Tulp A., Huisman H. G., Miedema F., Ploegh H. L., Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase, *Nature*, **1987**, 330, 74-7.
83. Moritz D., Dirckx L., Mous J., Schneider J., CD4-affinity purification of recombinant and native HIV gp120 and comparison of the affinity constants for the receptor, *FEBS Lett*, **1990**, 275, 146-50.
84. Li Y., Luo L., Rasool N., Kang C. Y., Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding, *J Virol*, **1993**, 67, 584-8.
85. Papandreou M. J., Fenouillet E., Effect of changes in the glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope on the immunoreactivity and sensitivity to thrombin of its third variable domain, *Virology*, **1998**, 241, 163-7.
86. Ezekowitz R. A., Kuhlman M., Groopman J. E., Byrn R. A., A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus, *J Exp Med*, **1989**, 169, 185-96.
87. Fenouillet E., Clerget-Raslain B., Gluckman J. C., Guetard D., Montagnier L., Bahraoui E., Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis, *J Exp Med*, **1989**, 169, 807-22.
88. Lee W. R., Syu W. J., Du B., Matsuda M., Tan S., Wolf A., Essex M., Lee T. H., Nonrandom distribution

- of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1992**, 89, 2213-7.
89. Hemming A., Gram G. J., Bolmstedt A., Losman B., Hansen J. E., Ricksten A., Olofsson S., Conserved N-linked oligosaccharides of the C-terminal portion of human immunodeficiency virus type 1 gp120 and viral susceptibility to neutralizing antibodies, *Arch Virol*, **1996**, 141, 2139-51.
90. Schonning K., Jansson B., Olofsson S., Nielsen J. O., Hansen J. S., Resistance to V3-directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer, *Virology*, **1996**, 218, 134-40.
91. Pollakis G., Kang S., Kliphuis A., Chalaby M. I., Goudsmit J., 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*, **2001**, 276, 13433-41.
92. Ogert R. A., Lee M. K., Ross W., Buckler-White A., Martin M. A., Cho M. W., N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism, *J Virol*, **2001**, 75, 5998-6006.
93. Hartley O., Klasse P. J., Sattentau Q. J., Moore J. P., V3: HIV's switch-hitter, *AIDS Res Hum Retroviruses*, **2005**, 21, 171-89.
94. Chiou S. H., Freed E. O., Panganiban A. T., Kenealy W. R., Studies on the role of the V3 loop in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function, *AIDS Res Hum Retroviruses*, **1992**, 8, 1611-8.
95. Moore J. P., Nara P. L., The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection, *AIDS*, **1991**, 5 Suppl 2, S21-33.
96. Watabe T., Kishino H., Okuhara Y., Kitazoe Y., Fold recognition of the human immunodeficiency virus type 1 V3 loop and flexibility of its crown structure during the course of adaptation to a host, *Genetics*, **2006**, 172, 1385-96.
97. Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L., GenBank, *Nucleic Acids Res*, **2003**, 31, 23-7.
98. Yonezawa A., Hori T., Takaori-Kondo A., Morita R., Uchiyama T., Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1, *J Virol*, **2001**, 75, 4258-67.

99. Speck R. F., Wehrly K., Platt E. J., Atchison R. E., Charo I. F., Kabat D., Chesebro B., Goldsmith M. A., Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop, *J Virol*, **1997**, 71, 7136-9.
100. Wang W. K., Dudek T., Zhao Y. J., Brumblay H. G., Essex M., Lee T. H., CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95, 5740-5.
101. Li H., Li B., Song H., Breydo L., Baskakov I. V., Wang L. X., Chemoenzymatic synthesis of HIV-1 V3 glycopeptides carrying two N-glycans and effects of glycosylation on the peptide domain, *J Org Chem*, **2005**, 70, 9990-6.
102. Pastore C., Nedellec R., Ramos A., Pontow S., Ratner L., Mosier D. E., Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations, *J Virol*, **2006**, 80, 750-8.
103. Javaherian K., Langlois A. J., LaRosa G. J., Profy A. T., Bolognesi D. P., Herlihy W. C., Putney S. D., Matthews T. J., Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1, *Science*, **1990**, 250, 1590-3.
104. Gao F., Weaver E. A., Lu Z., Li Y., Liao H. X., Ma B., Alam S. M., Scarce R. M., Sutherland L. L., Yu J. S., Decker J. M., Shaw G. M., Montefiori D. C., Korber B. T., Hahn B. H., Haynes B. F., Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein, *J Virol*, **2005**, 79, 1154-63.
105. Wu L., Gerard N. P., Wyatt R., Choe H., Parolin C., Ruffing N., Borsetti A., Cardoso A. A., Desjardin E., Newman W., Gerard C., Sodroski J., CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5, *Nature*, **1996**, 384, 179-83.
106. Tugarinov V., Zvi A., Levy R., Hayek Y., Matsushita S., Anglister J., NMR structure of an anti-gp120 antibody complex with a V3 peptide reveals a surface important for co-receptor binding, *Structure*, **2000**, 8, 385-95.
107. Wyatt R., Kwong P. D., Desjardins E., Sweet R. W., Robinson J., Hendrickson W. A., Sodroski J. G., The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein, *Nature*, **1998**, 393, 705-11.
108. Cormier E. G., Dragic T., The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor, *J Virol*, **2002**, 76, 8953-7.

109. Lin Y. L., Portales P., Segondy M., Baillat V., de Boever C. M., Le Moing V., Reant B., Montes B., Clot J., Reynes J., Corbeau P., CXCR4 overexpression during the course of HIV-1 infection correlates with the emergence of X4 strains, *J Acquir Immune Defic Syndr*, **2005**, 39, 530-6.
110. Moulard M., Lortat-Jacob H., Mondor I., Roca G., Wyatt R., Sodroski J., Zhao L., Olson W., Kwong P. D., Sattentau Q. J., Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120, *J Virol*, **2000**, 74, 1948-60.
111. Mitsuyasu R., Immune therapy: non-highly active antiretroviral therapy management of human immunodeficiency virus-infected patients, *J Infect Dis*, **2002**, 185 Suppl 2, S115-22.
112. Murakami T., Zhang T. Y., Koyanagi Y., Tanaka Y., Kim J., Suzuki Y., Minoguchi S., Tamamura H., Waki M., Matsumoto A., Fujii N., Shida H., Hoxie J. A., Peiper S. C., Yamamoto N., Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection, *J Virol*, **1999**, 73, 7489-96.
113. Calabrese L. H., Albrecht M., Young J., McCarthy P., Haug M., Jarcho J., Zackin R., Successful cardiac transplantation in an HIV-1-infected patient with advanced disease, *N Engl J Med*, **2003**, 348, 2323-8.
114. Lusso P., HIV and the chemokine system: 10 years later, *EMBO J*, **2006**, 25, 447-56.
115. Check E., AIDS vaccines: back to 'plan A', *Nature*, **2003**, 423, 912-4.
116. Cocchi F., DeVico A. L., Garzino-Demo A., Arya S. K., Gallo R. C., Lusso P., Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells, *Science*, **1995**, 270, 1811-5.
117. Margolis L., Shattock R., Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved?, *Nat Rev Microbiol*, **2006**, 4, 312-7.
118. Luftig M. A., Mattu M., Di Giovine P., Geleziunas R., Hrin R., Barbato G., Bianchi E., Miller M. D., Pessi A., Carfi A., Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody, *Nat Struct Mol Biol*, **2006**, 13, 740-7.
119. Kullmann, W. Enzymatic Peptide Synthesis. 87. Boca Raton, CRC Press Inc.
120. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., and Boyer, H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198, 1056-63.
77.

121. Merrifield R.B., Peptide synthesis on a solid polymer, *Fed Proc Amer Soc Exp Biol*, **1962**, 21, 412.
122. Carpino L. A., Han G. Y., The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group, *J Org Chem*, **1972**, 37, 3404-9.
123. Pearson D.A., Blanchette M, Baker M.L., Guindon C.A., Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis, *Tetrahedron Lett*, **1989**, 30, 2739-42.
124. Reid G. E., Simpson R. J., Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids, *Anal Biochem*, **1992**, 200, 301-9.
125. Carpino L. A., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive, *J Am Chem Soc*, **1993**, 115, 4397-8.
126. Christensen M.K., Meldal M., Bock K., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 153-160.
127. E. Atheron, E. Brown R. C. Sheppard A. Rosevear. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1151-1157.
128. E. Atherton, J. L. Holder M. Meldal R. C. Sheppard. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* , 2887-2895.
129. Kappe C. O., Dallinger D., The impact of microwave synthesis on drug discovery, *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5, 51-63.
130. Vetter D., Tate E. M., Gallop M. A., Strategies for the synthesis and screening of glycoconjugates. 2. Covalent immobilization for flow cytometry, *Bioconjug Chem*, **1995**, 6, 319-22 .
131. Vetter D., Gallop M. A., Strategies for the synthesis and screening of glycoconjugates. 1. A library of glycosylamines, *Bioconjug Chem*, **1995**, 6, 316-8.
132. Guo Z. W., Nakahara Y., Nakahara Y., Ogawa T., Solid-phase synthesis of CD52 glycopeptide and an efficient route to Asn-core pentasaccharide conjugate, *Bioorg Med Chem*, **1997**, 5, 1917-24.
133. Bodanszky M., Kwei J. Z., Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependence in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides, *Int J Pept Protein Res* , **1978**, 12, 69-74.
134. Annis I., Hargittai B., Barany G., Disulfide bond formation in peptides, *Methods Enzymol*, **1997**, 289 , 198-221.
135. Kiso Y., Fujiwara Y., Kimura T., Nishitani A., Akaji K., Efficient solid phase peptide synthesis. Use of methanesulfonic acid alpha-amino deprotecting procedure and new coupling reagent, 2-(benzotriazol-1-yl)oxy-1,3-dimethylimidazolidinium hexafluorophosphate (BOI), *Int J Pept Protein Res*, **1992**, 40, 308-14.

136. Markley J. L., Bax A., Arata Y., Hilbers C. W., Kaptein R., Sykes B. D., Wright P. E., Wuthrich K., Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids--IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy, *Eur J Biochem*, **1998**, 256, 1-15.
137. Mortz E., Vorm O., Mann M., Roepstorff P., Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search, *Biol Mass Spectrom*, **1994**, 23, 249-61.
138. Dubois F., Knochenmuss R., Zenobi R., Optimization of an ion-to-photon detector for large molecules in mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **1999**, 13, 1958-67.
139. Dalton C. N., Glish G. L., Electrospray-atmospheric sampling glow discharge ionization source for the direct analysis of liquid samples, *Anal Chem*, **2003**, 75, 1620-7.
140. Knochenmuss R., Zenobi R., MALDI ionization: the role of in-plume processes, *Chem Rev*, **2003**, 103, 441-52.
141. Wüthrich K. NMR of Proteins and Nucleid Acids. 86.
142. Fesik S. W., NMR studies of molecular complexes as a tool in drug design, *J Med Chem*, **1991**, 34, 2937-45.
143. Jeener J., Meier B.H., Bachmann P., Ernst R.R., Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J Chem Phys*, **1979**, 71, 4546-4553.
144. Kessler H.; Gehrke M., Griesinger C., Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Background and Overview of the Experiments, *Angew Chem*, **1988**, 100, 507-54.
145. Gaillet C., Lequart C., Debeire P., Nuzillard J. M., Band-selective HSQC and HMBC experiments using excitation sculpting and PFGSE, *J Magn Reson*, **1999**, 139, 454-9.
146. Blinov K. A., Larin N. I., Williams A. J., Zell M., Martin G. E., Long-range carbon-carbon connectivity via unsymmetrical indirect covariance processing of HSQC and HMBC NMR data, *Magn Reson Chem*, **2006**, 44, 107-9.
147. Turbadar T., Complete Absorption of Light by Thin Metal Films, *Proc Phys Soc*, **1959**, 73, 40-4.
148. Otto A., Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmaschwingungen, *Phys Stat Solidi*, **1968**, 26, K99-K101.
149. Holmes S.D., May K., Johansson V., Markey F., Critchley I.A., Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore), *J Microbiol Meth*, **1997**, 28, 77-84.

150. Xing L., Tjarlund K., Lindqvist B., Kaplan G. G., Feigelstock D., Cheng R. H., Casanovas J. M., Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses, *EMBO J*, **2000**, 19, 1207-16.
151. Quinn J. G., O'Neill S., Doyle A., McAtamney C., Diamond D., MacCraith B. D., O'Kennedy R., Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions, *Anal Biochem*, **2000**, 281, 135-43.
152. Weimar T., Recent Trends in the Application of Evanescent Wave Biosensors, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2000**, 39, 1219-21.
153. Karlsson R., Stahlberg R., Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities, *Anal Biochem*, **1995**, 228, 274-80.
154. Jutta Tost. Synthese von N -Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins GP120 und Untersuchung ihrer CCR5 Korezeptorspezifität, **2004**.
155. Meyer S., Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des GP120 aus dem HIV, **1999**.
156. Flügge C., Darstellung und Bindungseigenschaften eines V3-Glycopeptids des GP120 aus dem HIV, **2001**.
157. Likhoshesterov L. M., Novikova O. S., Derevitskaya V. A., Kochetkov N. K., A selective method for sequential splitting of O- and N-linked glycans from N,O-glycoproteins, *Carbohydr Res*, **1990**, 199, 67-76.
158. Murata T., Usui T., Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates, *Biosci Biotechnol Biochem*, **2006**, 70, 1049-59.
159. Rastall R. A., Bucke C., Enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Biotechnol Genet Eng Rev*, **1992**, 10, 253-81.
160. Henschen A., Lottspeich F., Fibrinogen structure and fibrinolysis, *Haematologica*, **1980**, 65, 535-41.
161. Debeire P., Montreuil J., Moczar E., van Halbeek H., Vliegthart J. F., Primary structure of two major glycans of bovine fibrinogen, *Eur J Biochem*, **1985**, 151, 607-11.
162. Henschen A. H., Human fibrinogen--structural variants and functional sites, *Thromb Haemost*, **1993**, 70, 42-7.
163. Mosesson MW, Fibrinogen and fibrin structure and functions, *J Thromb Haemost*, **2005**, 3, 1894-904.

164. Van Halbeek H., Dorland L., Veldink G. A., Vliegthart J. F., Michalski J. C., Montreuil J., Strecker G., Hull W. E., Structure elucidation of oligomannoside-type asparagine-bound carbohydrate chains of glycoproteins by 500 MHz ¹H NMR spectroscopy, *FEBS Lett*, **1980**, 121, 65-70.
165. van Halbeek H., Dorland L., Vliegthart J. F., Schmid K., Montreuil J., Fournet B., Hull W. E., The application of 500-MHz H-NMR spectroscopy for the structure elucidation of N-acetyllactosamine type asparagine-bound carbohydrate chains of glycoproteins, *FEBS Lett*, **1980**, 114, 11-6.
166. Kullmann, W. *Enzymatic Peptide Synthesis*. 87. Boca Raton, CRC Press Inc.
167. Nowak M. A., McMichael A. J., How HIV defeats the immune system, *Sci Am*, **1995**, 273, 58-65.
168. Meinjohanns, Meldal Paulsen Dwek Bock. Novel sequential solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides from natural sources. *J. Chem. Soc.* 1, 549-560. 98.
169. Moroder L., Musiol H. J., Gotz M., Renner C., Synthesis of single- and multiple-stranded cystine-rich peptides, *Biopolymers*, **2005**, 80, 85-97.
170. Dijk M., Mustafa K., Dechesne A. C., Nostrum C. F., Hennink W. E., Rijkers D. T., Liskamp R. M., Synthesis of peptide-based polymers by microwave-assisted cycloaddition backbone polymerization, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 327-30.
171. Bacsa B., Desai B., Dibo G., Kappe C. O., Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation, *J Pept Sci*, **2006**, 12, 633-8.
172. Lindner M., Dissertation, **2007**.

10 Danksagung

Mein Dank gilt

- Meiner Freundin Katja für ihre langjährige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, den konstanten Rückhalt auf den ich auch in schweren Zeiten immer zählen konnte und die aufgewendete Geduld.
- Meiner Mutter für den Rückhalt während der gesamten Zeit des Studiums und für ihren Glauben an mich und meine Ziele.
- Katharina Wallach für die Korrektur dieser Arbeit, viele wertvolle Fachdiskussionen über V3-Peptide sowie die vielen Diskussionen und Hilfen in allgemeinen Fragen.
- Dr. Thomas Kühnemund für die Korrektur dieser Arbeit, viele fachübergreifende Diskussionen, gemeinsam gemeisterte Projekte und geleistete Motivationsarbeit.
- Dr. Atilla Coksezen für die Korrektur der Zusammenfassung, sowie die fachlich wertvolle und zugleich sehr amüsante Zeit in Labor 13a.
- Ilona Grünberg für die vielen Hilfen, die guten Tips und die Unterstützung während der praktischen Arbeiten.
- Dennis Wilhelm für die Korrektur dieser Arbeit, die Unterstützung während schwieriger Synthesefragen und die philosophischen Diskussionen.
- Dirk Rehders für die Korrektur dieser Arbeit und die Beantwortung vieler Fragen zu NMR Themen.
- Kolja Klein für die jahrelange Zusammenarbeit während der Dissertation.
- Meinen alten (Schul-)Freunden Dirk Ostertag, Sebastian Papenberg, Jan Scharf und Andreas Kreipl für die Motivation während dieser Zeit.
- In Andenken Jan Peters für viele wertvolle Gespräche das Studium zu beenden.
- Dem gesamten AKBM für das gute Teamwork und eine schöne Zeit.
- Dem Institut für Biochemie der Universität Hamburg für die Unterstützung während der Durchführung der biochemischen Arbeiten.
- Dem Sonderforschungsbereich 470 für die Finanzierung während der Anfertigung dieser Arbeit.
- Dem UNAIDS-Programm bzw. dem NIBSC für die Übersendung und Überlassung von CCR5- und CXCR4-überexprimierenden GHOST-Zellen.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

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

Christian Flügge

Hamburg den 25.01.2008

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Flügge
Geburtsdatum	24.08.1970
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Schulbildung

Grundschule Blumlage in Celle	06/1977 - 05/1981
Orientierungsstufe Burgzentrum in Celle	06/1981 - 06/1983
Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium in Celle	07/1983 - 06/1991
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife	06/1991

Wehrdienst

Soldat auf Zeit, 2 Jahre, Bundesmarine	07/1991 - 06/1993
--	-------------------

Studium

Studium der Chemie an der Universität Hamburg, Schwerpunkt: Organische Chemie, Flüssigkristalline Phasen	10/1993 - 01/2002
Beurlaubung vom Studium auf Grund freiberuflicher Tätigkeit für die Marke PRINCE	1997 - 2000

Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie
der Universität Hamburg bei Prof. Dr. B. Meyer:
„Darstellung und Bindungseigenschaften eines
V3-Glycopeptids des GP120 aus dem HIV“

04/2001 - 01/2002

Abschluss: Diplom-Chemiker

01/2002

Promotion am Institut für Organische Chemie der
Universität Hamburg bei Prof. Dr. B. Meyer:
„Einfluss der Glycosylierung auf Struktur und
Bindungsverhalten der dritten variablen Loop des
HIV-1 Glycoproteins GP120“

seit 04/2002

Anstellungsverhältnisse

Tutor für Studienanfänger der Chemie

1994 - 1997

Freiberufliche Tätigkeit als Supervisor und
Teamleiter im Rahmen der
PRINCE Festivalaktivitäten der British American
Tobacco (Germany) GmbH

1997 - 2001

Freiberufliche Tätigkeit als Gebietsleiter
Großraum Hamburg im Rahmen des
PRINCE HORECA Programmes der British
American Tobacco (Germany) GmbH

1998 - 2001

EDV-Betreuung des Instituts für Organische
Chemie (studentische Hilfskraft),
Universität Hamburg

04/2001 - 01/2002

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Organische Chemie, Universität Hamburg

04/2002 - 09/2006

Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum in
Organischer Chemie für Chemie- und
Lehramtsstudierende, Universität Hamburg

08/2004 - 01/2005

- Auftragssynthese von *O*-Typ Glycopeptiden für
die Firma GEPEP, Hamburg 10/2004 - 04/2005
- Lehrbeauftragter für das Praktikum der
Allgemeinen Chemie für Studierende der Medizin,
Universität Hamburg 10/2006 - 03/2007
- Freiberufliche Tätigkeit als Netzwerk- &
Systemadministrator sowie im IT-Support seit 2002