

Untersuchung von Hypochlorit-modifizierten Proteinen und deren Rolle bei der Inhibition von HIV

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Melanie van Yperen

Hamburg, 2008

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. H. Schmitz

Prof. Dr. G. Adam

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung:.....	1
1.1	HIV und AIDS	1
1.1.1	Das humane Immundefizienzvirus	2
1.1.2	Der Lebenszyklus des HIV	6
1.1.2.1	Die HIV-Rezeptor-Interaktion	6
1.1.2.2	Die Fusion.....	7
1.1.2.3	Die Replikation und Reifung	8
1.2	Die antiretroviralen Medikamente	11
1.2.1	Die Medikamentenklassen	11
1.2.1.1	Nukleosidische/Nukleotidische reverse Transkriptase-Inhibitoren	11
1.2.1.2	Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren	12
1.2.1.3	Protease-Inhibitoren.....	12
1.2.1.4	Fusionsinhibitoren	13
1.2.2	Die neuen Medikamentenklassen	13
1.2.2.1	Integrase-Inhibitor	13
1.2.2.2	Inhibitor der Virusreifung.....	13
1.2.2.3	Inhibitoren des Viruseintritts (<i>Entry-Inhibitor</i>)	13
1.2.2.3.1	Chemokin-Korezeptor-Antagonisten.....	13
1.2.2.3.2	Virusadsorptionsinhibitoren (<i>Attachment-Inhibitoren</i>)	14
1.3	Die unspezifische Immunantwort	16
1.3.1	Die Myeloperoxidase.....	16
1.3.1.1	Die hypochlorige Säure (HOCl)	17
1.4	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Proteine	23
2.1.3	Zelllinien.....	24
2.1.4	Bakterienstamm	24
2.1.5	Enzyme	25
2.1.6	Vektoren.....	25
2.1.7	Medien für die Bakterienkultur.....	26
2.1.8	Medien für die Zellkultur.....	26

2. 1. 9	Lösungen	27
2.1.10	Verwendete Reaktionssysteme.....	32
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.12	Geräte	33
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.1.1	Wachstum und Lagerung von Bakterienstämmen	35
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	35
2.2.1.3	Quantifizierung der DNA.....	35
2.2.1.4	Restriktionsverdau.....	36
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.1.6	Herstellung kompetenter <i>XLI blue</i> -Bakterien.....	36
2.2.1.7	Transformation von Bakterien	37
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.2.1	Herstellung von HOCl-modifizierten Proteinen	38
2.2.2.1.1	Gelfiltration mit Sephadex-G25	39
2.2.2.1.2	Ultrafiltration von Proteinlösungen bis 5 ml.....	39
2.2.2.1.3	Ultrafiltration von Proteinlösungen ab 300 ml.....	39
2.2.2.1.4	Dialyse von Proteinlösungen.....	40
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	40
2.2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem BCA-Test.....	40
2.2.2.2.2	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	41
2.2.2.3	Aminosäurenanalyse	41
2.2.2.4	Trocknen von Proteinen	41
2.2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.2.2.6	Silberfärbung von Proteinen.....	42
2.2.2.7	Lagerung und Trocknung von Polyacrylamidgelen	43
2.2.2.8	Western-Blot	43
2.2.2.9	Biotinylierung von Proteinen	44
2.2.2.9.1	Biotinylierung mit Sulfo-NHS-LC-Biotin	44
2.2.2.9.2	Biotinylierung mit Biotin-PEO-Amin.....	45
2.2.2.10	Quantitative Bestimmung des Biotingehalts von Proteinen.....	45
2.2.2.11	Quantitative Bestimmung von Thiolgruppen.....	47
2.2.2.12	Quantitative Bestimmung von Aminogruppen	47

2.2.2.13	Quantitative Bestimmung von Carbonylgruppen	48
2.2.2.14	Surface Plasmon Resonance (SPR)	48
2.2.2.15	Größenfraktionierung von modifiziertem HSA mittels FPLC	50
2.2.3	Zellbiologische Methoden	51
2.2.3.1	Kultivierung von Zellen.....	51
2.2.3.2	Kryokonservierung von Zellen	51
2.2.3.3	Auftauen von Zellen	51
2.2.3.4	Bestimmung der Zelldichte.....	52
2.2.3.5	Transfektion	52
2.2.3.6	Zellvitalitätstest.....	53
2.2.4	Virologische Methoden.....	54
2.2.4.1	Herstellung infektiöser Virusüberstände und Lagerung	54
2.2.4.2	HIV-1 Infektionstest	54
2.2.4.3	Synzytien-Test	55
2.2.4.4	Anfärben der Zellen	56
2.2.4.5	Bestimmung der TCID ₅₀	56
2.2.4.6	Bestimmung der relativen IC ₅₀	58
2.2.4.7	Bestimmung des Bestimmtheitsmaßes	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Neutralisation von HIV-1 durch HOCl-oxidierte Proteine	59
3.1.1	Herstellung oxidierten Proteine im technischen Maßstab	59
3.1.2	Neutralisation von HIV-1 NL4-3wt mit HOCl-modifizierten Proteinen.....	60
3.1.3	Untersuchung des Einflusses von HOCl-modifizierten Proteinen auf die Vitalität und Proliferation von Zellen	64
3.1.4	Modifizierung von Serumalbuminen mit einer steigenden Konzentration HOCl und deren Testung auf antivirale Wirksamkeit.....	68
3.1.5	Neutralisation von HIV-1 NL4-3wt mit getrocknetem HOCl-modifizierten HSA	74
3.2	Bindungsstudien von HOCl-modifizierten HSA, BSA und MSA mit HIV-1- Glykoproteinen	78
3.3	Untersuchungen mit biotinyliertem mHSA	83
3.3.1	Neutralisation von NL4-3wt mit biotinyliertem mHSA	83
3.3.2	SPR-Messungen von biotinyliertem mHSA mit gp120IIIIB	88
3.4	Analyse von HOCl-modifizierten Proteinen.....	91

3.4.1	Darstellung von HOCl-modifiziertem HSA, BSA und MSA mittels SDS-PAGE	91
3.4.2	Hydrolyse von HOCl-modifiziertem HSA mittels Proteinase K	94
3.4.3	Inhibition von HIV-1 NL4-3wt durch fraktioniertes mHSA	98
3.4.4	Veränderung des Gehalts von freien Thiolgruppen nach einer HOCl-Modifikation von HSA.....	103
3.4.5	Quantifizierung von Aminosäureresten nach einer HOCl-Oxidation.....	106
3.4.5.1	Veränderung des Carbonylgruppengehalts von Proteinen durch HOCl-Oxidation.....	106
3.4.5.2	Veränderung des Aminogruppengehalts von Proteinen durch HOCl-Oxidation.	109
3.4.5.3	Aminosäurenanalyse von HOCl-modifiziertem HSA, BSA und MSA	114
3.4.6	Untersuchung von HOCl-modifizierten Poly(Glu,Lys,Arg) und HSA-Peptiden	124
3.4.6.1	Untersuchung der inhibitorischen Aktivität von HOCl-modifiziertem Poly(Glu,Lys,Tyr)	124
3.4.6.2	Untersuchung von HSA-Peptiden	127
4	Diskussion	131
4.1	Herstellung oxidierter Proteine im technischen Maßstab	131
4.2	Etablierung einer alternativen Lagerung von HOCl-modifizierten Proteinen.....	132
4.3	Interaktionsmessungen von biotinyliertem mHSA mit gp120IIIB	133
4.4	Untersuchungen von HOCl-induzierten Veränderungen in Proteinen mittels Aminosäurenanalyse	135
4.5	Untersuchung von HOCl-modifizierten Peptiden	149
5	Zusammenfassung	153
6	Literatur	155
7	Anhang	170
7.1	Abkürzungsverzeichnis	170
7.2	Abkürzungen für die Aminosäuren	173
7.3	Veröffentlichungen.....	174
7.4	Danksagungen	175

1 Einleitung:

1.1 HIV und AIDS

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) wurde zuerst von Barré-Sinoussi, F. *et al.* (1983), sowie Levy, J. A. *et al.* (1984) und Gallo, R. C. *et al.* (1984) mit dem damit verbundenen Krankheitsbild der erworbenen Immunschwäche (AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrom*) in Zusammenhang gebracht. Im Jahre 2005 erreichte die Zahl der HIV-Infizierten geschätzte 38,6 Millionen (Abb.1.1). Dabei infizierten sich wahrscheinlich im genannten Jahr 4,1 Millionen Menschen neu mit dem HI-Virus und 2,8 Millionen starben an AIDS. Die HIV-Prävalenz pendelte sich trotz Neuansteckungen die letzten Jahre bei 1% ein. Dieses wurde durch die hohe Mortalitätsrate bedingt (Zahlen UNAIDS, 2006).

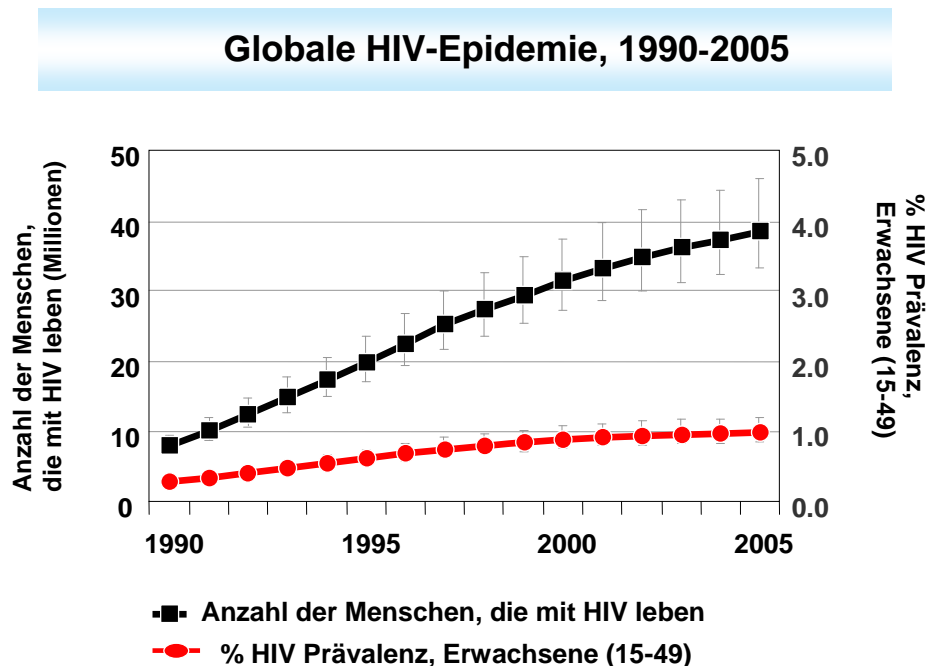


Abb.1.1: Übersicht über die geschätzte Anzahl von Menschen, die in dem Zeitraum von 1990 bis 2005 mit HIV infiziert wurden. Verändert nach UNAIDS, 2006.

1.1.1 Das humane Immundefizienzvirus

Das HIV gehört zur Familie der Retroviridae und wird bei den Lentiviren (Unterfamilie) eingeordnet. Das Virus ist diploid und besitzt zwei Plusstrang-RNA-Kopien, die das Genom bilden (Nielsen M. H., *et al.*, 2005). Im Inneren des Virus befindet sich daneben die Reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease (Abb. 1.2). Sie sind von einer konischen Hülle bestehend aus Kapsidproteinen (p24) umgeben. Über Link-Proteine ist die Kapsidhülle mit den Matrixproteinen (p17) verbunden. An der Matrix sitzen des Weiteren Lateralkörperchen, die ebenfalls überwiegend aus p17 bestehen. Nach Außen hin ist das Retrovirus mit einer Hüllmembran, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht, umgeben. In der Membran sitzen Glykoproteinkomplexe, welche aus dem Transmembranprotein gp41 und dem Oberflächenprotein gp120 bestehen. Das gp41 und das gp120 werden aus einem HIV-Vorläuferprotein (gp160) proteolytisch während des Viruszusammenbaus geschnitten (McCune *et al.*, 1990; Modrow, S. *et al.*, 2003).

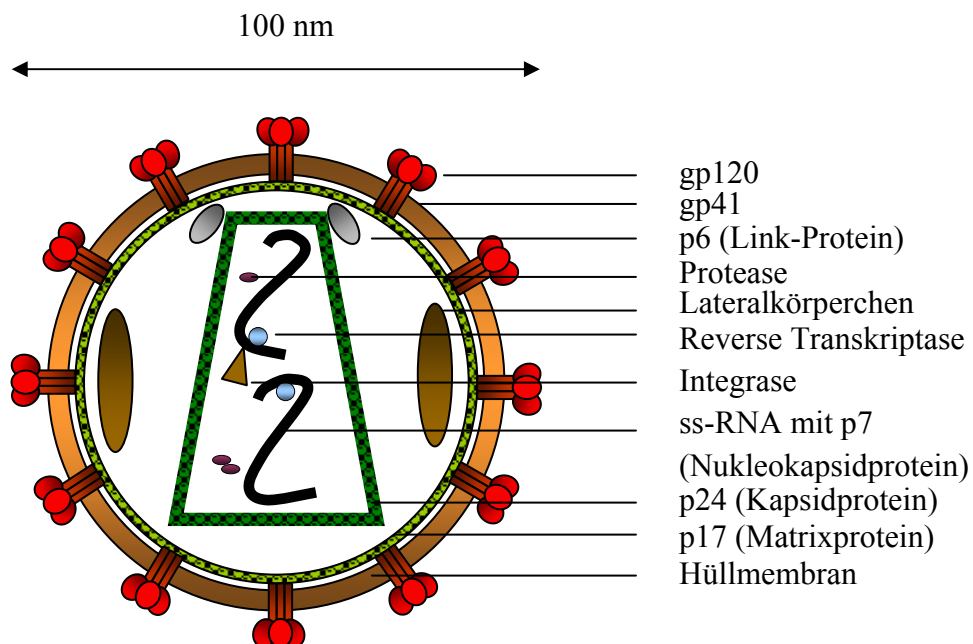


Abb. 1.2: Das humane Immundefizienzvirus. Verändert nach Modrow, S. *et al.*, 2003.

In der gp120-Aminosäuresequenz befinden sich durchschnittlich 24 N-Glykosylierungsstellen (Abb. 1.3). Die N-Glykosylierung macht insgesamt einen Anteil von 50% der Masse aus (Leonard, C. K. *et al.*, 1990). Kwong, P. D. *et al.* (1998) kristallisierten gp120 und konnten feststellen, dass sich die Polypeptidkette in zwei Hauptdomänen (innere und äußere) unterteilt. Diese sind über eine β -Faltblattbrücke (auch *bridging sheet*) miteinander verbunden. Außerdem zeigten Sequenzanalysen, dass gp120 neben konservierten Regionen auch fünf variable Domänen (V1-V5) besitzt (Starcich, B.R. *et al.*, 1986). Die ersten vier variablen Domänen besitzen Disulfidbrücken an ihrer Basis (Leonard, C. K. *et al.*, 1990; Kwong, P. D. *et al.*, 1998), so dass es zu einer Schleifenbildung kommt. Die Domänen V1 bis V5 unterscheiden sich innerhalb verschiedener Patientenisolat wie auch in Folgeisolaten aus einem Patienten in ihrer Sequenz. Die dritte hypervariable Region hat dabei eine besondere Stellung. Sie beinhaltet Isolatunabhängig 34-36 Aminosäurereste (Schreiber, M. *et al.*, 1994) und determiniert den Zelltropismus (Cann, A. J. *et al.*, 1992; Schreiber, M. *et al.*, 1994).

Das gp41 wiederum besteht aus einem C-terminalen intrazellulären Bereich, einem hydrophoben und ungeladenen Membrananker und einer extrazellulären Domäne (Abb.1.4). Es konnte festgestellt werden, dass der transmembrane Anker und 80% des extrazellulären Bereichs aus α -Helices bestehen (Weissenhorn, W. *et al.*, 1996). Die peitschenartige Form des gp41 wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert (Weissenhorn, W. *et al.*, 1997). Diese trennt die HR (*Heptad Repeat*)1- und HR2-Region voneinander (Kilby, J. K. und Eron, J. J., 2003). Außerdem befinden sich vier konservierte Aminosäuremotive vom Typ N-X-S/T auf dem Protein, die für eine kotranslationale N-Glykosylierung stehen (Opdenakker, G. *et al.*, 1993; Johnson, W. E. *et al.*, 2001).

Die Glykoproteine gp41 und gp120 lagern sich nicht-kovalent zusammen und bilden so mehrfach den für die Infektion der Zelle wichtigen trimeren Membrankomplex (Veronese, F. D. *et al.*, 1985; Weissenhorn, W. *et al.*, 1997; Wyatt, R., 1998; Kilby, J. M. *et al.*, 2003).

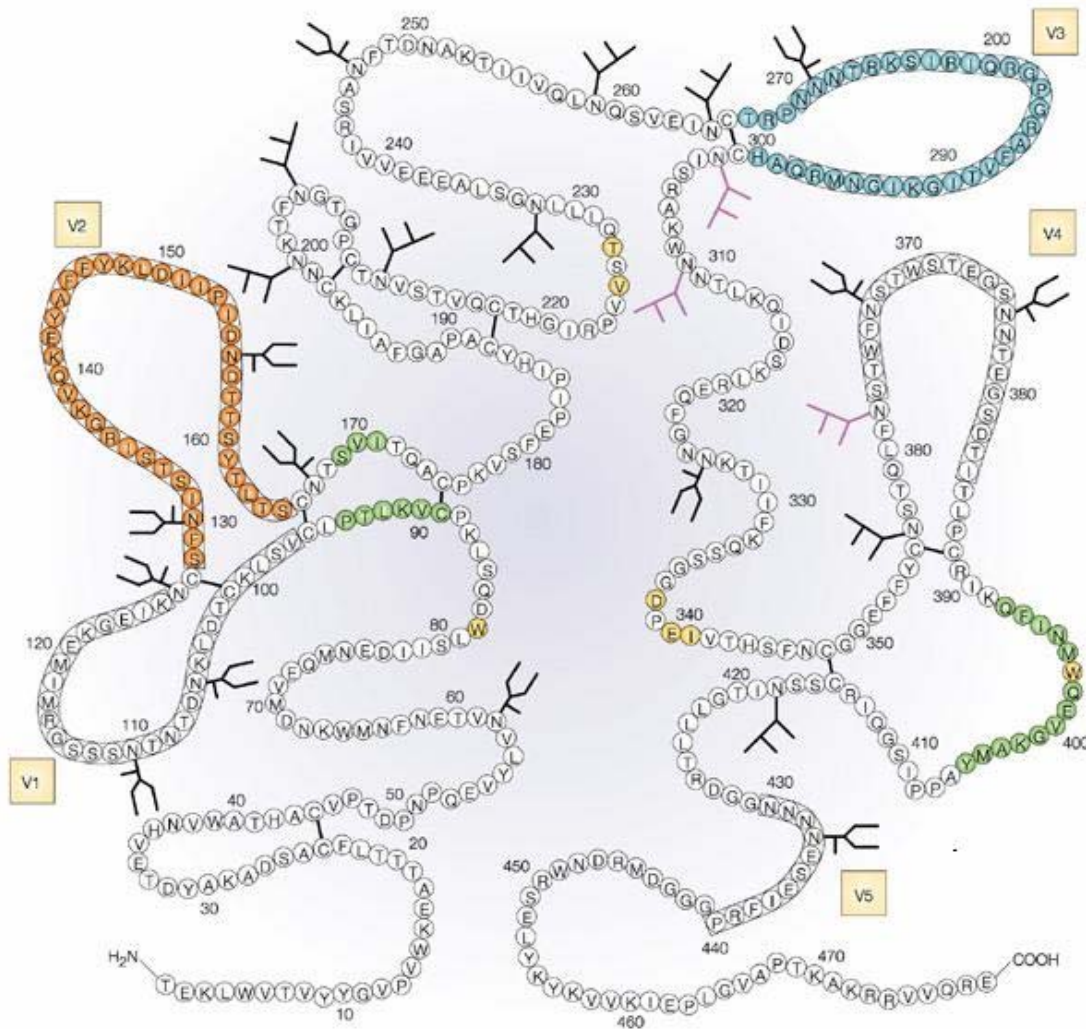


Abb. 1.3: Die planare Projektion des Glykoproteins gp120. Die variablen Regionen, die über Disulfidbrücken (Strich) stabilisiert sind, wurden als V1 bis V5 bezeichnet. N-Glykane vom Mannose- oder Hybridtyp sind als verzweigter Ast und N-Glykane vom komplexen Typ als U-förmiger Ast dargestellt. Epitope, die neutralisierende Antikörper induzieren sind, farblich unterlegt. Die CD4-Bindungsstelle wurde gelb und die CD4-induzierte (CD4i) Region grün markiert. Verändert nach Zolla-Pazner, S. (2004) und Leonard, C. K. *et al.* (1990).

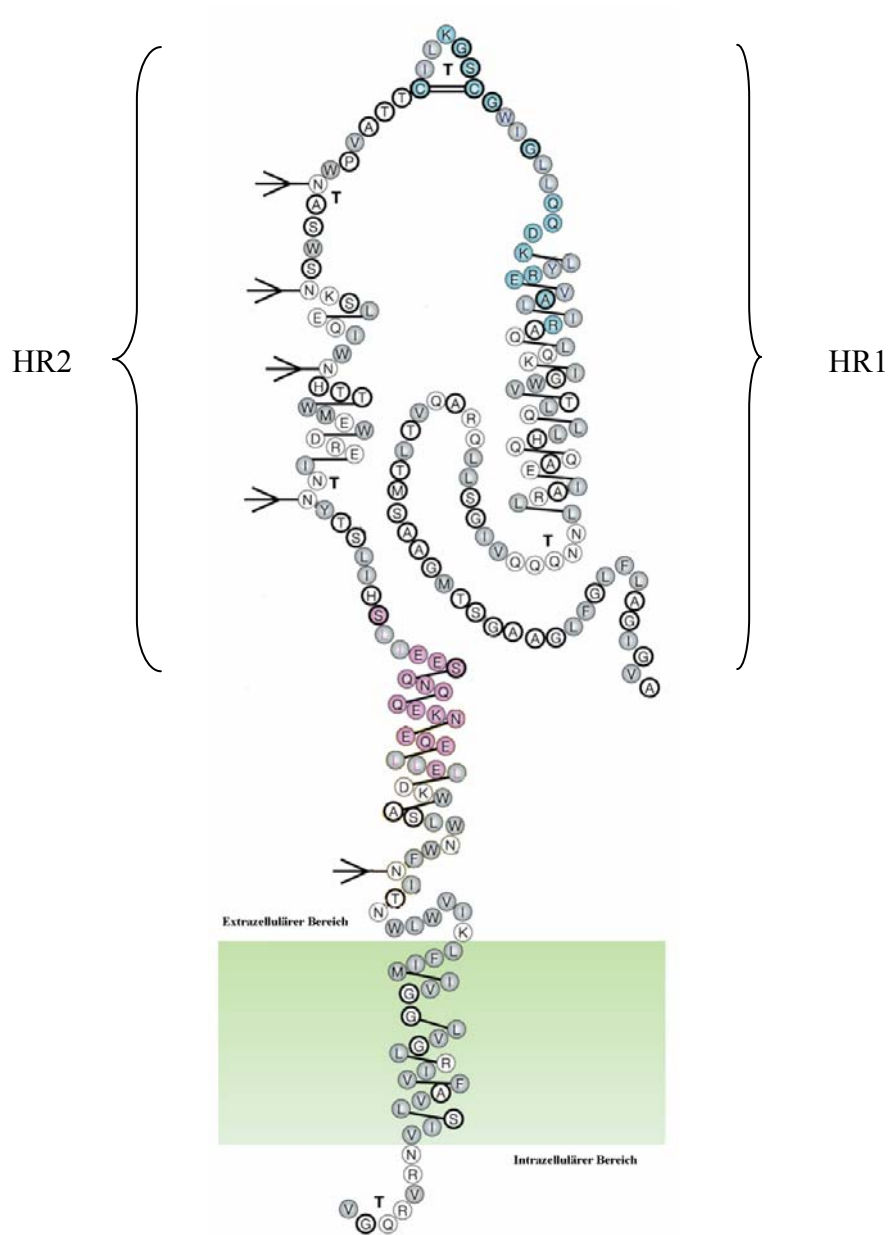


Abb. 1.4: Die planare Projektion des Glykoproteins gp41. Die α -Helices wurden als kurze Linien alternierend mit drei oder vier Aminosäuren dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren wurden grau, geladene Aminosäuren nicht unterlegt. Neutrale Aminosäuren wurden dick umrandet und gut charakterisierte Epitope farblich markiert. Stabile Schleifen wurden mit einem T versehen und potentielle Glykosylierungsstellen als verzweigter Ast dargestellt. Die Lipiddoppelschicht wurde grün und eine Disulfidbrücke mit zwei Strichen angedeutet. Verändert nach Zolla-Pazner, S. (2004), Levy, J. A. (1998) und Gallaher, W. R. (1989).

1.1.2 Der Lebenszyklus des HIV

1.1.2.1 Die HIV-Rezeptor-Interaktion

Der Glykoproteinkomplex gp41/gp120 des Retrovirus interagiert mit seiner Zielzelle hauptsächlich über das CD4 (Dalglish, S. *et al.*, 1984; Sattentau, Q. J., *et al.*, 1986). Letzteres besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDa (Wang, J. *et al.*, 1990) und ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Es setzt sich aus einem extrazellulären Anteil, einem Transmembransegment und einem cytoplasmatischen Anteil zusammen (Maddon, P. *et al.*, 1985; Clark, S. J. 1987). Der extrazelluläre Bereich besteht aus vier immunglobulinähnlichen Domänen (Wang, J. *et al.*, 1990). In der Domäne 3 und 4 sitzen zwei N-Glykane (Maddon, P. *et al.*, 1985). Die aminoterminal Domäne 1 weist drei CDR (*complementarity-determining regions 1-3*) auf. Das HIV bindet über die CD4bs (CD4-Bindungsstelle, Abb. 1.3) des gp120 an CD4 (CDR2 und CDR3), wonach es anschließend zu einer Bewegung innerhalb des viralen Oberflächenproteins kommt (Kwong, P. D., 1998). Bei dieser Konformationsänderung wird die Position der V1- und V2-Schleife verändert (Sattentau, Q. J. *et al.*, 1993; Wyatt, R. *et al.*, 1995). Dabei wird das CD4-induzierte (CD4i) Epitop (siehe Abb. 1.3) und die V3-Schleife freigelegt (Wyatt, R. *et al.*, 1995; Kwong, P. D. *et al.*, 1998). Als nächstes erfolgt eine gp120-Korezeptor-Interaktion, bei der die β -Faltblattbrücke und der V3-Loop des gp120 beteiligt sind. Es sind mehrere Korezeptoren bekannt (Berger, E. A. *et al.*, 1998), doch die von den HIV-Isolaten hauptsächlich verwendeten Korezeptoren sind die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 (Zhang, L. *et al.*, 1996). Letztere sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die aus der Familie der Siebentransmembranproteine stammen. Ihre natürlichen Liganden sind die Botenstoffe MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES (CCR5), sowie SDF-1 (CXCR4).

Während der frühen Phase der Infektion herrschen Viren mit einem CCR5-Tropismus vor. Diese HI-Viren werden auch als R5-trope Viren bezeichnet. In der späten Phase der Infektion bilden sich dann weiterhin HI-Viren mit einem CXCR4-Tropismus (X4-trope Viren). Nutzen die Viren beide Rezeptoren, werden sie als R5X4-trope Viren bezeichnet. Für den Tropismus entscheidend ist die Aminosäuresequenz in der V3-Schleife (Hwang, S. S. *et al.*, 1991; Deng, H. R. 1996; Cormier, E. G. *et al.*, 2002) und die daraus resultierende Gesamtladung der Aminosäuren Lysin, Arginin, Glutamat und Aspartat. Die Gesamtladung der V3-Schleife steigt von +2 (R5-troper Stamm NL991),

über +6 (R5X4-troper Stamm NL952) auf +9 (X4-troper Stamm NL4-3) an. Die Gesamtladung der Korezeptoren liegt bei +1 (CCR5) und -11 (CXCR4) (Thorsden, I., *et al.*, 2002). Da der Tropismus des HI-Virus mit der Nettoladung der V3-Schleife korreliert, wird von einer elektrostatischen Interaktion zwischen V3-Schleife und Korezeptor ausgegangen. Weiterhin spielen die Glykane im V3-Bereich eine wichtige Rolle für den Zelltropismus. So zeigten Untersuchungen mit dem R5X4-tropen Stamm NL952, dass bei einer ausbleibenden Expression des Glykans g15 keine Infektion der CCR5-positiven GHOST-Zelllinie mehr stattfindet (Polzer, S. *et al.*, 2002).

Es kommen als Wirtszellen demnach CD4-positive Zellen in Frage, die einen der oben erwähnten Korezeptoren tragen. Somit werden Makrophagen (R5), Monozyten (R5), T-Helferzellen (X4), Langerhanszellen (R5), dendritische Zellen (R5) und Mikrogliazellen vom HI-Virus infiziert (Saphire, A. C. S. *et al.*, 2001).

Allerdings verwendet das HI-Virus neben dem CD4-Protein noch weitere Komponenten für eine Adsorption an die Zelle (Modrow, S. *et al.*, 2003). So können Makrophagen, deren CD4-Gehalt verglichen mit T-Zellen gering ist, über Syndekane (Typ I transmembrane Heparansulfatproteoglykane) HIV binden. Aber auch Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen, die nicht infiziert werden können, tragen Syndekane auf ihrer Oberfläche. Über diese können sie vermutlich HIV binden und es permissiven Zellen präsentieren (*in trans*-Infektion) (Gallay, P., 2004). Binley, J. und Mitarbeiter (2006) zeigten außerdem, dass DC-SIGN, ein Lektin auf dendritischen Zellen, HIV über mannosereiche Strukturen einfängt. Des Weiteren werden CD4-negative Zellen, wie Oligodendrozyten oder Schwann'sche Zellen, infiziert. Vermutlich ist Galaktosylceramid der Reaktionspartner für das gp120 (Fantini, J. *et al.*, 1993).

Daneben können Antikörper, die an HIV binden, das Virus aber nicht neutralisieren, als Infektionsverstärker dienen. Der Virus-Antikörperkomplex bindet an Fc-Rezeptoren und ermöglicht so wahrscheinlich den Eintritt in nicht infizierbare Zellen (Modrow, S. *et al.*, 2003).

1.1.2.2 Die Fusion

Das allgemein akzeptierte Modell der Membranfusion von HIV-1 mit der Wirtszelle besagt, dass durch eine Bindung des Virus an CD4 bzw. den Corezeptor eine superspiralisierte α -Helix (*coiled-coil*-Struktur) im gp41 gebildet wird (Dom, R. W. und

Moore, J. P., 2000). Bei dieser durch Kontakt ausgelösten Konformationsänderung kommt es vermutlich zu einer Exposition des N-terminalen gp41-Fusionspeptids (Dom, R. W. und Moore, J. P., 2000), welches sich in die Zielmembran hinein schiebt (Gallo, S. A. *et al.*, 2003). Dieser Komplex wird auch als *Pre-hairpin*-Zwischenprodukt bezeichnet (Chan, D. C. und Kim, P. S., 1998; Gallo, S. A., 2003). Noch in ihrer trimeren Assoziation faltet sich die N-terminale *coiled-coil*-Struktur (HR1) in die hydrophobe Rinne der C-terminalen Ektodomäne (HR2) und bildet ein stabiles 6-Helices-Bündel (Chan, D. C. und Kim, P. S., 1998; Kilby, J. M., 2003). Dieses bringt die Virus- und Wirtszellmembran in die für die Fusion und den Viruseintritt geeignete Position (Kilby, J. M., 2003). Mehrere Glykoproteintrimere lagern sich zusammen und bilden eine Fusionspore (Chan, D. C. und Kim, P. S., 1998).

1.1.2.3 Die Replikation und Reifung

Die Syndekane auf der Zelloberfläche können das HI-Virus binden (Vergleiche Abb. 1.5 ❶) und für eine Infektion präsentieren. Das Virus interagiert mit CD4 und einem Corezeptor (❷). Es kommt zur Verschmelzung der Virushülle (❸) mit der Wirtsmembran. Das Kapsid, welches die Reverse Transkriptase, Protease und Integrase enthält, wird ins Zellinnere entlassen. Der vorhandene Komplex gibt Kapsidproteine ab und ist für Nukleotide durchlässig (❹). Im Cytoplasma schreibt die Reverse Transkriptase die RNA in die dsDNA um (❺). Dabei baut sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsch gepaarte Basen ein. Der Präintegrationskomplex, bestehend aus der neusynthetisierten dsDNA und vorhandenen Virusproteinen, wird in den Zellkern geschleust (❻). Im Zellkern vermittelt die Integrase die Integration der Virus-DNA in das Zellgenom (❼). Dabei bildet das Enzym 5'-Überhänge am DNA-Doppelstrang des HI-Virus und des Wirtsgenoms. Anschließend werden die 5'-Überhänge des Wirtsgenoms und die 3'-Enden der Virus-DNA verbunden, Provirusnukleotide entfernt, und die Lücken an den 5'-Enden der Virus-DNA durch das Zellreparatursystem gefüllt. Die Transkription erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II nach Anlagerung der zellulären Faktoren NFκB und SP1. Die RNA-Polymerase II hat wie die Reverse Transkriptase eine hohe Fehlerrate, durch die wahrscheinlich ein großer Teil der Quasispezies entsteht. Es werden anfangs mehrfach gespleißte mRNAs gebildet, welche im Cytoplasma translatiert werden. Die hierbei

gebildeten regulatorischen Proteine Tat, Rev, Nef und Tev werden in den Zellkern transportiert (⑧). Das Virus-Tat-Protein lagert sich dabei an ein TAR-Element an und es folgt eine Steigerung der Transkriptionsrate um das 100-fache. Nun kommt es zur Bildung ungespleißter, sowie einfach gespleißter mRNA. Aus der einfach gespleißten mRNA wird an der Membran des rauhen Endoplasmatischen Retikulums das env-Protein (gp160) synthetisiert. Die wachsende Aminosäurekette wird dabei ins Lumen geschleust, wo sie N-glykosyliert wird. Hier kommt es vermutlich die Trimerisierung. Beim Transport über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche erfolgt die Spaltung in gp41 und gp120. Alle anderen Virusproteine werden an den freien Ribosomen translatiert. Für die Knospung (⑨) kommt es an der Wirtsmembran zur Anlagerung der Viruskomponenten. Die Membran stülpt sich aus und es erfolgt eine Vesikelbildung. Die Reifung (⑩) ereignet in einem letzten Schritt: Bedingt durch die Aminosäurezusammensetzung liegt ein leicht saurer pH-Wert von ungefähr 6,0 vor. Die Proteasedomänen zwischen den Gag- und Pol-Bereichen können nun dimerisieren und sich in einem autokatalytischen Schritt herauspalten. Anschließend erfolgt extrazellulär die Reifung von p17, p24 und p7 (Modrow, S. *et al.*, 2003; Wu, Y., 2004; Nielsen, M. H. *et al.*, 2005 und Temesgen, Z., *et al.*, 2006).

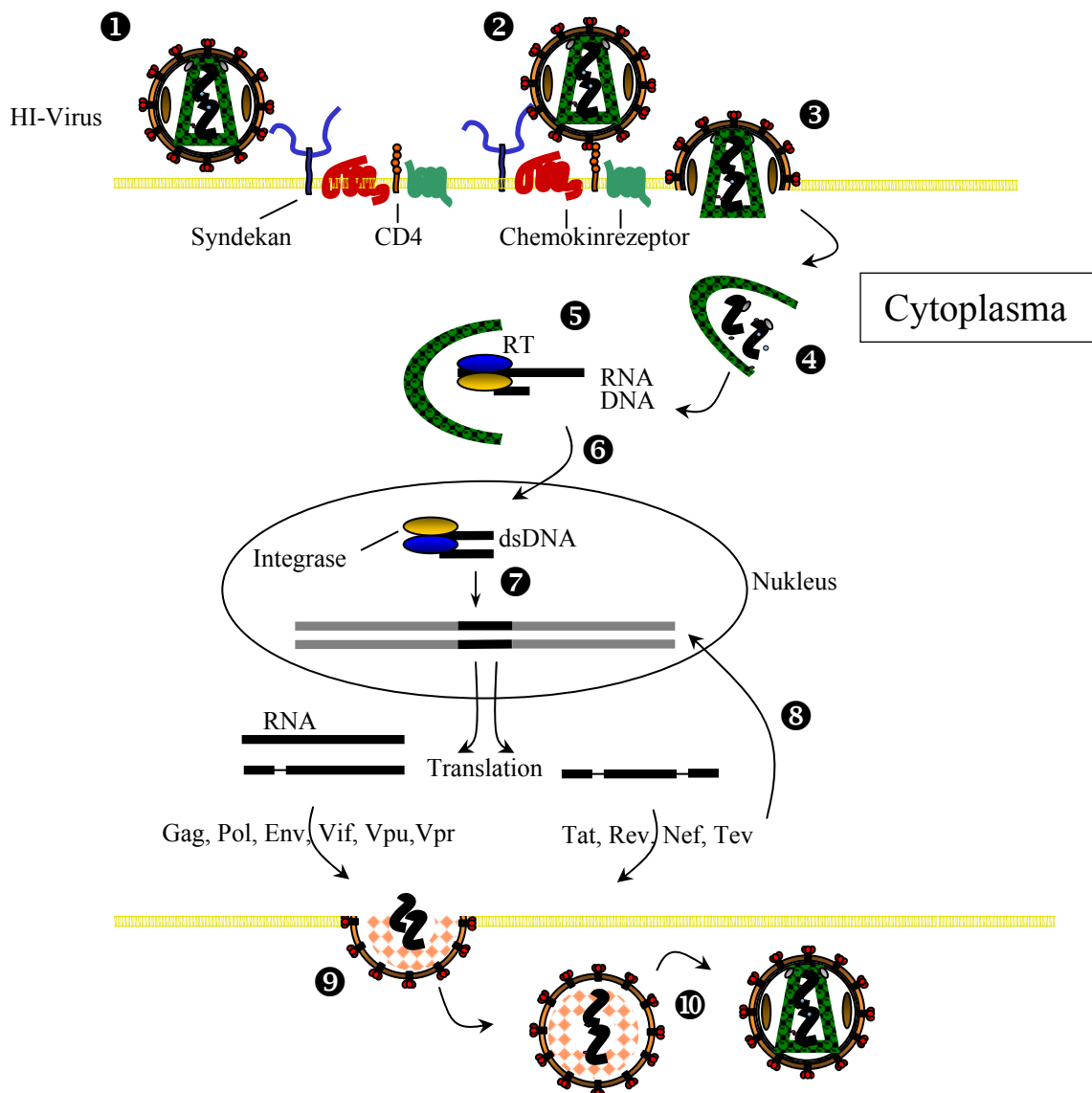


Abb. 1.5: Darstellung des retroviralen Lebenszyklus. Das HI-Virus kann in einem ersten Schritt z.B. durch Syndekane **1** auf der Wirtszelloberfläche adsorbieren. Es kommt zu einer Interaktion des Virus mit CD4 und CCR5 bzw. CXCR4 **2** und einer anschließenden Fusion **3** des Virus mit der Wirtsmembran. Das Kapsid wird für Nukleotide durchlässig **4**. Nach einer reversen Transkription **5** wird das Provirus in den Zellkern geschleust **6** und in die Wirts-DNA integriert **7**. Nach einer Transkription, dem Spleißen der viralen RNA sowie der Translation werden die gebildeten regulatorischen Proteine (Tat, Rev, Nef und Tev) in den Zellkern transportiert **8**. Daraufhin werden weitere Viruskomponenten gebildet, welche sich an die Wirtsmembran anlagern. Es kommt zur Knospung **9** und Reifung des Viruspartikels **10**. Verändert nach Modrow, S. (2003), Wu, Y. (2004), Nielsen, M. H. *et al.* (2005) und Temesgen, Z., *et al.* (2006).

1.2 Die antiretroviralen Medikamente

Zurzeit sind 22 antiretrovirale Medikamente zur Behandlung von HIV-Infizierten von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkannt. Diese werden in 4 Medikamentenklassen eingeteilt.

- Nukleosidische/Nukleotidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI/NtRTI)
- Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)
- Protease-Inhibitoren (PI)
- Fusions-Inhibitoren (FI)

Es werden mindestens drei Substanzen aus den ersten drei Medikamentenklassen eingesetzt, um die Virusvermehrung nachhaltig zu unterdrücken. Bei dieser hochaktiven antiviralen Therapie (HAART) werden zu Beginn der Behandlung zwei NRTI mit einem NNRTI, einem PI, oder einem weiteren NRTI kombiniert.

Viele andere Wirkstoffe befinden sich im vorklinischen oder in der klinischen Entwicklung und bilden z. T. neue Substanzklassen (Temesgen, Z. *et al.*, 2006):

- Integrase-Inhibitoren
- Inhibitor der Virusreifung
- Inhibitoren des Viruseintritts (*Entry-Inhibitor*)
 - Chemokin-Korezeptor-Antagonisten
 - Virusadsorptionsinhibitoren (*Attachment-Inhibitoren*)

Die Angriffspunkte werden im Folgenden beschrieben und sind zusätzlich in Abb. 1.6 dargestellt.

1.2.1 Die Medikamentenklassen

1.2.1.1 Nukleosidische/Nukleotidische reverse Transkriptase-Inhibitoren

Die Bindungsstelle auf der Reversen Transkriptase für Substrate (dNTP) ist das Ziel für eine große Anzahl von NRTI-Analoga, welche schon früh als wirksame

Pharmaka gegen HIV-Infektionen eingesetzt wurden (De Clercq, E. 2002). So gehören z.B. Zidovudin (AZT), Didanosin (ddI) und Abacavir (ABC) zu den zugelassenen antiviralen Chemotherapeutika, bei denen die Hydroxygruppe in 5' -Position ersetzt wurde. Die NRTI's werden von der zellulären Kinase erkannt und in ihre 5'-Triphosphatform überführt. Die Reverse Transkriptase akzeptiert das Substratanalogon und so kommt es nicht zu einer 5'-3'-Phosphodiesterbindung während der DNA-Elongation. Tenovir (TDF), der bis jetzt einzige NtRNI, unterscheidet sich lediglich durch eine zusätzlich Phosphatgruppe, so dass nur noch zwei statt drei Phosphorylierungsschritte benötigt werden (Balzarini, J. *et al.*, 1993; De Clercq, E., 2002; Temesgen, Z., 2006).

1.2.1.2 Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren

Die Bindungsstelle der NNRTI liegt in der Nähe der Substratbindungsstelle in einer spezifischen taschenähnlichen Einbuchtung (De Clercq, E., 2002). Dabei wird durch eine nichtkompetitive Bindung eine Konformationsänderung verursacht und so die katalytische Aktivität der Reversen Transkriptase unterbunden (Temesgen, Z., 2006). Hierfür muss das Substrat nicht, wie bei den NRTI/NtRTI, phosphoryliert werden. Zu den NNRTI gehören nur drei Substanzen: Das Nevirapin (NVP), Delaviridin und Evavirenz (EFV).

1.2.1.3 Protease-Inhibitoren

Diese Substanzklasse beinhaltet u.a. die Medikamente Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV) und Amprenavir (APV). Die peptidähnlichen Wirkstoffe inhibieren die Aktivität der Protease und verhindern so die Spaltung der Vorläuferproteine gag und gag/pol in Strukturproteine und funktionelle Proteine (De Clercq, E., 2002; Temesgen, Z., 2006). Da dieser Prozess die Reifung im finalen Stadium des HIV-Lebenszyklus unterbricht, kommt es zu strukturell disorganisierten und nicht-infektiösen Partikeln (Temesgen, Z., 2006).

1.2.1.4 Fusionsinhibitoren

Enfuviritid, auch bekannt als T-20, ist der einzige durch die FDA anerkannte Fusionsinhibitor. Es ist ein lineares, aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches der HR2-Region des gp41 homolog ist. Es bindet an die HR1-Region des transmembranen Glykoproteins, an die normalerweise HR2 bindet, und blockiert die Bildung des 6-Helix-Bündels, welches für die Virus-Zell-Fusion notwendig ist (Este, J. A. und Telenti, A., 2007; Temesgen, Z., 2006).

1.2.2 Die neuen Medikamentenklassen

1.2.2.1 Integrase-Inhibitor

Ein Inhibitor der Integrase ist das MK-0518. Es greift in der Phase des DNA-Strang-Transfers ein, kurz bevor die dsDNA in das Wirtsgenom integriert wird. Die Substanz befindet sich zurzeit in der klinischen Phase II/III (Grinsztejn B. *et al.*, 2007; Temesgen, Z., 2006).

1.2.2.2 Inhibitor der Virusreifung

Bevirimat (PA-457) greift in der späten Phase der Replikation ein. Dabei blockiert der Inhibitor die Reifung des Kapsidvorläufers zum Kapsidprotein. Bevirimat befindet sich in der klinischen Phase IIa (Smith, P. F., 2007; Temesgen Z. und Feinberg, J. E. 2006).

1.2.2.3 Inhibitoren des Viruseintritts (*Entry-Inhibitor*)

Diese Substanzklasse beinhaltet die Chemokin-Korezeptor-Antagonisten und die Virusadsorptionsinhibitoren (*Attachment-Inhibitoren*).

1.2.2.3.1 Chemokin-Korezeptor-Antagonisten

Mit Maraviroc (UK-427,857) konnte die klinische Phase mit behandlungsnaiven und erfahrungsvollen Patienten erfolgreich beendet werden (Temesgen, Z., 2006).

Bei den CXCR4-Korezeptorblockern (AMD3100, AMD3435, T22 und ALX40-4C) wird davon ausgegangen, dass elektrostatische Wechselwirkungen für die Rezeptor-Antagonist-Interaktionen verantwortlich sind. So ist z.B. AMD3100 resistent gegen den Korezeptor CXCR4 und blockiert diesen nicht, wenn die Asparaginsäuren gegen neutrale Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife des CXCR4 ausgetauscht werden (Labrosse, B., 1998; Blair, W. S. *et al.*, 2000; De Clercq, E., 2002; Temesgen, Z., 2006).

1.2.2.3.2 Virusadsorptionsinhibitoren (*Attachment-Inhibitoren*)

Es wurde bislang eine große Anzahl von synthetischen oder natürlich vorkommenden polyanionischen Komponenten beschrieben. Dazu gehören das Polysulfat (Polyvinylalkoholsulfat, PVAS), Polysulfonat (Polyvinylsulfonat, PVS), Polycarboxylat, Polyphosphat, Polyphosphonat, Cosalan-Analogon, Polyoxometalat und Sulfatpolysaccharid, welches aus der Seealge extrahiert wurde. Aber auch nachträglich modifizierte Proteine, die z. B. wie das HSA, welches durch eine Acotinylierung oder Succinylierung von Lysinresten eine negative Ladung erhält, können als Polyanionen wirken (Jansen, R. W., 1993)

Diese negativ geladenen Strukturen zeigen ihre antivirale Wirkung, indem sie an die positiv geladene V3-Schleife des HIV-Oberflächenproteins gp120 binden (Baltin, D. und Robey, F. A., 1992; Moulard, M *et al.*, 2000; De Clercq, E., 2002). Somit stören die Polyanionen eine Interaktion mit der Wirtszelle. Aber auch Pathogene von anderen sexuell übertragbaren Krankheiten (STD), wie dem Herpes simplex Virus, *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis*, werden durch Polyanionen, z.B. dem Poly[Natrium(4-styrol)sulfonat], inhibiert (De Clercq, E., 2002).

Verschiedene Polyanionen werden momentan in der klinischen Phase I bis III als sogenannte topische Mikrobizide getestet. Als letzteres werden alle Substanzen bezeichnet, die u.a. in einem Gel oder einer Creme oberflächlich bzw. vaginal appliziert werden und so vor HIV oder anderen sexuell übertragbaren Krankheiten schützen.

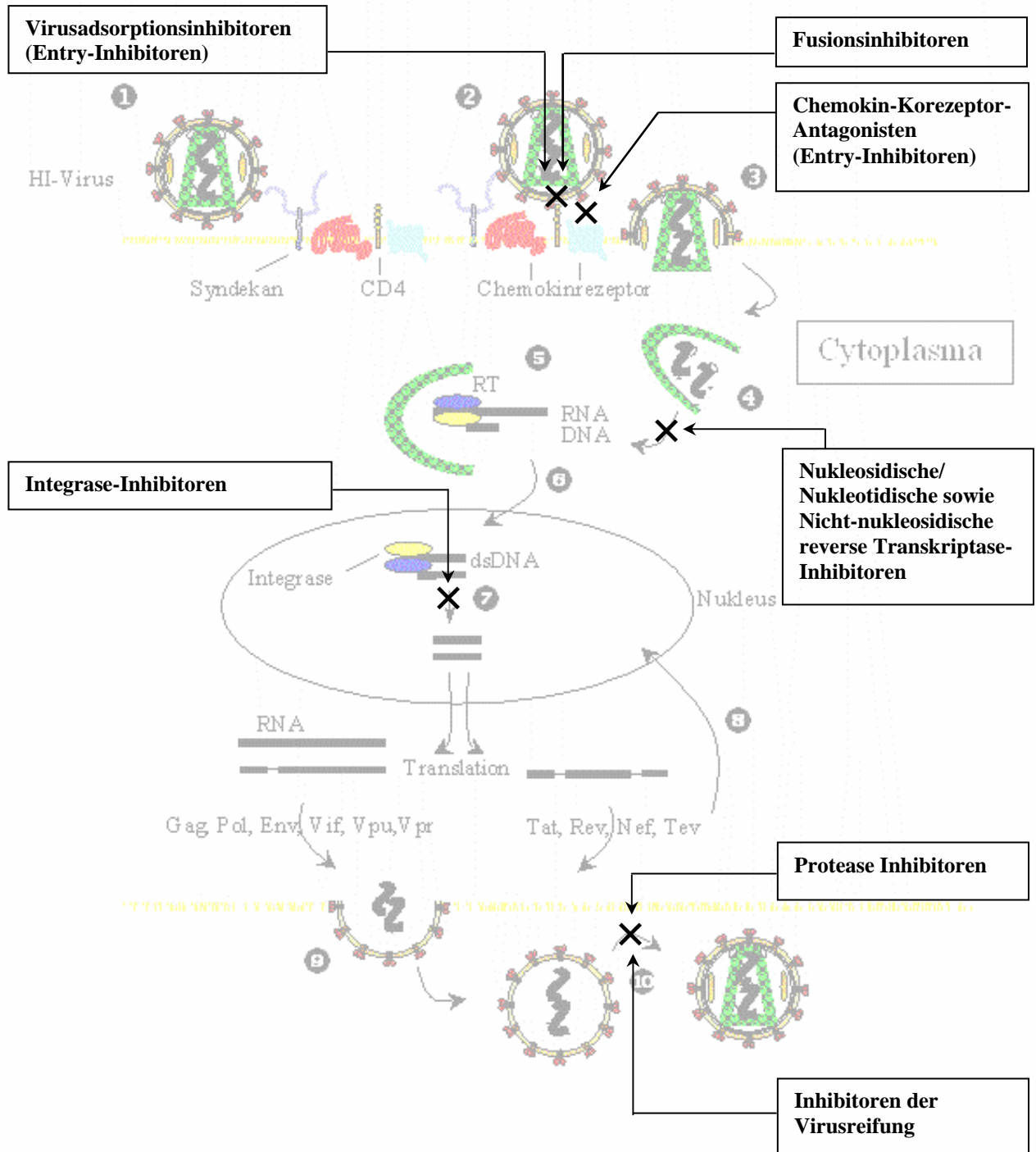


Abb. 1.6: Übersicht über die Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente. Es wurde der retrovirale Lebenszyklus dargestellt (Beschreibung siehe Kapitel 1.1.2). Zusätzlich sind die Angriffspunkte der in Kapitel 1.2 beschriebenen Medikamentenklasse gezeigt.

1.3 Die unspezifische Immunantwort

Für die Bekämpfung von Virusinfektionen im Menschen steht die humorale und zelluläre, sowie die unspezifische Immunantwort zur Verfügung. Zur unspezifischen Immunantwort gehören u.a. das Komplement, die Monozyten, die Makrophagen und die Granulozyten. Letztere bilden als neutrophile Granulozyten die für die Abwehr von Mikroorganismen wichtige Myeloperoxidase (MPO).

1.3.1 Die Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase ist ein 150 kDa schweres glykosyliertes Protein, bestehend aus einem Paar α - und β - Protomere, deren schwere Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Andrews, P. C. *et al.*, 1981). Die Bildung der MPO wird im Promyelozytenstadium der Neutrophilenentwicklung initiiert (Klebanoff, S. J. 2005). Im reifen humanen Neutrophil liegt die MPO, morphologisch und densitometrisch, als heterogenes Granulat vor (Bainton, D. F. *et al.*, 1971; Kinkade, J. M. *et al.*, 1983; Klebanoff, S. J. 2005) und macht ~5% des Zellproteins aus (Malle, E. *et al.*, 2006). Auch Monozyten besitzen, bevor sie zu Makrophagen differenzieren, ein MPO-positives Granulat (~1%) (Nichols, B. A. und Bainton, D. F. 1973; Malle, E. *et al.*, 2006).

Bei Kontakt mit einem stimulierenden Material, wie z. B. einer Virusoberfläche, kommt es innerhalb des Granulozyten zu einer rapiden Produktion von antimikrobiell wirkenden reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS; Abb. 1.7). Die membranständige NADPH-Oxidase (Vergleiche Abb. 1.7; [1]) steht am Anfang der Bildungskette von ROS (Reichel, S. *et al.*, 2000). Dabei produziert das NADPH-Oxidase-System Superoxidanionen, die über eine Dismutation [2] zum H_2O_2 umgewandelt werden (Johnston, R. B., *et al.*, 1975; Carr, A. C. *et al.*, 2000). Das Wasserstoffperoxid reagiert mit unterschiedlichen Kosubstraten [3-5] zur Erzeugung von reaktiven Oxidationsmitteln (Malle, E. *et al.*, 2006). So wird die hypochlorige Säure über eine Oxidationsreaktion mit Wasserstoffperoxid und Chlorid gebildet [5] (Hazen, S. L. *et al.*, 1997).

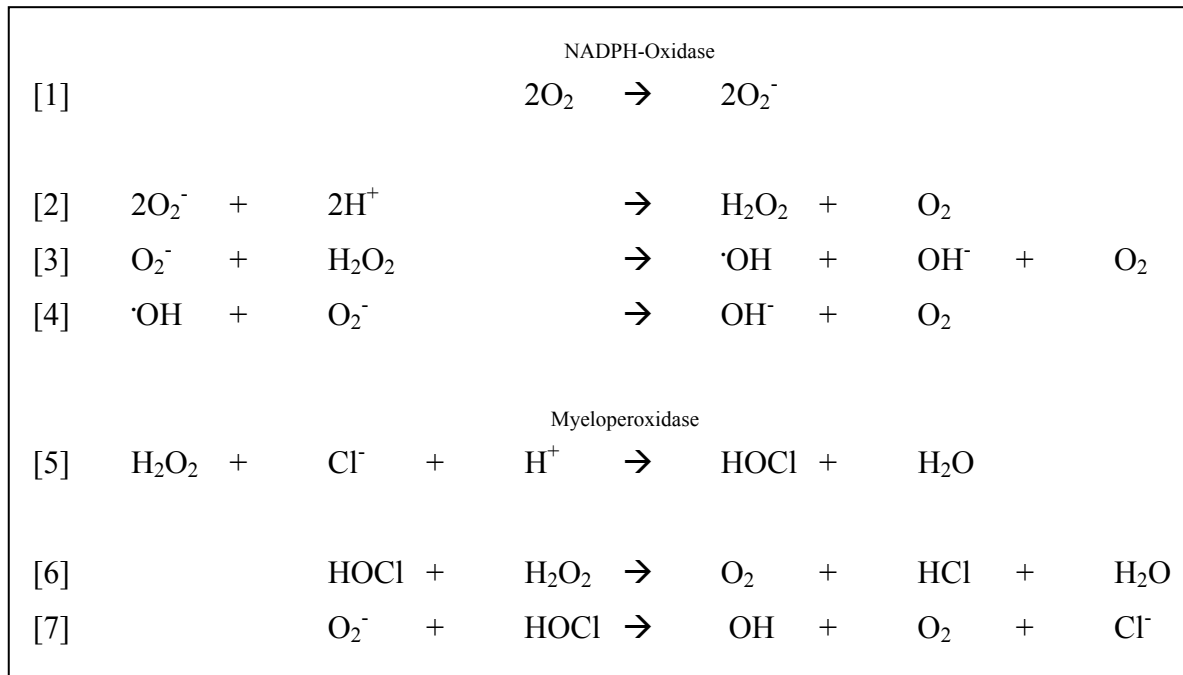


Abb. 1.7: Reaktionen zur Bildung von ROS. Die Reaktionen laufen spontan nach Aktivierung des Granulozyten ab. Die erste Reaktion kann durch die NADPH-Oxidase, welche in der Phagozytenmembran sitzt, katalysiert werden. Die fünfte Reaktion läuft nur mithilfe der Myeloperoxidase ab (Reichel, S. *et al.*, 2000; Klebanoff, S. J., 2005).

Es existieren für die neutrophilen Granulozyten zwei Möglichkeiten, die MPO und somit die hypochlorige Säure zum Mikroorganismus zu bringen:

Zum Einen durch intrazelluläre Degranulation (Klebanoff, S. J. 2005). Hierbei wird der Mikroorganismus durch das Neutrophil phagozytiert. Die Cytoplasmamembran der MPO-enthaltenden granulären Körnchen fusioniert daraufhin mit der Cytoplasmamembran des entstehenden Phagosoms (Klebanoff, S. J., 2005).

Die andere Möglichkeit besteht in der Freisetzung der MPO in den extrazellulären Raum. Die MPO ist stark basisch ($\text{IP} > 10$) und bindet an die negativ geladene Oberfläche des Mikroorganismus (Klebanoff, S. J., 2005). Auf diesem Weg kann die hypochlorige Säure direkt abgegeben werden.

1.3.1.1 Die hypochlorige Säure (HOCl)

Das am besten charakterisierte Produkt der Myeloperoxidase ist die hypochlorige Säure (HOCl) (Hazen, S. L. *et al.*, 1997). Die HOCl spielt die Hauptrolle in der Vernichtung von Bakterien und pathogenen Eindringlingen (Thomas, E. L., 1979; Hawkins, C. L. *et al.*, 2002). Ist es erstmal gebildet, reagiert es schnell mit Proteinen,

DNA (Prutz, W. A., 1996), Lipiden (Winterbourn, C. C. *et al.*, 1992) und Cholesterol (Carr, A. C. *et al.*, 1996; Hawkins, C. L. *et al.*, 2002).

Da HOCl einen pKa von 7,53 besitzt, liegen bei einem physiologischen pH-Wert die undissoziierter Säure und das Hypochlorit (OCl⁻) im Gleichgewicht vor (Pattison, D. I. und Davies, M. J., 2001; Klebanoff, S. J., 2005). Im wesentlich saureren Peroxisom herrscht die protonierte Form vor. Diese kann außerdem mit einem Überschuss Chlorid zum hochreaktiven und kurzlebigen molekularen Chlor reagieren, welches wie HOCl antimikrobiell wirkt.

Eine exzessive oder an falscher Stelle erzeugte Bildung von HOCl über das MPO-H₂O₂-Cl₂-System kann zu Gewebeverletzungen führen (Weizman, S. A. und Gordon, L. I., 1990; Hawkins, C. L. *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass Atherosklerose, chronische Entzündungen und einige Krebsarten auf diesem Weg entstehen (Weizman, S. A. und Gordon, L. I., 1990; Hawkins, C. L. *et al.*, 2000).

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die schwefelhaltige β -Aminosäure Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) mit HOCl reagiert und Taurinchloramin bildet (Zhang, C., 2001; Schuller-Levis, G. B. und Park, E., 2004). Taurin kommt in freier Form im Zytoplasma der meisten Zellen vor. So wurde in Neutrophilen eine Konzentration von 22 mM Taurin detektiert. Das Taurin kann somit als Antioxidationsmittel für HOCl wirken, hat aber auch als Taurinchloramin biologische Funktionen im Stoffwechsel. So zeigte es eine Regulierung der Produktion von proflamatorischen Mediatoren in humanen Leukozyten nach unten. Es wurde gezeigt, dass Taurinchloramin die Aktivierung von NF κ B, einen möglichen Signalumwandler für inflammatorische Cytokine, inhibiert. Der NF κ B spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Transkription des HIV (Vergleiche Kapitel 1.1.2.3).

Neben der Bildung von hypochloriger Säure *in vivo* durch die MPO wird diese auch in Form von Natriumhypochlorit industriell hergestellt. Dabei wird es als Wasch- bzw. Bleichmittel, zur Wasseraufbereitung und zur Abwasserbehandlung eingesetzt. Zur Herstellung wird Natriumhypochlorit durch Einleiten von Chlorgas in Natronlauge in Gegenwart von Wasser hergestellt (Sanfourche, G., 1924). Es ist eine klare bis gelbgrüne, stark alkalische, ätzende und oxidierend wirkende Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch. Sie ist nur begrenzt haltbar, da sie sich bei der Lagerung allmählich zu Natriumchlorat (NaClO₃), Natriumchlorid (NaCl) und Sauerstoff (O₂) zersetzt und dadurch Aktivchlor (Cl₂) verliert. Wenn HOCl mit organischen Bestandteilen reagiert, kann es zur Halogenierung bestimmter Gruppen kommen. Dieser Vorgang, bei dem es zu

einem Verbrauch des Desinfektionsmittel bzw. der hypochlorigen Säure kommt, wird auch als „Chlorzehrung“ bezeichnet.

1.4 Zielsetzung

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass HOCl-modifizierte Proteine *in vitro* das HIV-1 neutralisieren. Um einen näheren Einblick in den Zusammenhang der antiviralen Effektivität und der HOCl-induzierten Veränderung innerhalb der Proteine zu bekommen, sollten diese Modifikationen untersucht werden.

Es stellte sich dabei die Frage, ob spezifische Aminosäurereste verändert werden und bei welchen HOCl-Konzentrationen diese Veränderungen stattfinden. Es stellte sich weiterhin die Frage, ob diese Veränderungen mit einer antiviralen Aktivität korrelieren.

Für die Klärung dieser Fragen sollten analytische Untersuchungen mit HOCl-modifizierten Proteinen durchgeführt werden.

Außerdem sollte für die Anzahl der angestrebten Analysen eine Methode etabliert werden, mit der HOCl-modifizierte Proteine anstatt im Milligramm-Maßstab im Gramm-Maßstab hergestellt werden können.

In vorangegangenen *Surface Plasmon Resonance (SPR)* - Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass das HIV-Oberflächenprotein gp120 mit den HOCl-modifizierten Proteinen interagiert. Es sollte in dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, die HOCl-modifizierten Proteine direkt auf einem Biosensor zu immobilisieren, um so eine stabilere Messung der Interaktion zu erreichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz

Hersteller/Lieferant

Acrylamidgel 30/40	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Avidin	Sigma (Deisenhofen)
β -Galaktosidase	Sigma (Deisenhofen)
5-Bromo-4-Chlor-3- β -D-Galaktosid	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)	Sigma (Deisenhofen)
Dithiothreitol	Sigma (Deisenhofen)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol 96% (v/v)	Merck (Darmstadt)
Ethanolamin	Sigma (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylacetat	Sigma (Deisenhofen)
Ethylendiamintetraacetat	Sigma (Deisenhofen)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)

Guanidin-HCl	Sigma (Deisenhofen)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
H ₂ O _{aqua ad iniectionabilia}	Baxter (Unterschleißheim)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
2-[4'-Hydroxyazobenzol]- carboxylsäure	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Molekulargewichtstandard, GeneRuler 1kb	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
N-Hydroxysuccinimid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumhypochlorit 13% (v/v)	Sigma (Deisenhofen)
N, N', N', N'-Tetramethylethylendiamin	Merck (Darmstadt)
Neomycin	Gibco (Eggenstein)
Penicillin	Gibco (Eggenstein)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Puromycin	Gibco (Eggenstein)
Salzsäure 37% (v/v)	Merck (Darmstadt)
Silbernitrat	Merck (Darmstadt)
Streptavidin, HRP-konjugiert	Pierce (Bonn)
Streptomycin	Gibco (Eggenstein)
Taurin	Sigma (Deisenhofen)
TMB	Mikrogen (Neuried)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)

Trypsin/EDTA	Gibco (Eggenstein)
Trypanblau	Gibco (Eggenstein)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypton	Life Technologies (Karlsruhe)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Wasserstoffperoxid 30% (v/v)	Merck (Darmstadt)

2. 1. 2 Proteine

Substanz	Hersteller/Lieferant
Biotinyliertes Rinderserumalbumin, lyophilisiert	Pierce (Bonn)
Bovines Serumalbumin, lyophilisiert, Fraktion V	Sigma (Deisenhofen)
gp120 in 10 mM Natriumcitrat, 0,3 mM NaCl pH 6,0 aus CHO-Zellen	MRC NIH AIDS (Rockville, USA)
gp41 in 10 mM Natriumcitrat, 0,3 mM NaCl pH 6,0 aus CHO-Zellen	MRC NIH AIDS (Rockville, USA)
Humanes Serumalbumin, lyophilisiert, Fraktion V	Sigma (Deisenhofen)
Murines Serumalbumin, lyophilisiert, Fraktion V	ICN (Ohio, USA)
Poly[Gl,Lys,Tyr], lyophilisiert	Sigma (Deisenhofen)
Proteingewichtstandard, PageRuler	MBI Fermentas (St. Leon–Roth)

2. 1. 3 Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Medium/Antibiotika	Herkunft
HeLa P4-CCR5-CXCR4	Diese humane Zervixkarzinom-Zelllinie exprimiert CD4 und die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 (Maddon, P. J. et al., 1986).	DMEM 500 µg/ml Neomycin und 1 µg/ml Puromycin.	Zur Verfügung gestellt von Herrn M. Dittmar aus Heidelberg
TZM-bl	Diese Zelllinie ist eine HeLa P4-Zelllinie, die CD4 und die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 exprimiert. Sie enthält außerdem das Gen für die β-Galaktosidase, das unter der Kontrolle des HIV-LTRs steht (Kimpton J. und Emerman, M., 1992).	DMEM 100 Units/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin.	Zur Verfügung gestellt von Herrn M. Dittmar aus Heidelberg

2. 1. 4 Bakterienstamm

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<i>E. coli XL-1 Blue</i>	Stratagene (Heidelberg)

Dieser Bakterienstamm besitzt den Phänotyp *recAI endAI gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 [Tet^r]]* und wächst in dYT-Medium.

2. 1. 5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
BamHI	Roche (Mannheim)
BstEII/Eco91I	Roche (Mannheim)
RNase	Sigma (Deisenhofen)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)

Für die Restriktionsendonukleasen wurde der vom Hersteller Roche (Mannheim) bezogene O⁺-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) verwendet. Um die Aktivität der Restriktionsenzyme zu zerstören, erfolgte eine Hitzeinaktivierung. Hierfür wurde BamHI bei 80°C und BstEII bei 65°C jeweils für 20 min inkubiert.

2. 1. 6 Vektoren

Die für die durchgeführten Versuche benötigten Viren bzw. Virusproteine wurden mithilfe der unten aufgelisteten Vektoren in einer HeLa P4-Zelllinie exprimiert.

Vektor	Charakterisierung	Herkunft
pNL4-3wt	Dieser Vektor kodiert für den HIV-1 NL4-3wt. Gesamtgröße 14171 bp. Position 6325: Schnittstelle BstEII. Position 8465: Schnittstelle BamHI.	Zur Verfügung gestellt von Svenja Polzer, BNI (Dissertation 2002)
pSVrevATG160	Dieser Vektor kodiert unter der Kontrolle des SV40-Promotors für das gp160 des HIV-1 NL4-3wt. Gesamtgröße 6494 bp. Position 2539/3427: Schnittstelle BamHI. Position 402: Schnittstelle BstEII.	Zur Verfügung gestellt von Herrn H. Schaal, Düsseldorf

2. 1. 7 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium / LB-Agarplatten

1,5% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
pH 7,0

für LB-Medium-Agarplatten wurden 1,5% (w/v) Agar zugefügt.

YT-Medium

0,8% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
pH 7,0

dYT-Medium

1,6% (w/v) Bacto-Trypton
1,0% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
pH 7,0

Die Medien wurden bei 120°C/1,5 bar für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Antibiotika zugegeben.

2. 1. 8 Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	High Glucose (Gibco, BRL, Eggenstein)

Fötale Kälberserum	Biochrom (Gründau)
Einfriermedium	50% (v/v) FKS
	50% (v/v) 20% DMSO
	in PBS pH 7,4

Alle Medien für die Zellkultur wurden vom Hersteller steril bezogen oder wurden mit einem 0,2 µm-Filter sterilfiltriert. Das fötale Serumalbumin wurde 30 min bei 56°C erhitzt, um das Komplement zu deaktivieren.

2.1.9 Lösungen

Acetat-Puffer

10 mM Acetat
pH 4,5

APS

10% (w/v) Ammoniumpersulfat

Ampicillin-Lösung

200 mg/l Ampicillin-Dinatriumsalz

Auftragspuffer (Agarose-Gelelektrophorese), 6-fach

30% (v/v) Glycerin
0,2% (w/v) SDS
0,05% (w/v) Bromphenolblau
0,05% (w/v) Xylencyanol in TAE

Avidinlösung

10 mg Avidin
19,4 ml PBS pH 7,4

Bromphenolblau

0,1% (w/v) Bromphenolblau in Ethanol

EDC-Lösung

1 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid

Entwickler

15 g NaCO₃
250 ml ddH₂O
12,5 µl 0,5 M Na₂S₂O₃-Lösung
125 µl 37%iges Formaldehyd

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)

1 M Tris-HCl
0,45% (w/v) Glycerin
0,1% (w/v) SDS
pH 8,8

Ethanolamin-Lösung

0,5 M Ethanolamin
pH 8,5

Ethidiumbromid-Lösung

Stammlösung 10 mg/ml

Fixierlösung

50% (v/v) Methanol
12% (v/v) Essigsäure

GE-Puffer

10% (v/v) Glycerol
20% (v/v) Ethanol

HBS-EP-Puffer

10 mM HEPES
150 mM NaCl
3 mM EDTA
0,005% (v/v) Tween 20
pH 7,4
sterilfiltriert und entgast

Imprägnier-Lösung

300 mg AgNO₃
150 ml ddH₂O
112 µl 37%iges Formaldehyd

Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

Lysispuffer

9,94 ml DMSO
60 µl 37%ige HCl
10% (w/v) SDS

Natriumacetat-Puffer

3 M NaCH₃CO₂
pH 4,8

Natriumhydrogencarbonatpuffer

150 mM NaHCO₃
pH 8,5

NHS

0,25 M N-Hydroxysuccinimid

O⁺-Puffer

10 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,1 mg/ml BSA

pH 7,5 bei 37°C

PBS-Puffer

10 mM Na₂HPO₄

130 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

pH 7,4 oder pH 6,0

Phosphatpuffer nach Sørensen 0,1 M

Lösung A: 200 mM KH₂PO₄

Lösung B: 200 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

5,3 ml Lösung A + 94,7 ml Lösung B + 100 ml H₂O

pH 8,0

Probenpuffer (nach Laemmli) 2x

100 mM Tris pH 6,8

20% (v/v) Glycerin

0,2% (w/v) Bromphenolblau

4% (w/v) SDS

100 mM DTT bzw.

5% (v/v) Mercaptoethanol

Für ein natives Gel wurde auf die Komponenten 4-6 verzichtet.

Sammelgel (SDS-PAGE) 4% (v/v)

3 ml	ddH ₂ O
1,25 ml	Sammelgelpuffer
0,65 ml	Acrylamid (Gel 30)
50 µl	SDS (10%)
50 µl	APS (10%)
10 µl	TEMED

Sammelgelpuffer, 4-fach

0,5 M	Tris-HCl	pH 6,8
-------	----------	--------

Sensibilisierer

300 µl	0,5 M Na ₂ S ₂ O ₃
200 ml	ddH ₂ O

TAE-Puffer, 10-fach

890 mM	Tris-HCl
5,7% (v/v)	Essigsäure
20 mM	EDTA
pH 8,0	

TG-Puffer

25 mM	Tris/HCl
10% (v/v)	Glycerol
pH 7,4	

Transferpuffer

20% (v/v)	Methanol
10 mM	Tris-HCl
10 mM	Glycerin
pH 8,6	

Trenngel (SDS-PAGE) 10%

4 ml	H ₂ O _{bidest.}
2,5 ml	Trenngelpuffer, 4x
3,33 ml	Acrylamid (Gel 30)
100 µl	SDS (10%)
100 µl	APS (10%)
25 µl	TEMED

Trenngelpuffer, 4fach

1,5 M	Tris-HCl
pH 8,8	

Trypanblau-Lösung

0,5% (w/v)	Trypanblau
0,9% (w/v)	Natriumchlorid

Waschlösung

50% (v/v)	Ethanol
-----------	---------

X-Gal-Puffer

4 mM	K ₃ Fe[CN] ₆
4 mM	K ₄ Fe[CN] ₆
2 mM	MgCl ₂
in PBS pH 7,4	

2.1.10 Verwendete Reaktionssysteme**Bezeichnung****Hersteller/Lieferant**

BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce (Rockford, USA)
<i>FuGene</i> [®] 6 Transfektionsreagenz	Roche (Mannheim)
Hemacolor [®] -Schnellfärbung	Merck (Darmstadt)
Immunoprobe <i>Biotinylation</i> Kit	Sigma (Deisenhofen)

NucleoSpin-*Extract* Kit

Machery-Nagel (Düren)

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Abdeckfolie	Millipore (Eschborn)
Amicon [®] -Zentrifugenröhrchen	Millipore (Eschborn)
Bakterienkulturschalen	Greiner (Solingen)
Blot-Papier/Abklatschpapier	Schleicher&Schuell (Dassel)
Dialyseschläuche	Amersham (Braunschweig)
Dispensertips, div.	Eppendorf (Hamburg)
Einmalspritzen, div.	Braun (Melsungen)
Einwegpipetten 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner (Solingen)
<i>Falcon-Tubes</i> 15 ml und 50 ml	Greiner (Solingen)
Gewebekulturplatten 6-, 48- und 96- <i>Wells</i>	Gibco (Eggenstein)
Gewebekulturplatten MAXIsorb, 96- <i>Wells</i>	Nunc (Wiesbaden)
Gewebekulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Nunc (Wiesbaden)
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden)
Nitrozellulosemembran	Schleicher&Schuell (Dassel)
Parafilm	Am. National Can (USA)
Pipettenspitzen 100 µl	Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Sephadex [®] -Elutionssäule	Amersham Pharmacia (UK)
Sensor CM5 und SA	Biacore (Freiburg)
Skalpell, Cutfix [®] 15	Braun (Tuttlingen)
Sterilfilter 0,2 µm und 0,45 µm	Sartorius (Göttingen)

2.1.12 Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Brutschrank	Heraeus (Hanau)

Biacore1000	Biacore (Freiburg)
Canon EOS D30	Canon (Deutschland)
Canon EOS D10	Canon (Deutschland)
<i>Easy Breeze Air Gel Dryer</i> - Rahmen	Amersham (Braunschweig)
<i>ELISA-Reader</i> , Lambda E	MWG Biotech (Ebersberg)
Elektrophoreseanlage Miniprotean	BioRad (München)
Elektrophoreseanlage HORIZON 58	BLR (Bethesda, USA)
FPLC Typ LKB	Pharmacia (Braunschweig)
Neubauer-Zählkammer; Tiefe 0,1 mm	Brand (Wertheim)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer	Ikamag (Staufen)
pH-Meter, CG840	Schott (Mainz)
Photometer Lambda E	MWG-Biotech (Ebersberg)
Quarzküvetten	Hellma (Jena)
Quixstand	Amersham (Braunschweig)
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Hamburg)
<i>Speedvac</i> , Hetovac	Nunc (Wiesbaden)
UV-Geldokumentationsgerät	Kodak Deutschland
Wasserbad GFL	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge ROTANTA/R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Suprafuge 22	Heraeus (Hanau)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Wachstum und Lagerung von Bakterienstämmen

Das Wachstum der Bakterien erfolgte über Nacht in dYT-Flüssigmedium bei 37°C und 220 rpm oder auf dYT-Agar-Platten bei 37°C. Zusätzlich wurden die Medien zur Selektion für Bakterien mit einem β -Lactamase-Gen mit Ampicillin (100 μ g/ml) versetzt. Die Lagerung von Bakterienkulturen erfolgte in Form einzelner Kolonien auf dYT-Agar-Platten, die abgedichtet im Kühlschrank für vier Wochen aufbewahrt wurden. Zur längeren Lagerung wurden die Bakterien als 1 ml dYT -Flüssigkultur mit 300 μ l 80%igem Glycerol in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Für eine Plasmidisolierung aus dem *E. coli*-Stamm *XL-1 blue* wurde eine 2 ml-Flüssigkultur hergestellt. Die Präparation erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse mithilfe des Reaktionssystems *NucleoSpin-Extract* der Firma Machery-Nagel (Düren). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben.

2.2.1.3 Quantifizierung der DNA

Die Quantifizierung der in einer Lösung befindlichen doppelsträngigen DNA wurde spektrometrisch mit dem Photometer Lambda E (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die DNA wurde hierfür 1:100 mit ddH₂O verdünnt und bei 260/280 nm gemessen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht dabei dem Wert von 50 μ g DNA/ml. Der Quotient aus der Adsorption bei 260 nm und 280 nm spiegelt die Reinheit der DNA-Lösung wieder. Da Proteine eine Wellenlänge von 280 nm adsorbieren, deutete ein niedriger 260 nm/280 nm-Quotient auf eine Proteinverunreinigung hin. Bei reiner DNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.1.4 Restriktionsverdau

Es wurden für einen Restriktionsansatz 1 µg Plasmid-DNA, 1 µl Restriktionsenzym BamHI oder BstEII und 1 µl O⁺-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA] zusammengegeben. Anschließend wurde mit sterilem ddH₂O ad 10 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad und wurde durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten von 2000 bis 12000 bp wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer aufgeköcht und Ethidiumbromid (2,5 mg/ml) zugegeben. Die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Zusätzlich wurden 10 µl Standard (GeneRuler, 1 kb) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V in der Elektrophoresekammer (Miniprotean, BioRad) mit TAE-Puffer. Die DNA-Banden wurden mithilfe eines UV-Geldokumentationsgerätes (Kodak, Deutschland) bei 254 nm sichtbar gemacht und mit einem Videosystem (Sony, Deutschland) dokumentiert.

2.2.1.6 Herstellung kompetenter *XLI blue*-Bakterien

Es wurde eine 3 ml Flüssigkultur von *XLI blue*-Bakterien (*Escherichia coli*) in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml dYT-Medium überführt. Anschließend wurde die Kultur für drei Stunden bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 inkubiert. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien in gekühlte Zentrifugenbecher überführt und 10 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 2 ml eiskalter Calciumchloridlösung (50 mM) vorsichtig aufgenommen. Danach wurden weitere 24 ml Calciumchloridlösung in das Gefäß überführt und die Bakteriensuspension zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen und die Bakterien in 2 ml

eiskalter Calciumchloridlösung aufgenommen. Die Bakterien wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.7 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden je Ansatz 100 μl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Es wurde 1 μl Plasmid-DNA zugegeben. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C . Danach wurden die Bakterien zwei Minuten auf Eis gelagert und anschließend mit je 1 ml dYT-Medium versetzt. Die Suspension wurde nun eine Stunde bei 37°C inkubiert und dabei alle 10 min geschüttelt. Je 100 μl wurden auf eine dYT-Platte mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausgestrichen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 2 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 μl entfernt. Die Bakterien wurden daraufhin erneut im Medium aufgenommen und auf dYT-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von HOCl-modifizierten Proteinen

Zur Herstellung von HOCl-modifizierten Proteinen wurden humanes, bovines oder murines Serumalbumin (HSA, BSA oder MSA) bzw. β -Galaktosidase mit einem 0,05- bis 1000-fachen molaren Überschuss HOCl oxidiert. Hierfür wurde NaClO (10-13%) in PBS pH 7,4 1:100 verdünnt. Da Natriumhypochlorit sehr alkalisch ist, wurde der pH mit HCl (37%) auf 7,4 eingestellt. Bei pH 7,4 liegen HOCl und OCl^- im Gleichgewicht vor (Morris, J. C., 1966). Die Konzentrationsbestimmung der Natriumhypochloritlösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 292 nm gegen PBS pH 7,4 und mit folgender Gleichung:

$$C_0 = A/\varepsilon \cdot d$$

C_0 = Konzentration

A = Absorption

ε = Extinktionskoeffizient

= 350/M/cm

d = Schichtdicke

= 1 cm

Abhängig von dem gewünschten molaren HOCl:Protein-Verhältnis wurde die entsprechende Menge Protein zur HOCl-Lösung gegeben. Es folgte eine Inkubation unter Rühren bei 4°C für 20 Minuten. Die Reaktion wurde mit Taurin (5 g/l) gestoppt (20 min, 4°C). Anschließend wurde überflüssiges Taurin abgetrennt (Methode 2.2.2.1.2-2.2.2.1.4). Alternativ wurde das HOCl mittels einer Gelsäule (Sephadex-G25; Methode 2.2.2.1.1) entfernt.

2.2.2.1.1 Gelfiltration mit Sephadex-G25

Auf eine mit 25 ml PBS pH 7,4 äquilibrierte Sephadex PD-10-Säule der Fa. Amersham Pharmacia wurden 2,5 ml des Ansatzes aus Methode 2.2.2.1 gegeben. Anschließend wurden zur Elution 3,5 ml PBS pH 7,4 zugegeben. Da es sich um eine Gelfiltration mit Sephadex-G25 handelte, welches eine Ausschlussgröße von 5000 kDa besitzt, wurde das HOCl zurückgehalten und die Proteine eluiert. Das Eluat wurde komplett aufgefangen. Die Säule wurde durch Zugabe von 25 ml PBS pH 7,4 regeneriert. Dabei wurde das Natriumhypochlorit aus den Gelpartikeln gewaschen. An die Gelfiltration schloss sich eine Proteinkonzentration durch Ultrafiltration (Amicon-Zentrifugenröhrchen; Ausschlussgröße 10 kDa) an.

2.2.2.1.2 Ultrafiltration von Proteinlösungen bis 5 ml

Eine Hypochlorid-modifizierte Proteinlösung von maximal 5 ml wurde in ein Amicon-Zentrifugenröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa überführt und bei 4000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Das Konzentrat wurde zweimal mit PBS pH 7,4 gewaschen.

2.2.2.1.3 Ultrafiltration von Proteinlösungen ab 300 ml

Ein Ansatz von 0,3 bis 4 l wurde in eine Ultrafiltrationsanlage (Modell Quixstand, Amersham) gegeben. Bei diesem Modell wurde die Proteinlösung mithilfe einer Pumpe (Watson Marlow, Modell 232) bei einer Einstellung von 25 bis 80 rpm in eine poröse Membran eines Hohlfasersystems (*Hollow fiber cartridge system*, UFP-10-C-3X2MA) gedrückt. Alle Komponenten kleiner der Ausschlussgröße von 10 kDa wurden bei einem angelegten Druck von 20 PSI und einem transmembranen Druck von 15 PSI abgetrennt. Das Konzentrat wurde anschließend mit einem 8-fachen Volumen PBS pH 7,4 versetzt und erneut filtriert, um überschüssiges Taurin zu entfernen.

2.2.2.1.4 Dialyse von Proteinlösungen

Ein Dialyseschlauch (Sigma, Deisenhofen) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa wurde 30 min in PBS pH 7,4 aufgekocht und anschließend mit der Proteinlösung befüllt. Die Dialyse erfolgte unter Rühren gegen das 10-fache Volumen PBS pH 7,4 bei 4°C über Nacht.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen erfolgte mit den folgenden aufgeführten Methoden. Es wurde bei jeder Messung eine BSA-Eichreihe als Standard verwendet. Hierfür wurden 0,2-2 mg BSA in PBS pH 7,4 gelöst und jeweils drei Werte pro Konzentration ermittelt. Bei der Konzentrationsbestimmung der Peptide wurden Eichreihen mit den jeweiligen Peptiden aufgestellt, da Abweichungen, bedingt durch starke Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung, mit einer BSA-Eichreihe zu groß wären.

2.2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem BCA-Test

Bei dieser Proteinkonzentrationsbestimmung nach Tszynski, G. P. und Murphy, A. (1990) kommt es zuerst zu einer Komplexbildung. Dabei reagieren die Cystein-, Cystin-, Tyrosin-, und Tryptophanreste, sowie Peptidbindungen (Wiechelman, K. J. et al., 1988) mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen werden reduziert und reagieren daraufhin mit Bicinchoninsäure (BCA) in einem 1:2-Verhältnis. Für den Nachweis wurde das BCA-Reaktionssystem der Firma Pierce (Bonn) verwendet. Hierfür wurde Reagenz A (2% NaCO_3 ; 1% BCA, 0,95% NaHCO , 0,16% $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$, 0,2 N NaOH) mit Reagenz B (4%ige CuSO_4 -Lösung) 1:50 gemischt und jeweils 200 μl mit 10 μl Proteinlösung versetzt. Als Referenz wurde statt der Proteinlösung PBS pH 7,4 verwendet. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Proben bei 560 nm gemessen.

2.2.2.2.2 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte bei 280 nm durch Messung der Peptidbindungen, sowie der Tryptophan- und Tyrosinreste. Voraussetzungen für die Verwendung dieser Methode nach Layne, E. (1957) waren klare Proteinlösungen. Die Proben wurden gegen den jeweiligen Puffer, in dem sie gelöst waren, gemessen.

2.2.2.3 Aminosäurenanalyse

Für eine Aminosäurenanalyse wurden Serumalbumine nach Methode 2.2.2.1 und 2.2.2.1.3 modifiziert und in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Holst, Strukturbiochemie (FZ Bostel) mit freundlicher Unterstützung von Rainer Bartels analysiert. Die Proben wurden mit 8 N HCl 16 Stunden bei 120°C hydrolysiert. Die freien Aminosäuren wurden mit Phenylisothiocyanat (PITC) derivatisiert und anschließend mithilfe der Säule *PicoTag Column* (3,9 x 150 mm) der Fa. Waters durch einen Kurven-Gradienten getrennt. Hierfür wurde Laufmittel A (19 g Natriumacetat x 2 H₂O; 500µl Triethylamin und 100µl EDTA-Lösung [100 mg EDTA /100 ml H₂O] pro Liter, pH 5,3 + 60 ml Acetonitril) und Laufmittel B (600 ml Acetonitril, 400 ml H₂O und 200 µl EDTA-Lösung [100 mg EDTA /100 ml H₂O] bei einer Flussrate von 1 ml/min. auf die Säule gegeben. Die HPLC-Anlage ist von der Firma Waters und besteht aus den Komponenten *Waters 626 Pump*, *In-Line Degasser*, *Waters 600S Controller*, *Waters 2487 Dual Absorbance Detector* und *Waters 717 Plus Autosampler*.

Als Vergleich wurde ein Standard aus einer definierten Zusammensetzung Aminosäuren getestet.

2.2.2.4 Trocknen von Proteinen

Die hergestellten Inhibitoren aus Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.2.1.3 wurden mithilfe eines Vakuum-Konzentrators eingeeengt bzw. getrocknet. Hierfür wurden jeweils 200 µl Proteinlösung in einer Speedvac (Nunc, Wiesbaden), Modell Hetovac, für vier Stunden im Vakuum zentrifugiert.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Für die Herstellung von 2 SDS-Polyacrylamidgelen wurde folgende Zusammensetzung verwendet (Tab. 2.1):

Material	Sammelgel (4%)	Trenngel (7,5%)
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	0,65 ml	3,33 ml
4 x Sammelgel - bzw. Trenngelpuffer	1,25 ml	2,5 ml
SDS (10%)	50 μ l	100 μ l
ddH ₂ O	3 ml	4 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	50 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	25 μ l

Tab. 2.1

Nach Zusammenbau des Gießstandes wurde das Trenngel gegossen und mit 0,5 ml 2-Propanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das 2-Propanol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Direkt danach wurden Kämme für je 10 Probestaschen in das Gel gesteckt, welches 30 min bei Raumtemperatur polymerisierte.

Die Proben wurden mit 2-fachem Probenpuffer versetzt und für 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels gegeben. Als Standard wurden 10 μ l *PageRuler* der Fa. Fermentas in die erste Probestasche pipettiert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer senkrechten mit Laufpuffer gefüllten Minigel-Elektrophoresekammer der Fa. Biorad (München). Die Stromstärke betrug bei Auftrennung im Sammelgel 10 mA und wurde anschließend bei Auftrennung im Trenngel auf 25 mA eingestellt

2.2.2.6 Silberfärbung von Proteinen

Bei einer Silberfärbung handelt es sich um eine sensitive Nachweismethode von Proteinen, bei der die Nachweisgrenze bei ca. 5 ng Protein liegt.

Das Gel wurde nach einer SDS-PAGE für 30 min in ein Fixierbad (50% Methanol, 12% Essigsäure) gegeben und anschließend dreimal für 15 bis 30 min in 50%igem Ethanol gewaschen. Das Gel wurde für eine Minute in einer Sensibilisierer-Lösung (0,15% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) geschwenkt und danach dreimal für 20 Sekunden mit ddH_2O gewaschen. Anschließend erfolgte eine dreißigminütige Inkubation in einer Silbernitratlösung (150 ml AgNO_3 -Lösung [12,5 M], 112 μl Formaldehyd [37%]). Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Gel in den Entwickler (250 ml Na_2CO_3 -Lösung [566 mM], 12,5 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [0,5 M], 125 μl Formaldehyd [37%]) gelegt. Nach 5-30-minütiger Inkubation wurde durch eine Überführung des Acrylamidgeles in eine Stopplösung (0,9% EDTA, 0,125 M NaOH) die Entwicklung beendet.

2.2.2.7 Lagerung und Trocknung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden nach der Färbung luftblasenfrei zwischen zwei mit GE-Puffer (10% Glycerol; 20% Ethanol) durchnässten Zellophanfolien in einem *Easy Breeze Air Gel Dryer*-Rahmen (Amersham Biotech, Freiburg) eingespannt und über Nacht an der Luft getrocknet.

2.2.2.8 Western-Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten biotinylierten Proteine wurden mithilfe des Nassblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert und anschließend mit einer HRP/TMB-gekoppelten Färbereaktion sichtbar gemacht.

Für den elektrophoretischen Transfer wurden zwei Lagen Abklatschpapier (Schleicher und Schuell, Dassel) und die zugeschnittene Nitrozellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde direkt nach der Elektrophorese auf der Membran positioniert und beiderseits zwischen dem Abklatschpapier in dem Gelhalter eingeklemmt. Die Apparatur wurde in eine mit kaltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer (Biorad, München) gehängt. Die Membran war dabei

in Richtung der Anode angeordnet. Die Blotkammer wurde anschließend in ein Eisbad gestellt. Der Proteintransfer wurde über drei Stunden bei 50 V durchgeführt.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht in PBS pH 7,4 mit 5% BSA unter schütteln (100 rpm) inkubiert. Danach wurde die Membran 1 Stunde in PBS pH 7,4 gewaschen, wobei das PBS mehrfach gewechselt wurde. Um die biotinylierten Proteine sichtbar zu machen wurde eine Streptavidinlösung hergestellt in der die Nitrozellulosemembran 1 Stunde inkubiert. Für die Herstellung wurde HRP-konjugiertes Streptavidin im Verhältnis 1:2000 in PBS pH 7,4 gelöst. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit PBS pH 7,4 für 1 Stunde. Eine TMB-Lösung (Mikrogen, Neuried) wurde direkt auf die Nitrozellulosemembran pipettiert. Die *Horseradish* Peroxidase am Streptavidin wandelt das TMB (Tetramethylbenzidin) in einen blauen Farbstoff um. Nach 10 Minuten wurde überschüssiges TMB mit Wasser entfernt.

2.2.2.9 Biotinylierung von Proteinen

Es wurden zwei Methoden angewendet, um Proteine zu biotinylieren. Zum Einen wurden die Amingruppen der Aminosäuren mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Bonn) und zum Anderen die Carboxylgruppen der Aminosäuren durch Biotin-PEO-Amin (Pierce, Bonn) markiert.

2.2.2.9.1 Biotinylierung mit Sulfo-NHS-LC-Biotin

Hierfür wurde die Proteinlösung auf Raumtemperatur erwärmt und zusammen mit einer kalkulierten Menge Sulfo-NHS-LC-Biotinlösung (2,2 mg ad 400 µl; 10 mM) zwei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte über Nacht eine Dialyse gegen PBS pH 7,4 bei 4°C. Für die Kalkulation der benötigten Biotinmenge wurde zuerst die Proteinmenge mit der folgenden Gleichung 1 berechnet.

$$\text{Probenmenge (ml)} \cdot \text{Probenkonz. (mg/ml)} / \text{Protein Mw (g/mol)} = \text{Proteinmenge (mol)}$$

Die 20-fache Biotinmenge errechnet sich mit der Gleichung 2:

$$\text{Proteinmenge (mol)} * (\text{Biotin Mw [g/mol]} / \text{Biotinlösung [mg/ml]} * 20 = \text{ml Biotinlösung}$$

Mw Sulfo-NHS-LC-Biotin = 556,59

2.2.2.9.2 Biotinylierung mit Biotin-PEO-Amin

Hierfür wurde eine 50 mM Biotin-PEO-Aminlösung (21 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 5,0 hergestellt. Für die Biotinylierung von Proteinen wurde eine Proteinkonzentration von maximal 5 mg/ml gewählt, wobei die Verdünnung ebenfalls mit Phosphatpuffer durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Menge Biotinlösung mit 0,5 ml Proteinlösung zusammengegeben, die mit unten aufgeführter Gleichung berechnet wurde. Der Ansatz wurde danach mit 50 µl frisch angesetzter EDC-Lösung (200 mM) versetzt. Mit Phosphatpuffer pH 5,0 wurde das Volumen auf 1 ml eingestellt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde der Ansatz für 1 min bei 7.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte über Nacht eine Dialyse gegen PBS pH 7,4 bei 4°C.

Für die Berechnung der Menge Biotinlösung wurde zuerst die Proteinkonzentration in mol mit Gleichung 1 aus der Methode 2.2.2.9.1 ermittelt. Anschließend wurde mit Gleichung 2 die Menge Biotin-PEO-Aminlösung in ml berechnet, die zur Proteinlösung gegeben wurde. Das Molekulargewicht von Biotin-PEO-Amin beträgt 418,55 g/mol. Es wurde auch diesmal für eine erfolgreiche Proteinmarkierung von einem benötigten 20-fachen Überschuss Biotin ausgegangen.

2.2.2.10 Quantitative Bestimmung des Biotingehalts von Proteinen

Mit diesem Test, der auch als Avidin-HABA-Test bezeichnet wird, wurde das Biotin:Protein-Verhältnis bestimmt. Hierbei bindet der HABA (2-[4'-Hydroxyazobenzol]-carboxylsäure)-Farbstoff an Avidin. Als HABA-Avidin-Komplex kann dieser bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen werden. Biotin verdrängt HABA vom Avidin durch die wesentlich höhere Affinität des Biotins zum Avidin und es

kommt zum messbaren Abfall der Extinktion. Die Durchführung erfolgte mithilfe des *Biotinylation* Reaktionssystems der Firma Sigma und der Methode nach Wilchek, M. und Bayer, E. A. (1988).

Zuerst wurde eine Konzentrationsbestimmung der Proteinmenge durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl biotinyliertes Protein mit 900 µl PBS pH 7,4 versetzt (1:10 Verdünnung) und bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch gemessen (Methode 2.2.2.2.2). Weitere 20 µl biotinyliertes Protein wurden mit 2 µl Pronase (1 mg/ml) versetzt und 1,5 Stunden bei 37°C verdaut. Es wurden 100 µl HABA-Lösung (10 mM) mit 3,2 ml Avidinlösung (7,8 mM) zur Bildung des HABA-Avidin-Komplexes vermischt. Die Haltbarkeit der Lösung über Wochen wurde durch Messen der Extinktion kontrolliert. Dabei wurde bei einer Wellenlänge von 500 nm eine Extinktion von 1,0 erwartet. Nun wurden 20 µl verdautes biotinyliertes Protein bzw. PBS pH 7,4 zur Kontrolle mit 180 µl HABA/Avidin-Lösung zusammengegeben (Verhältnis 1:10). Die Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm. Die Menge Biotin in nmol/ml wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Biotin (nmol/ml)} = \frac{{}^b\text{korrigierter } E_{500}\text{-Wert} * 10^{\text{Verdünnungsfaktor}} * 10^6}{{}^a\text{HABA/Avidin-Extinktionskoeffizient}}$$

^aHABA/Avidin-Extinktionskoeffizient :

$$(E_{500}) = 34000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (} A_{500} \text{ von einer 1 M Biotinlösung)}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = 10$$

^bDer korrigierte E_{500} -Wert ist der gemessene Extinktionswert der Kontrolle abzüglich des Extinktionswertes der Probe und wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$E_{500} \text{ (korrigiert)} = E_{500} \text{ (PBS}_{\text{Kontrolle}}\text{)]} - E_{500} \text{ (biotinyliertes Protein)}$$

Für das molare Biotin:Protein-Verhältnis wurde die Proteinkonzentration in nmol/ml aus der gemessenen Protein-Konzentration (E_{280}) berechnet und zur Biotinkonzentration (nmol/ml) ins Verhältnis gesetzt.

2.2.2.11 Quantitative Bestimmung von Thiolgruppen

Die Quantifizierung von Thiolgruppen erfolgte nach der Methode von Ellman (Ellman, G. L., 1959). Für den Versuch wurde eine 10 mM DTNB (5,5'-Dithiobis [2-nitrobenzoesäure])-Lösung in einem Phosphatpuffer nach Sørensen pH 8,0 gelöst. Die Lösung war maximal 3 Tage stabil. Es wurden 880 µl Proteinlösung mit 100 µl 10%iger SDS-Lösung und 20 µl DTNB-Lösung versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz bei einer Wellenlänge von 412 nm im Photometer gemessen. Der Hintergrund wurde gemessen, indem statt DTNB-Lösung Puffer eingesetzt wurde. DTNB reagiert mit freien Thiolen zum Disulfid und dem stark farbigen p-Nitrothiophenolanion (TNB). Mithilfe folgender Gleichung nach Ellman wurde die Molarität der Lösung bestimmt:

$$C_0 = (A/\epsilon d) * V$$

C_0 = Konzentration

A = Adsorption

ϵ = Extinktionskoeffizient

= 13600/M/cm

d = Schichtdicke der Küvette

= 1 cm

V = Verdünnungsfaktor

2.2.2.12 Quantitative Bestimmung von Aminogruppen

Primäre Aminogruppen wurden mithilfe von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) bestimmt. Dabei reagieren die freien Aminogruppen mit TNBS zu Trinitrophenyl (TNP)-Derivaten (Habeeb, A. F. S. A., 1965). Für diesen kolorimetrischen Test wurde HOCl-modifizierte Proteinlösung und als Referenz nicht-modifizierte Proteinlösung mit einer Konzentration von 5 bis 20 mg/ml verwendet. Jeweils 1 ml wurden mit 1 ml 4%iger NaHCO₃, pH 8,5 und 1 ml 0,1% TNBS-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 1 ml

10%ige SDS-Lösung und 0,5 ml 1 N HCl zugegeben. Die Messung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 335 nm.

2.2.2.13 Quantitative Bestimmung von Carbonylgruppen

Zur quantitativen Bestimmung des Carbonylgruppengehalts von oxidierten Proteinen wurde die Methode nach Levine (Levine, R. L. et al., 1990) verwendet. Dabei reagiert DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) mit Carbonylgruppen zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon. Hierfür wurden 500 µl DNPH-Lösung (10 mM in 2 M HCl) zusammen mit 500 µl Probe für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 500 µl 60%ige Trichloressigsäure für eine Proteinfällung zugegeben. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 11000 x g wurde zum Proteinsediment 1 ml Ethanol/Ethylacetat (1:1) pipettiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur, der sich eine zehnminütige Zentrifugation bei 11000 x g anschloss. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift erneut durchgeführt. Das Sediment wurde 1 Minute im offenen Eppendorfgefäß bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden 500 µl 6 M Guanidin-HCl pH 6,5 zugegeben und unter kräftigen Schütteln 15 Minuten bei 37°C erwärmt. Die Messung erfolgte im Photometer bei 375 nm gegen eine Probe, die statt der DNPH-Lösung mit PBS pH 7,4 versetzt wurde. Mithilfe der Gleichung aus der Methode 2.2.2.11 und des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde die Molarität der Lösung bestimmt.

2.2.2.14 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Technik (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) zeigt eine Interaktion zwischen zwei Molekülen, von denen der eine, der Analyt, sich frei in Lösung befindetet, und der andere, der Ligand, fest an einen Biosensor gekoppelt ist. Es wurden Untersuchungen mithilfe eines CM5- und eines SA-Biosensors durchgeführt.

Der CM5-Sensor besitzt auf seiner Goldoberfläche eine carboxymethylierte Dextranschicht, auf der nach Aktivierung der Oberfläche mit EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) primäre

Amingruppen kovalent binden. Für die Kopplung der Proben an den Biosensor und die SPR-Messungen wurde das Gerät Biacore 1000 der Firma Biacore (Freiburg) verwendet.

Alle Lösungen wurden steril und luftblasenfrei bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 6 min auf die Sensoroberfläche injiziert. Als Laufpuffer wurde HBS-EP pH 7,4 verwendet. Zuerst wurden 30 μl eines Gemisches aus EDC (1 M) und NHS (0,25 M) im Verhältnis 1:1 auf die Sensoroberfläche injiziert. Anschließend wurden 30 μl des Liganden, der mit Acetatpuffer pH 4,0 auf eine Konzentration von 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt wurde, auf den Biosensor gegeben. Freie nicht-immobilisierte Flächen wurden anschließend mit Ethanolamin abgesättigt. Hierfür wurde zweimal für jeweils 60 Sekunden 5 μl 0,5 M Ethanolamin pH 8,5 injiziert. Um nicht-kovalent gebundenen Liganden von der Flusszelle zu waschen, wurden dreimal 5 μl Regenerationslösungen (5-250 mM NaOH bzw. 25-100 mM HCl) für 60 Sekunden injiziert. Für den Messvorgang wurde eine Konzentrationsreihe des Analyten in HBS-EP-Puffer hergestellt und jeweils 30 μl auf die Sensoroberfläche für 6 min injiziert (Assoziationsphase). Es schloss sich nach der Assoziationsphase eine Dissoziationsphase für 6 Minuten an, bei der mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ HBS-EP-Puffer auf den Analyten/Liganden-Komplex injiziert wurde. Der gebundene Analyt wurde durch eine dreimalige Injektion der Regenerationslösung für 60 Sekunden (5 μl 5-250 mM NaOH bzw. 25-100 mM HCl) entfernt, bevor eine neue Messrunde begonnen wurde. Der Verlauf der Prozesse wurde in einem Sensorgramm dargestellt. Dieses zeigt die gemessenen *Response Units* (RU) zeitabhängig an. Dabei entspricht 1 RU einer Bindung von 1 pg/mm^2 .

Der SA-Biosensor trägt auf seiner Goldoberfläche eine immobilisierte Streptavidinschicht. Biotinylierte Proteine besitzen durch die niedrige Gleichgewichtsdissoziationskonstante von $K_D = 10^{-15}$ M eine hohe Affinität zum Streptavidin. Für die Ligandenimmobilisierung wurde zuerst die Oberfläche dreimal für 60 s mit 5 μl 1 M NaCl in 50 mM NaOH konditioniert. Es wurde hierfür eine Fließgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt und als Laufpuffer HBS-EP pH 7,4 verwendet. Anschließend wurde der biotinylierte Ligand bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit einer Konzentration von 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 6-10 min. (30-50 μl) injiziert. Mit einer sechzigsekündigen Injektion von 5 μl 5-100 mM NaOH wurde der nichtgebundene Ligand von der Sensoroberfläche gewaschen. Anschließend wurden Konzentrationsreihen mit gp120 gemessen. Es wurden jeweils Verdünnungsreihen von gp120 in HBS-EP-Puffer hergestellt und 30 μl Probe für 6 min auf die Chipoberfläche mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Nach der Assoziationsphase

schloss sich eine sechsminütige Dissoziationsphase an, bei der mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ HBS-EP-Puffer auf den Analyten/Liganden-Komplex injiziert wurde. Nach jeder Messung wurde der Analyt mit 5 μl 5-100 mM NaOH für 60 Sekunden vom Liganden gewaschen.

2.2.2.15 Größenfraktionierung von modifiziertem HSA mittels FPLC

Für eine Größenfraktionierung von modifiziertem HSA wurde eine FPLC (*fast liquid performance chromatography*)-Anlage der Fa. Pharmacia Typ LKB verwendet. Das modifizierte HSA wurde mithilfe der Säule HiLoad Superdex 200 (26/60) der Fa. Amersham, welche aus einer Agarose-Dextran-Matrix bestand, in einzelne Fraktionen getrennt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min und als Laufpuffer wurde TG pH 7,4 (25 mM Tris-HCl; 10% Glycerin) verwendet. Die Fraktionen (3,2 ml) wurden mittels eines Fraktionssammlers (Fa. Pharmacia, Modell Frac. 100) gesammelt. Die fraktionierten Proben wurden anschließend bei einer O.D. von 280 nm (Methode 2.2.2.2.2) photometrisch gemessen, um den Elutionsbereich von dem modifizierten HSA zu erhalten. Die FPLC-Anlage besteht aus den Komponenten Pump P500; Valve MV-7, IMV-7 und Controller LCC-500 Plus.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Für die Expression von Proteinen bzw. HIV wurden HeLaP4- und TZM-bl-Zellen verwendet. Die jeweiligen Zelllinien wurden in einer Kulturschale (Greiner, Frickenhausen) mit einer Oberfläche von 75 cm² kultiviert und zweimal pro Woche nach Erreichen des konfluenten Stadiums umgesetzt. Dabei wurde zuerst das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin; 0.53 mM EDTA) versetzt und im Brutschrank für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die adhären Zellen abgelöst hatten, wurden zur Inaktivierung des Trypsins 8 ml DMEM/10% FKS pipettiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 170 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellsediment in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Je nach Dichte des Zellrasens wurden 3-5 ml in eine neue Kulturschale gegeben und auf 12 ml mit DMEM/10% FKS aufgefüllt. Alle Zellen wurden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden diese eingefroren. Hierfür wurden die Zellen nach Erreichen des konfluenten Stadiums trypsiniert und in 1 ml reinem FKS aufgenommen. Je 0,8 ml wurden zusammen mit 0,8 ml 20%iger DMSO-Lösung in PBS pH 7,4 in ein Kryo-Röhrchen überführt und für 1 Stunde auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen zwei Stunden bei -20°C eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Für einen längeren Zeitraum (> 1 Jahr) wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff gestellt.

2.2.3.3 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 10 ml des jeweiligen Mediums in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 min bei 170 x g zentrifugiert. Das Zellsediment

wurde nach Absaugen des Überstandes in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde schließlich in eine Kulturschale mit 75 cm² Oberfläche gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ über mindestens zwei Passagen kultiviert, bevor mit ihnen weitergearbeitet wurde.

2.2.3.4 Bestimmung der Zelldichte

Für die Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer Zählkammer (Fa. Brand, Wertheim) verwendet. Durch Zugabe von 0,25% (w/v) Trypanblau im Verhältnis 1:1 wurden die lebenden von den toten Zellen farblich abgehoben. Es wurden 10 µl Zellsuspension pro Großquadrat auf den Objektträger gegeben und die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Mit folgender Gleichung wurde die Zellzahl pro Milliliter berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl pro Großquadrat} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4) : 4$$

Verdünnungsfaktor = 2

2.2.3.5 Transfektion

Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden je 300 µl Zellsuspension nach der Trypsinierung (Absatz 2.2.3.1) in die Vertiefung einer 6-Well Platte pipettiert und mit DMEM/10% FKS auf 2 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C (5% CO₂) sollte eine Zelldichte von 50% der 6-Well-Oberfläche erreicht sein. Für die Transfektion mit dem Reagenz *FuGene6* wurden je 1 µg DNA in 96 µl serumfreies Medium gegeben und mit 4 µl *FuGene*-Reagenz versetzt. Nach dreißigminütiger Wartezeit wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellen getropft und 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3.6 Zellvitalitätstest

Das Reagenz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid) ist ein schwach gelbes Substrat, welches durch aktive Mitochondrien in ein dunkelblaues Produkt gespalten wird. Diese Umwandlung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

HeLa P4- und TZM-bl-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FKS auf 96-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit 1-600 µg HOCl-modifizierten Proteinen versetzt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich nichtmodifizierte Proteine in den genannten Konzentrationen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde das für Zellen toxische Ethanolamin (v/v) in einer Endkonzentration von 1 und 10% zum Medium gegeben. Als Positivkontrolle wurden Zellen in DMEM/10% FKS ohne Zusatz kultiviert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand gegen 100 µl frisches Medium ausgetauscht. Von einer MTT-Lösung (5 mg/ml), die sterilfiltriert im Dunkeln bei 4°C gelagert wurde, wurden jeweils 10 µl pro Well pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde in einem nächsten Schritt vorsichtig entfernt. Danach wurden 100 µl Lysispuffer (9,94 ml DMSO [99,9%], 60 µl HCl [37%], 10% SDS) pro Well dazu gegeben. Die 96-Well Platte wurde auf dem Schüttler fixiert und 5 min bei 220 rpm geschüttelt. Nach vollständiger Lyse der Zellen und gleichzeitiger Freisetzung des Farbstoffes wurde der Farbumschlag im *ELISA-Reader* der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm detektiert.

2.2.4 Virologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung infektiöser Virusüberstände und Lagerung

Für die Herstellung von HI-Viren vom Stamm NL4-3wt wurde eine Transfektion mit dem Plasmid pNL4-3wt nach Methode 2.2.3.5 durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde der Virusüberstand abgenommen, bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert, und der virushaltige Überstand mit einem 0,45 µm-Filter filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.4.2 HIV-1 Infektionstest

Es wurden 10.000 TZM-bl-Zellen in 100 µl DMEM 10% FKS pro *Well* einer 96-*Well* Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 0,01-600 µg/ml HOCl-modifizierte und zur Kontrolle nichtmodifizierte Proteine zugegeben, wobei pro Konzentration drei Messungen durchgeführt wurden. In einem nächsten Schritt wurden 300 infektiöse Partikel, die in einem vorherigen HIV-1 Infektionstest titriert wurden, zugegeben. Für eine Positivkontrolle wurden sechs infizierte *Wells* mit TZM-bl-Zellen in DMEM/10% FKS ohne Zusätze ausgespart. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Zellen maximal 5 min in 3,7% Formaldehyd fixiert. Für die Farbreaktion wurde X-Gal Puffer (4 mM K₃Fe[CN]₆, 4 mM K₄Fe[CN]₆, 2 mM MgCl₂ in PBS pH 7,4) mit chromophoren 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid (1 mg/ml) versetzt. In den TZM-bl-Zellen steht ein endogenes β-Galaktosidase (*lacZ*)-Gen unter der Kontrolle eines TAT-abhängigen Promotors, der aktiviert wird, sobald das Virusprotein TAT exprimiert wird. Das Enzym wandelte den Farbstoff um und nach frühestens 4 Stunden wurden die blaugefärbten Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Positivkontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

2.2.4.3 Synzytien-Test

Die HeLa P4-Zelllinie trägt neben den Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 das Protein CD4 auf ihrer Oberfläche. Durch Transfektion mit dem Vektor pSVrevATG160 kommt es zur Expression von gp41 und gp120 auf der Zelloberfläche. Sobald diese durch Verdichtung des Zellrasens Kontakt zu CD4 erhalten, kommt es zur Fusion und Membranverschmelzung. Auf diese Weise werden Riesenzellen, sogenannte Synzytien gebildet. *Attachment*-Inhibitoren unterdrücken durch Bindung an gp120 den Vorgang.

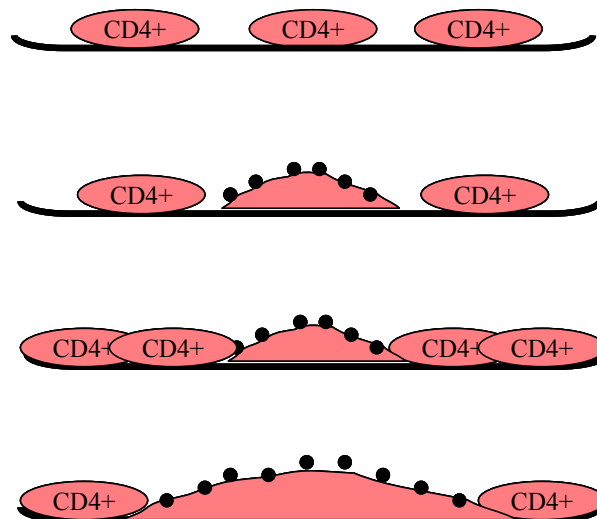


Abb. 2.1 Bildung einer Riesenzelle in vier Schritten. Von oben nach unten: 1. CD4+-Zellen werden mit pSVrevATG160 transfiziert. 2. Nach Expression von gp120 und gp41 auf der Zelloberfläche kommt es 3. durch Verdopplung der Zellen zu einem Zell-Zell-Kontakt und 4. zur Verschmelzung der Zellmembranen. Verändert nach Aldovini, A. und Walker, B. (1990).

Für den Test wurden 15.000 HeLa P4-Zellen in 100 μ l DMEM/10% FKS pro *Well* einer 96-*Well* Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0,5 bis 200 μ g/ml HOCl-modifizierte und nichtmodifizierte Proteine zugegeben. Es wurden jeweils 3 *Wells* pro Konzentration verwendet. Als Positivkontrolle wurden *Wells* mit HeLa P4 in DMEM/10% FKS ohne zu testende Substanz freigelassen. Es folgte eine Transfektion (Methode 2.2.3.5) mit 0,05 μ g DNA (pSVrevATG160) pro *Well*. Nach 36 Stunden wurden die ersten Synzytien beobachtet.

Nach 48-stündiger Inkubation wurde der Test durch eine Hemacolorfärbung gestoppt (Methode 2.2.4.4) und die Synzytien lichtmikroskopisch ausgezählt.

2.2.4.4 Anfärben der Zellen

Um HeLa P4-Zellen nach einer Synzytienbildung anzufärben, wurde der Hemacolor Schnelltest der Fa. Merck nach Herstellerangaben wie folgt verwendet. Zuerst wurden die Zellen pro *Well* einer 96-*Well* Platte 1 Minute mit 100 µl Lösung 1 fixiert. Danach wurde für eine Minute mit 100 µl Hemacolorlösung 2 und anschließend mit Hemacolorlösung 3 gefärbt. Zellkerne bekommen eine dunkelblaue bis violette Farbe, das Cytoplasma hebt sich deutlich vom Hintergrund ab. Die Zellen wurden mit Wasser überschichtet, um überflüssigen Farbstoff aufzunehmen.

2.2.4.5 Bestimmung der TCID₅₀

Der TCID₅₀ (*Tissue culture infective dose*)-Wert gibt an, welches Volumen benötigt wird, um mit 50%iger Wahrscheinlichkeit eine Zellkultur zu infizieren. Die Bestimmung der TCID₅₀ erfolgte durch einen HIV-1 Infektionstest (Methode 2.2.4.2).

Es wurden 10.000 TZM-bl-Zellen in 100 µl DMEM 10% FKS pro *Well* einer 96-*Well* Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit Virusüberstand eine Verdünnungsreihe hergestellt. Hierfür wurden 25 µl des aufgetauten Virusüberstandes aus Methode 2.2.4.1 in 100 µl vorgelegtes Medium gegeben und vermischt (1:5 Verdünnung). Von der Suspension wurden 25 µl mit einer neuen Spitze in das nächste *Well* überführt und erneut vermischt. Insgesamt wurden 10 Verdünnungsschritte durchgeführt. Der Vorgang wurde sechsmal parallel ausgeführt. Nach 48-stündiger Inkubation wurde der Überstand verworfen und mit 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid in X-Gal Puffer (4 mM K₃Fe[CN]₆, 4 mM K₄Fe[CN]₆, 2 mM MgCl₂ in PBS pH 7,4) versetzt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die infizierten und somit blaugefärbten Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt.

Der TCID₅₀-Wert wurde wie im Folgenden bestimmt:

	5^{-1}	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}	5^{-9}	5^{-10}	
1	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	
2	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	
3	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	
4	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	
5	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	
6	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	

Abb. 2.2 Eine 96-Well Platte mit über Nacht adhärenierten TZM-bl-Zellen wurde mit Virusüberstand in einer 1:5 Verdünnung beladen. Es wurden sechs Ansätze (Nummerierung erste Spalte) 5^{-1} bis 5^{-10} -fach verdünnt. Angabe der Verdünnung in der oberen Zeile. X = Zellen infiziert. - = Zellen nicht infiziert.

Zuerst wurde die Reaktionsrate (R) bestimmt:

Stufe 5^{-6} : 6 von 6 Wells waren infiziert (6/6 =) R = 1

Stufe 5^{-7} : 3 von 6 Wells waren infiziert (3/6 =) R = 0,5

Stufe 5^{-8} : 6 von 6 Wells waren nicht infiziert (0/0 =) R = 0

Daraus ergibt sich die Summe der Reaktionsraten: S = 1,5

Mit folgender Gleichung wurde die $\log \text{TCID}_{50}$ berechnet:

$$\log \text{TCID}_{50} = \log 1,0 - \log \text{int} * (S-0,5)$$

$\log 1,0 = \log$ der höchsten Verdünnungsstufe mit R = 1 $\Rightarrow \log 5^{-6} = -4,1938$

$\log \text{int} = \log$ des Verdünnungsfaktors $\Rightarrow \log 5 = 0,699$

Alle Werte in obige Gleichung eingetragen ergaben:

$$\log \text{TCID}_{50} = -4,1938 - 0,699 \times (1,5 - 0,5)$$

$$-4,8928$$

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-4,8928}$$

$$\text{TCID}_{50} = 1,28 \times 10^{-5}$$

2.2.4.6 Bestimmung der relativen IC₅₀

Um die relative mittlere inhibitorische Konzentration, den rel. IC₅₀ (*50% relative inhibitory concentration*)-Wert, der HOCl-modifizierten Proteine zu bestimmen, wurde ein HIV-1 Infektionstest (Methode 2.2.4.2) durchgeführt. Die Inhibitorkonzentration wurde als X-Wert gegen den prozentualen Anteil infizierter TZM-bl-Zellen bzw. gegen die Anzahl der infektiösen Einheiten (Y-Wert) graphisch aufgetragen. Anschließend wurde der rel. IC₅₀-Wert durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf kalkuliert, welcher mithilfe des Kalkulationsprogramms GraphPad Prism Version 4 der Fa. GraphPad Software erstellt wurde. Die Gleichung der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve lautet wie folgt:

$$Y = \frac{(A1-A2)}{1 + 10^{(x-\text{LogIC}_{50})}} + A2$$

A1 = Top

A2 = Bottom

x = log [µg/ml] Protein

y = Anzahl der infektiösen Einheiten [ffu]

2.2.4.7 Bestimmung des Bestimmtheitsmaßes

Die Kalkulation des Bestimmtheitsmaßes (R²) erfolgte über den Korrelationskoeffizient R mithilfe des Kalkulationsprogramms GraphPad Prism Version 4 der Fa. GraphPad Software und der Gleichung:

$$R = \frac{\sum xy - 1/n(\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[\sum x^2 - 1/n(\sum x)^2][\sum y^2 - 1/n(\sum y)^2]}}$$

n = Größe der Stichprobe bzw. des Merkmalsumfanges

x = log [µg/ml] Protein

y = Anzahl der infektiösen Einheiten [ffu]

3 Ergebnisse

3.1 Neutralisation von HIV-1 durch HOCl-oxidierte Proteine

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit HOCl-modifizierten Proteinen wurde zuerst ein Herstellungsverfahren benötigt, mit dem die antiviralen Proteine anstatt im Milligramm-Maßstab im Gramm-Maßstab hergestellt werden. Anschließend sollte die inhibitorische Aktivität der HOCl-modifizierten Proteine getestet, sowie deren Einfluss auf die Aktivität und Proliferationsfähigkeit von Zellen untersucht werden. Desweiteren wurden Proteine mit einem steigenden molaren Überschuss HOCl modifiziert und deren Wirksamkeit im HIV-Infektionstest untersucht. In einem weiteren Experiment wurde HOCl-modifiziertes humanes Serumalbumin getrocknet, um so eine alternative Lagerung für HOCl-modifizierte Proteine zu etablieren.

3.1.1 Herstellung oxidierter Proteine im technischen Maßstab

Zur Herstellung oxidierter Proteine im großen Maßstab wurden zunächst 5 Liter HOCl-Lösung (0,1%) angesetzt und die Konzentration im Photometer bei einer Wellenlänge von 292 nm bestimmt (Methode 2.2.2.1). Danach wurden HSA, BSA und MSA in einem molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 der HOCl-Lösung zugefügt. Die eingesetzte Menge Serumalbumin entsprach ca. 2,9 g/5 l Lösung. Nach einer zwanzigminütigen Proteinoxidation wurde die Reaktion durch Zugabe von Taurin (25 g/5 l) gestoppt. Das modifizierte Serumalbumin wurde anschließend mittels einer Ultrafiltrationsanlage (Hohlfasersystem, Fa. Amersham, Ausschlussgröße 10 kDa) eingeeengt. Das Taurin mit einer molekularen Masse von 125 Da wurde dabei durch Ultrafiltration abgetrennt. Es folgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Photometer bei 280 nm (Methode 2.2.2.2). Diese entsprach 2,3 g/100 ml modifiziertes Protein. Somit wurde eine Ausbeute von ca. 80% erreicht.

Mit diesem Verfahren wurde gezeigt, dass eine Herstellung von modifizierten Proteinen nicht nur im Milligramm-, sondern auch im Gramm-Maßstab möglich ist. Die Ausbeute von 80% entsprach der Ausbeute bei der Herstellung von oxidierten Proteinen im Milligramm-Maßstab (Methode 2.2.2.1-2.2.2.1.1).

3.1.2 Neutralisation von HIV-1 NL4-3wt mit HOCl-modifizierten Proteinen

Die im vorherigen Kapitel hergestellten modifizierten Serumalbumine (Protein:HOCl-Verhältnis = 1:1000) wurden in einem HIV-Infektionstest (Methode 2.2.4.2) eingesetzt. Zusätzlich wurde für diesen Test β -Galaktosidase modifiziert. Die modifizierte β -Galaktosidase (m β -Gal 1:1000) wurde anschließend durch Ultrafiltration (Amicon-Zentrifugenröhrchen, Ausschlussgröße 10 kDa) eingeeengt (Methode 2.2.2.1.2) und die Konzentration der oxidierten Proteine photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (Methode 2.2.2.2.2). Für den HIV-Infektionstest wurden bereits am Vortag pro *Well* einer 96-*Well*-Platte 10.000 TZM-bl-Zellen ausgesät, welche dann mit den oxidierten Proteinen versetzt wurden. Die Messungen erfolgten bei Proteinendkonzentrationen von 0,5 bis 400 $\mu\text{g/ml}$. Es wurden jeweils drei Messungen pro Test durchgeführt. Für die HIV-Infektion der Zellen wurden 300 infektiöse Einheiten (*ffu*, *focus forming units*)/*Well* des NL4-3wt pipettiert, wobei die TCID_{50} nach der Methode 2.2.4.5 in einem vorangegangenen HIV-Infektionstest bestimmt worden war. Nach einer Inkubation der Zellkultur wurden die Zellen mit Formaldehyd (3,5%) fixiert. Die infizierten Zellen wurden anschließend durch X-Gal angefärbt und danach lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 und 3.2 dargestellt. Es wurden zur Kontrolle TZM-bl-Zellen in Abwesenheit von oxidierten Proteinen mit 300 ffu des HIV NL4-3wt infiziert.

Mit zunehmender Wirkstoffkonzentration wurde eine Abnahme der infizierten Zellen beobachtet (Abb. 3.1). Um die Effektivität der Wirkstoffe miteinander zu vergleichen, wurde die 50%ige relative inhibitorische Konzentration (rel. IC_{50} , *50% relative inhibitory concentration*) von mHSA, mBSA, mMSA und m β -Gal 1:1000 berechnet (Methode 2.2.4.6). Hierfür wurde zunächst ein sigmoidaler Kurvenverlauf mit den vorhandenen Daten durch das Kalkulationsprogramm GraphPad Prism Version 4 der Fa. GraphPad Software erstellt (Abb. 3.1, gepunktete Linie). Für mHSA 1:1000 wurde ein rel. IC_{50} -Wert $> 5 \mu\text{g/ml}$ und für mBSA 1:1000 wurde ein rel. IC_{50} -Wert $> 3 \mu\text{g/ml}$ kalkuliert. Für mMSA 1:1000 und für m β -Gal 1:1000 wurde ein rel. IC_{50} -Wert $> 20 \mu\text{g/ml}$ bzw. $14 \mu\text{g/ml}$ errechnet. Ein Vergleich dieser Werte zeigt einen geringen Abfall der Wirksamkeit in der Reihe: mBSA~mHSA>m β Gal~mMSA. Dabei bewegen sich die rel. IC_{50} -Werte in einem Bereich zwischen $3 \mu\text{g/ml}$ (mBSA) und $20 \mu\text{g/ml}$ (mMSA). Das Bestimmtheitsmaß (R^2 , *Coefficient of Determination*) für diese

Messungen wurde mittels Korrelationskoeffizienten R und dem Programm GraphPad Prism kalkuliert. Für mHSA wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,99, für mBSA von 0,99, für mMSA von 0,98 und für m β -Gal von 0,94 berechnet.

Zusätzlich wurde die durch Geradenanpassung kalkulierte rel. IC₅₀ mit der aus der Graphik direkt abgeleiteten Wirkstoffkonzentration verglichen, bei der 50% des HI-Virus inhibiert wurden. Hierfür wurde in Abb. 3.2 die Wirkstoffkonzentration gegen die Anzahl der infektiösen Einheiten aus dem HIV-Infektionstest dargestellt. Die Anzahl der infizierten Zellen in Abwesenheit von modifizierten Proteinen wurde als 100% definiert. Somit wurde eine 50%ige Hemmung (gepunktete Linie) des Virus bei 8 μ g/ml mHSA abgelesen. Außerdem wurde bei 7 μ g/ml mBSA, 20 μ g/ml mMSA und 17 μ g/ml m β -Gal eine 50%ige Hemmung abgeleitet. Wie bei den kalkulierten IC₅₀-Werten verläuft der Abfall der Wirksamkeit bei den abgelesenen Werten in der Reihe: mBSA~mHSA>m β Gal~mMSA. Die Werte liegen somit in einem Bereich zwischen 7 μ g/ml (mBSA) und 20 μ g/ml (mMSA). Folglich fallen die kalkulierten inhibitorischen Konzentrationen um 3-4 μ g/ml geringer aus als die abgelesenen Konzentrationen. Die kalkulierten und geschätzten Wirkstoffkonzentrationen des modifizierte mMSA sind identisch.

Zusätzlich wurde aus der Abb. 3.2 die Wirkstoffkonzentration geschätzt, bei der 90% des Virus im HIV-Infektionstest inhibiert wurde. Dabei wurden bei einer Endkonzentration von 19 μ g/ml mBSA, 39 μ g/ml mHSA, 66 μ g/ml mMSA und 70 μ g/ml m β -Gal 90% weniger Zellen infiziert.

Die Ergebnisse der Auswertung zeigen, dass ab einer Endkonzentration von 20 μ g/ml (mMSA) 50% und ab einer Endkonzentration von 70 μ g/ml (m β -Gal) 90% des NL4-3wt *in vitro* gehemmt wurden.

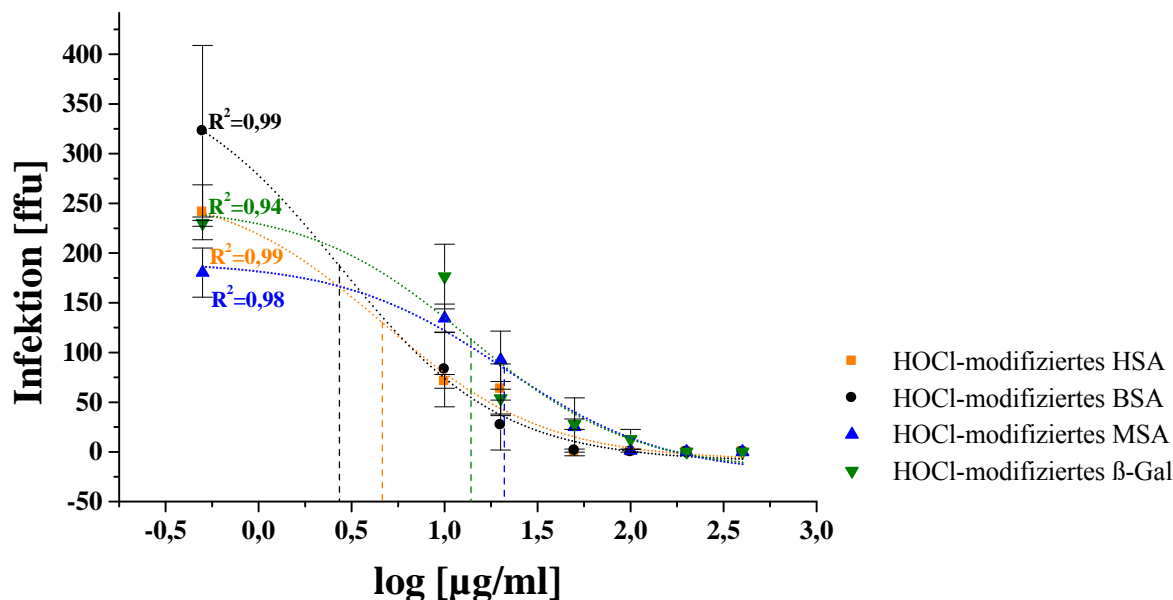


Abb. 3.1: Bestimmung der relativen IC_{50} von modifizierten Proteinen. HSA, BSA, MSA und β -Galaktosidase wurden jeweils im Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 modifiziert und in einem HIV-Infektionstest eingesetzt. Hierfür wurden 10.000 TZM-bl-Zellen mit 300 ffu HIV NL4-3wt in Anwesenheit der HOCl-modifizierten Proteine infiziert *Multiplicity of infection* (MOI) = 0,03. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 3,5% Formaldehyd fixiert. HIV-infizierte Zellen wurden nach einer X-Gal-Färbung lichtmikroskopisch ausgezählt. Es wurden jeweils 3 Werte pro Konzentration gemessen. Es sind die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken angegeben. $SD_{mHSA} \leq 12\%$; $SD_{mBSA} \leq 24\%$; $SD_{mMSA} \leq 16\%$ und $SD_{m\beta Gal} \leq 16\%$. Der rel. IC_{50} -Wert (gestrichelte Linie) wurde durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf (gepunktete Linie) kalkuliert ($Y = A2 + [A1 - A2] / (1 + 10^{[X - \text{Log}IC_{50}]})$); A1 = höchster Y-Wert; A2 = niedrigster Y-Wert). R^2 = Bestimmtheitsmaß.

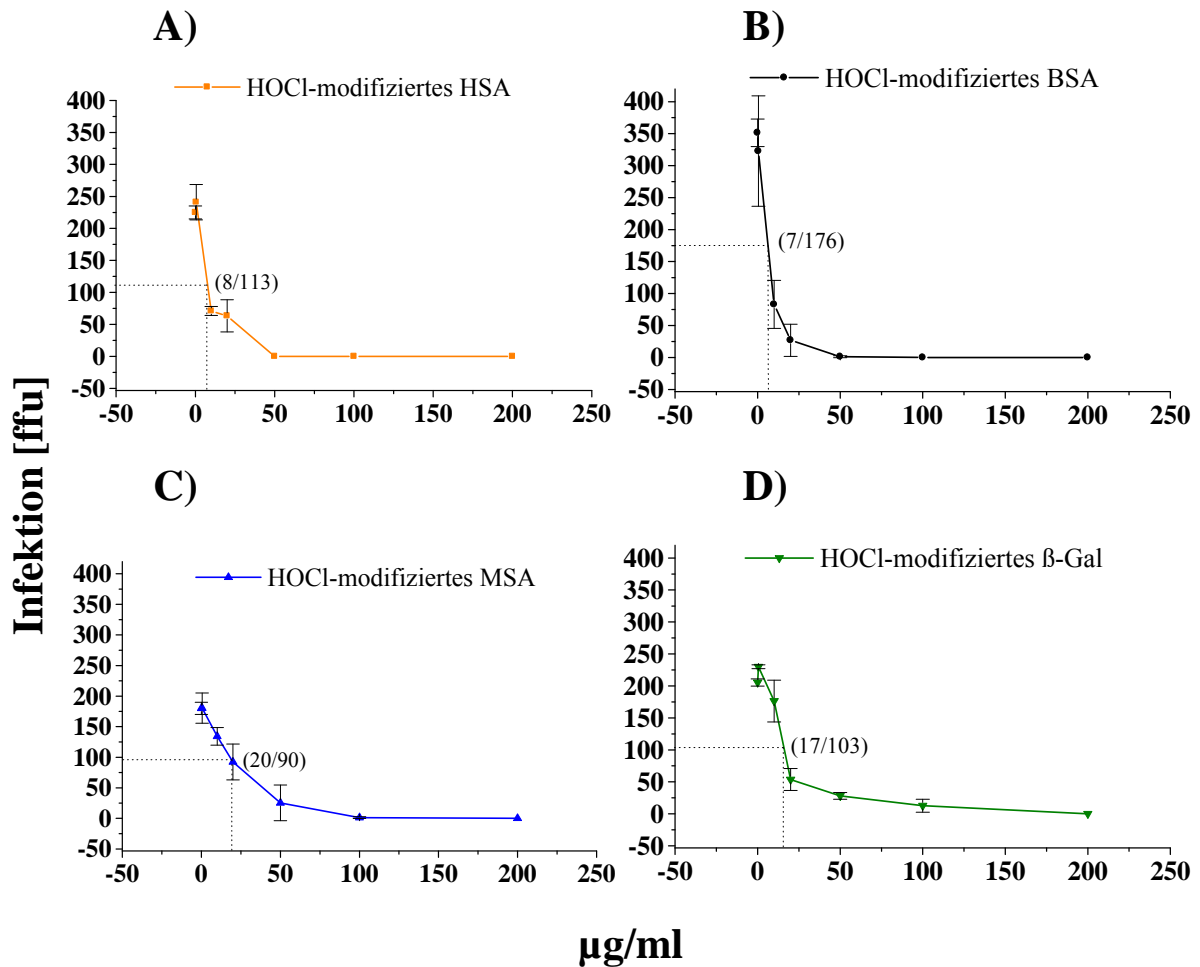


Abb. 3.2: Bestimmung der Proteinkonzentration für eine 50%ige Virusinhibition. A) HSA, B) BSA, C) MSA und D) β-Galaktosidase wurden für einen HIV-Infektionstest im Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 modifiziert. Die am Vortag ausgesäten 10.000 TZM-bl-Zellen wurden zuerst mit den modifizierten Proteinen versetzt und anschließend mit 300 ffu HIV NL4-3wt infiziert (MOI = 0,03). Eine Fixierung durch eine 3,5%igen Formaldehydlösung erfolgte nach 48 Stunden. Die HIV-infizierten Zellen wurden anschließend mittels X-Gal gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt. Es wurden jeweils 3 Werte pro Konzentration gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken. Anschließend wurde die Inhibition der Viren um 50% (gestrichelte Linie) durch mHSA, mBSA, mMSA und mβ-Gal aus dem Kurvenverlauf abgeleitet (gepunktete Linie). (x/y) = x/y-Wertepaar

3.1.3 Untersuchung des Einflusses von HOCl-modifizierten Proteinen auf die Vitalität und Proliferation von Zellen

Der antivirale Effekt von mHSA 1:1000, mBSA 1:1000, mMSA 1:1000 und m β -Gal 1:1000 wurde in Kapitel 3.1.2 durch einen HIV-Infektionstest nachgewiesen. Es sollte nun im Folgenden gezeigt werden, dass die antivirale Wirkung nicht durch einen zelltoxischen Effekt hervorgerufen wurde. Hierfür wurde die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien HeLaP4 und TZM-bl nach Zugabe von modifizierten Proteinen durch einen MTT-Test (Methode 2.2.3.6) untersucht.

Für den MTT-Test wurden die am Vortag ausgesäten HeLaP4- und TZM-bl-Zellen mit HOCl-modifizierten HSA, BSA, MSA und β -Gal 1:1000 aus Kapitel 3.1.2 in den Endkonzentrationen 0, 1, 10, 50, 100, 200, 400 und 600 $\mu\text{g/ml}$ versetzt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle (Negativkontrolle) in den gleichen Endkonzentrationen nicht modifiziertes HSA, BSA, MSA und β -Gal getestet. Es wurden jeweils sechs Messungen pro Test durchgeführt. Die Vitalität der Zellen ohne Zusatz von modifizierten und nicht modifizierten Proteinen wurde als 100% definiert (Positivkontrolle).

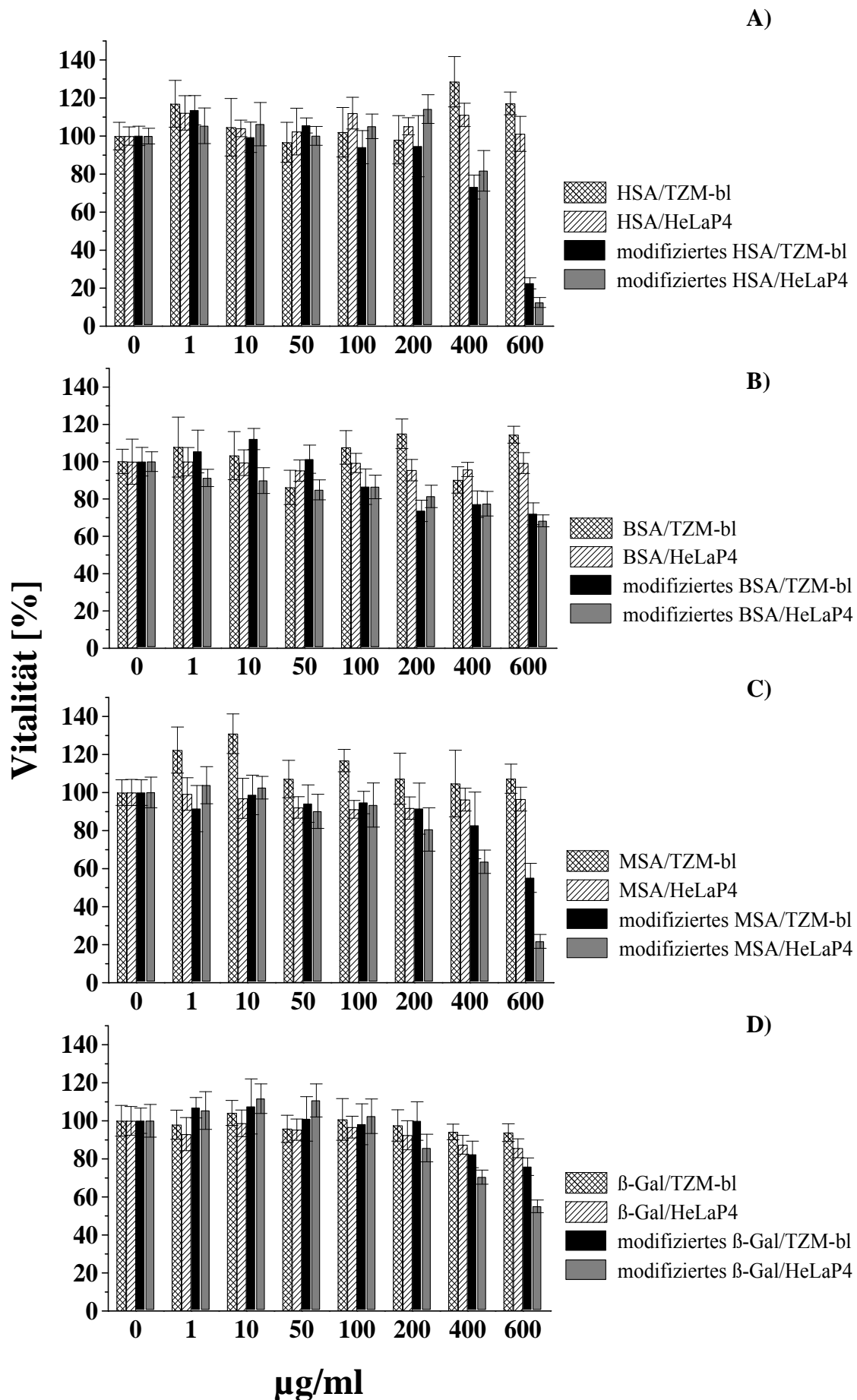
Die Ergebnisse der Vitalitätstests wurden in Abb. 3.3 dargestellt und in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Es wurde beobachtet, dass die Messergebnisse im MTT-Test um 20% schwankten. Daher wurde ein zelltoxischer Effekt bei einer Minderung der Zellproliferation $\geq 20\%$ angenommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass kein toxischer Effekt innerhalb der HeLaP4- und TZM-bl-Zellkulturen bis zu einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ oxidiertes Protein festzustellen war. Es wurde beobachtet, dass mHSA 1:1000 in einer Endkonzentration $> 400 \mu\text{g/ml}$ in HeLaP4- und in einer Endkonzentration $> 200 \mu\text{g/ml}$ in der TZM-bl-Zellkultur toxisch wirkte. Das mBSA 1:1000 wiederum war ab einer Endkonzentration $> 400 \mu\text{g/ml}$ in der HeLaP4- und TZM-bl-Zellkultur toxisch. Das in HeLaP4-Zellkultur getestete mMSA 1:1000 wirkte sich in einer Endkonzentration $> 200 \mu\text{g/ml}$ negativ auf die Zellvitalität aus. Daneben war mMSA 1:1000 in der TZM-bl-Zellkultur in einer Endkonzentration $> 400 \mu\text{g/ml}$ toxisch. Die Zellvitalität verringerte sich in der HeLaP4-Zellkultur in einer Endkonzentration $> 200 \mu\text{g/ml}$ m β -Gal und in der TZM-bl-Zellkultur in einer Endkonzentration $> 400 \mu\text{g/ml}$ m β -Gal.

Keine Verringerung der Vitalität von HeLaP4- und TZM-bl-Zellen wurde in der Negativkontrolle (1- 600 µg/ml Protein) beobachtet.

Die gemessenen Konzentrationen wurden mit den Wirkstoffkonzentrationen aus Kapitel 3.1.2, bei denen in einem HIV-Infektionstest 90% der Viren inhibiert wurden, verglichen (siehe auch Tab. 3.1). Man erkennt, dass bis zur 3-fachen (mMSA), 3-fachen (mβ-Gal), 5-fachen (mHSA) und 20-fachen (mBSA) Wirkstoffkonzentration, bei der 90% der HI-Viren gehemmt wurden, die Inhibitoren in Zellkultur keinen zelltoxischen Effekt verursachen. Damit wurde gezeigt, dass der inhibitorische Effekt von mHSA, mBSA, mMSA und mβ-Gal 1:1000 im HIV-Infektionstest (Kapitel 3.1.2) nicht durch einen unspezifischen toxischen Effekt verursacht wird.



← **Abb. 3.3: Untersuchung der Vitalität und Proliferation von Zellen mittels MTT-Test.** Es wurden 10.000 TZM-bl- bzw. HeLaP4-Zellen pro Well einer 96-Well-Plate gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde **A)** HSA, **B)** BSA **C)** MSA und **D)** β -Galaktosidase in HOCl-modifizierter (Protein:HOCl-Verhältnis = 1:1000) und nicht modifizierter Form in die Zellkultur gegeben. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Zellkultur mit MTT versetzt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und der Farbumschlag von Gelb nach Dunkelblau bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm bestimmt. Es wurden pro Konzentration 6 Werte gemessen. Die dargestellten Mittelwerte sind referenzsubtrahiert. Die Positivkontrolle (= 0 μ g/ml) wurde als 100% definiert. Die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) sind als Fehlerbalken dargestellt. $SD_{mHSA} \leq 16\%$; $SD_{mBSA} \leq 16\%$; $SD_{mMSA} \leq 18\%$ und $SD_{m\beta Gal} \leq 15\%$.

Inhibitor	Zelltoxischer Effekt ^a der Inhibitoren bei einer Konzentration von x (μ g/ml) auf		90%ige Inhibition der NL4-3wt- Infektion ^b bei folgender Konzentration (μ g/ml)	Zelltoxischer Effekt tritt bei der x-fachen IC ₉₀ auf
	HeLaP4	TZM-bl		
mHSA 1:1000	> 400	> 200	> 39	5
mBSA 1:1000	> 400	> 400	> 19	20
mMSA 1:1000	> 200	> 400	> 66	3
m β -Gal 1:1000	> 200	> 400	> 70	3

Tab. 3.1: Die Zelltoxizität der Inhibitoren im Vergleich zur ihrer inhibitorischen Wirksamkeit *in vitro*. Es wurden die Ergebnisse aus der Abb. 3.3 zusammengefasst und den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.2 gegenüber gestellt. ^aEs wurde ein zelltoxischer Effekt bei einer Minderung der Zellproliferation $\geq 20\%$ angenommen.

^b Der Versuch wurde auf TZM-bl-Zellen durchgeführt.

3.1.4 Modifizierung von Serumalbuminen mit einer steigenden Konzentration HOCl und deren Testung auf antivirale Wirksamkeit

Nachdem die antivirale Wirksamkeit von mHSA, mBSA und mMSA 1:1000 nachgewiesen wurde, sollte nun untersucht werden, bei welchem Protein:HOCl-Verhältnis dieser Effekt entsteht. Hierfür wurde HSA, BSA und MSA im molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 modifiziert und in einem HIV-Infektionstest untersucht.

Die Herstellung der modifizierten Serumalbumine erfolgte nach der Methode 2.2.2.1, aber in unterschiedlichen Volumina. Es wurden zum Einen jeweils 100 mg HSA bzw. BSA mit HOCl versetzt und mit PBS pH 7,4 auf ein Endvolumen von 160 ml eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Taurin (5 g/l) gestoppt. Anschließend wurde jede Probe durch Ultrafiltration (Hohlfasensystem, Ausschlussgröße 10 kDa) eingeeengt (Methode 2.2.2.1.3) und mit PBS pH 7,4 umgepuffert. Zum Anderen wurden 5 mg MSA mit HOCl versetzt und mit PBS pH 7,4 auf ein Endvolumen von 16 ml eingestellt. Auch diese Reaktion wurde durch Zugabe von Taurin (5 g/l) beendet. Der Ansatz wurde anschließend durch Ultrafiltration (Amicon-Zentrifugenröhrchen, Ausschlussgröße 10 kDa) eingeeengt (Methode 2.2.2.1.2) und mit PBS pH 7,4 umgepuffert. Die Konzentration der modifizierten Proteine wurde danach photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (Methode 2.2.2.2.2).

In einem HIV-Infektionstest (Methode 2.2.4.2) wurde jeweils in einer Endkonzentration von 0,1, 1, 10, 20, 50, 100 und 200 µg/ml HOCl-modifiziertes HSA, BSA und MSA getestet. Es wurden jeweils drei Messungen pro Test durchgeführt und die Ergebnisse in Abbildung 3.4.A-3.6.A) anhand einer Dosis-Wirkungsbeziehung dargestellt. Für die Bestimmung der 50%igen und 90%igen Hemmkonzentration der modifizierten Proteine wurde in Abbildung 3.4.B-3.6.B) die Proteinkonzentration gegen die Infektion in Prozent dargestellt. Eine tabellarische Übersicht der abgeleiteten Hemmkonzentrationen ist in der Abbildung 3.4.C-3.6.C) gezeigt.

Der Vergleich aller Hemmkonzentrationen der mHSA-Proben zeigt deutlich, dass die Zunahme der antiviralen Eigenschaft mit einer Zunahme der HOCl-Konzentration korreliert. Dabei ist zu beobachten, dass bei mHSA 1:1000 eine Endkonzentration von 13 µg/ml und bei mHSA 1:500 15 µg/ml ausreichen, um 50% der Viren zu inhibieren. Modifiziertes HSA 1:300 benötigt 18 µg/ml und mHSA 1:200 23 µg/ml. Bei mHSA 1:100 müssen 90 µg/ml eingesetzt werden, um eine 50%ige

Hemmung zu erzielen. Mit abnehmendem HSA:HOCl-Verhältnis ($< 1:300$) wird die Protein-konzentrationsabhängige Steigung flacher und es ist nicht mehr möglich, eine 90%ige Hemmkonzentration für mHSA 1:200 und 1:100 in diesem Messbereich abzulesen. Für eine 90%ige Hemmung der Virusinfektion wurden vom modifizierten HSA 1:1000 51 $\mu\text{g/ml}$, vom mHSA 1:500 76 $\mu\text{g/ml}$ und vom mHSA 1:300 82 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

Ein Vergleich der 50%igen Hemmkonzentrationen macht deutlich, dass sich die Werte von dem mHSA 1:200 bis 1:1000 in einem dichten Bereich (13-23 $\mu\text{g/ml}$ modifiziertes Protein) bewegen und erst mit einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 die antivirale Wirkung abnimmt.

Beim modifizierten MSA wiederum wurde gezeigt, dass ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:200 der antivirale Effekt abnimmt (Abb.3.6.C). Das modifizierte MSA 1:300, 1:500 und 1:1000 zeigte eine 50%ige Hemmkonzentration in einem Bereich von 15-27 $\mu\text{g/ml}$ Protein. Die 90%ige Hemmkonzentration wurde für mMSA 1:1000 (62 $\mu\text{g/ml}$) und mMSA 1:500 (84 $\mu\text{g/ml}$) abgeleitet. Mit mMSA in einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:300 bis 1:1 wurde in diesem untersuchten Konzentrationsbereich keine 90%ige Virusinhibition mehr bewirkt. Somit zeigt mMSA verglichen mit mHSA eine wesentlich schlechtere antivirale Effektivität.

Anders verhält es sich mit dem modifizierten BSA. Schon bei einer Endkonzentration von 8 bis 15 $\mu\text{g/ml}$ Protein inhibieren mBSA 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 die Infektion um 50% (Abb.3.5.C). Um mit mBSA 1:100 eine 50%ige Virushemmung zu erzielen wurden 24 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Das ist verglichen mit mHSA 1:100 eine ca. 75% geringere Dosis. Mit dem modifizierten MSA 1:100 wurde in diesem untersuchten Konzentrationsbereich keine 50%ige Hemmung mehr erreicht. Alle getesteten modifizierten Serumalbumine in einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:50 bis 1:1 zeigten in dem gemessenen Konzentrationsbereich keine Virusinhibition unter 60%. Das mHSA und besonders das mMSA wiesen in diesem Protein:HOCl-Verhältnis sogar einen verstärkenden Effekt auf die NL4-3wt-Infektion auf.

Zusammenfassend zeigt ein Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen, bei denen 50% der Viren inhibiert werden, einen Abfall der Wirksamkeit in der Reihe:

$$\begin{aligned} & \text{mHSA}_{1:1000} = \text{mHSA}_{1:500} = \text{mHSA}_{1:300} \sim \text{mHSA}_{1:200} > \text{mHSA}_{1:100} \gg \text{mHSA}_{1:50-1:1} \\ & \text{mBSA}_{1:500} = \text{mBSA}_{1:300} = \text{mBSA}_{1:200} > \text{mBSA}_{1:1000} > \text{mBSA}_{1:100} \gg \text{mBSA}_{1:50-1:1} \\ & \text{mMSA}_{1:300} \sim \text{mMSA}_{1:1000} = \text{mMSA}_{1:500} > \text{mMSA}_{1:200} \gg \text{mMSA}_{1:100-1:1} \end{aligned}$$

Die Ergebnisse der Auswertung zeigen, dass bei einer Modifizierung von BSA und HSA mit einem 100-fachen und bei MSA mit einem 200-fachen molaren Überschuss HOCl ein antiviraler Effekt in Zellkultur sichtbar wird. Bei einer Erhöhung des molaren Überschusses HOCl bis zu einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 kommt es zu einem Anstieg der antiviralen Wirkung und somit zu einer 100%igen Virusinhibition innerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches.

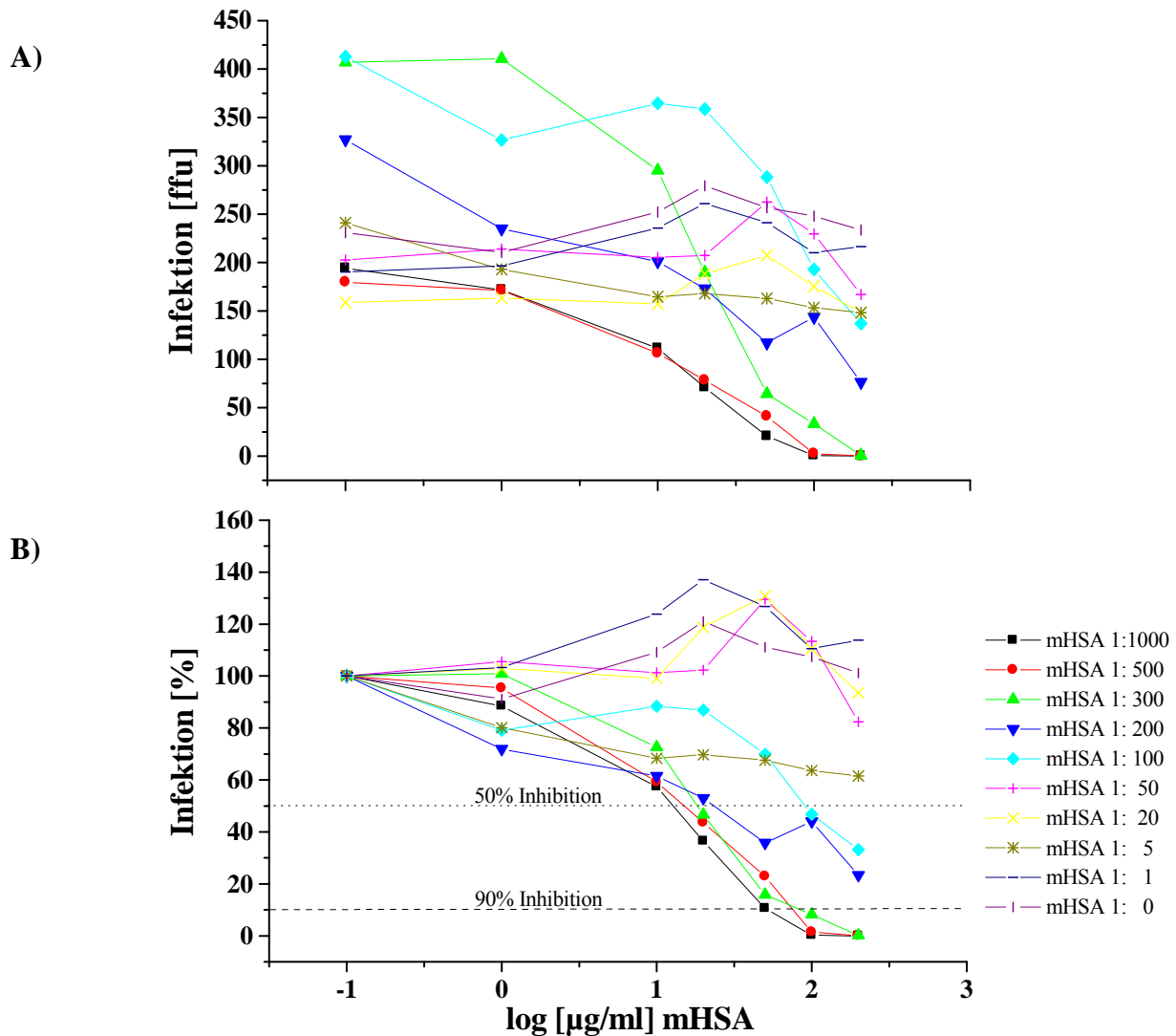
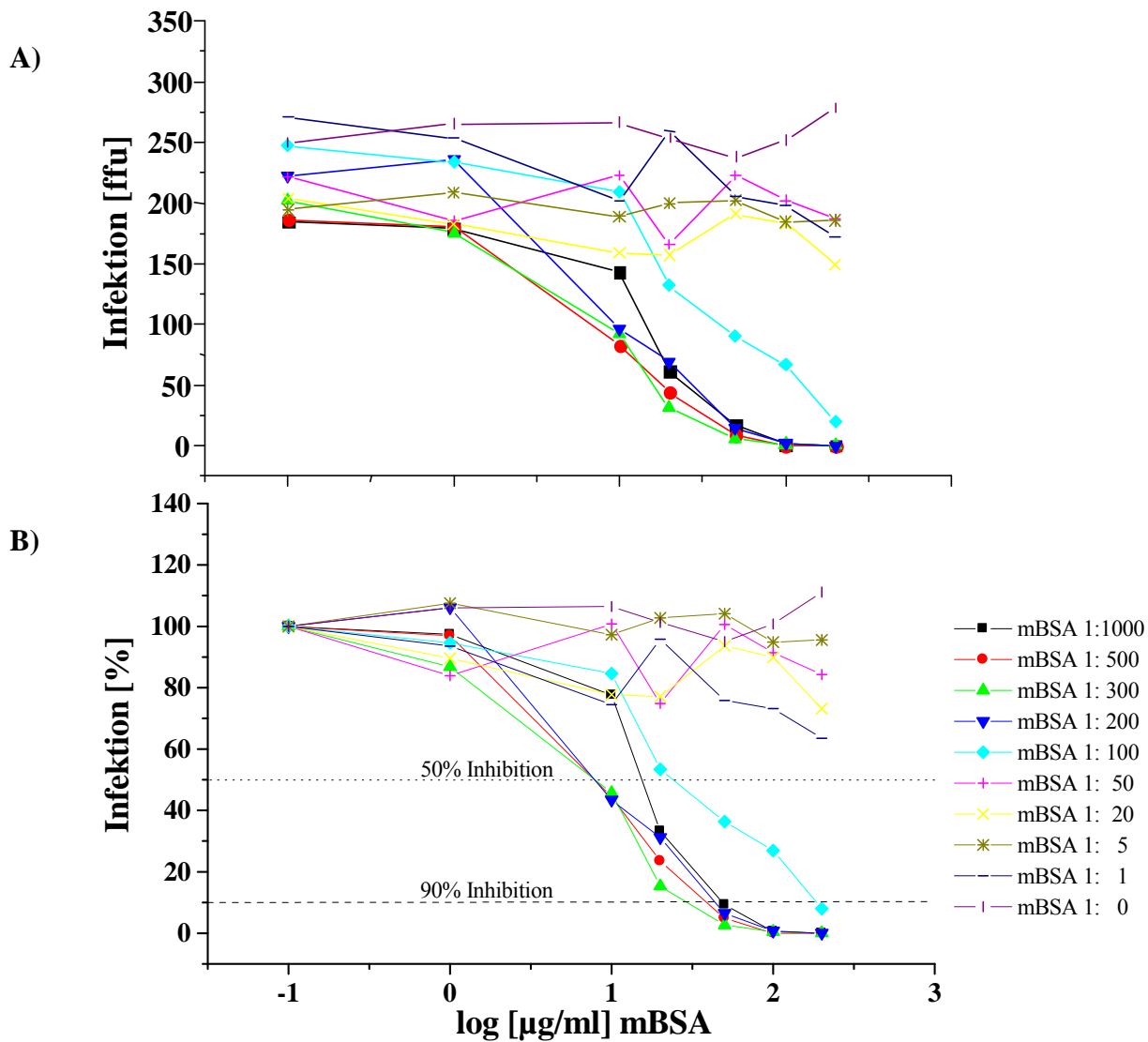


Abb.3.4: Neutralisation von NL4-3wt mit HOCl-modifiziertem HSA. **A)** HSA wurde im molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0 bis 1:1000 modifiziert und in einem HIV-Infektionstest eingesetzt. Hierfür wurden 10.000 TZM-bl-Zellen mit 250 ffu NL4-3wt (MOI = 0,025) in Anwesenheit der modifizierten Serumalbumine infiziert (MOI = 0,025). Nach 48 Stunden wurde die Zellkultur mit 3,5% Formaldehyd fixiert und die infizierten Zellen nach einer X-Gal-Färbung ausgezählt. Es wurden jeweils 3 Werte pro Konzentration gemessen und als Mittelwert dargestellt. **B)** Zur Bestimmung der 50%igen (gepunktete Linie) und 90%igen (gestrichelte Linie) Hemmkonzentration wurden die Ergebnisse aus A) in Prozent dargestellt. **C)** Die Hemmkonzentrationen aus Graphik B) wurden tabellarisch zusammengefasst.

- = nicht bestimmbar. $SD_{mHSA} \leq 20\%$



C)

BSA:HOC1-Verhältnis	1:1000	1:500	1:300	1:200	1:100
50%ige Inhibition (µg/ml)	15	8	8	8	24
90%ige Inhibition (µg/ml)	49	38	29	44	183

Abb.3.5: Neutralisation von NL4-3wt mit HOC1-modifiziertem BSA. **A)** In einem HIV-Infektionstest wurden 10.000 TZM-bl-Zellen mit 250 ffu NL4-3wt (MOI = 0,025) in Anwesenheit der mBSA-Proben 1:0 bis 1:1000 infiziert. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Inkubation und eine Fixierung der Zellkultur mit 3,5%iger Formaldehydlösung. Die infizierten Zellen wurden nach einer X-Gal-Färbung ausgezählt. Anschließend wurden jeweils 3 Werte pro Konzentration gemessen und als Mittelwert dargestellt. **B)** Es folgte eine Darstellung der Ergebnisse aus A) in Prozent und eine Bestimmung der 50%igen (gepunktete Linie) und 90%igen (gestrichelte Linie) Hemmkonzentration. Die Hemmkonzentrationen sind in Graphik C) tabellarisch zusammengefasst. $SD_{mBSA} \leq 21\%$

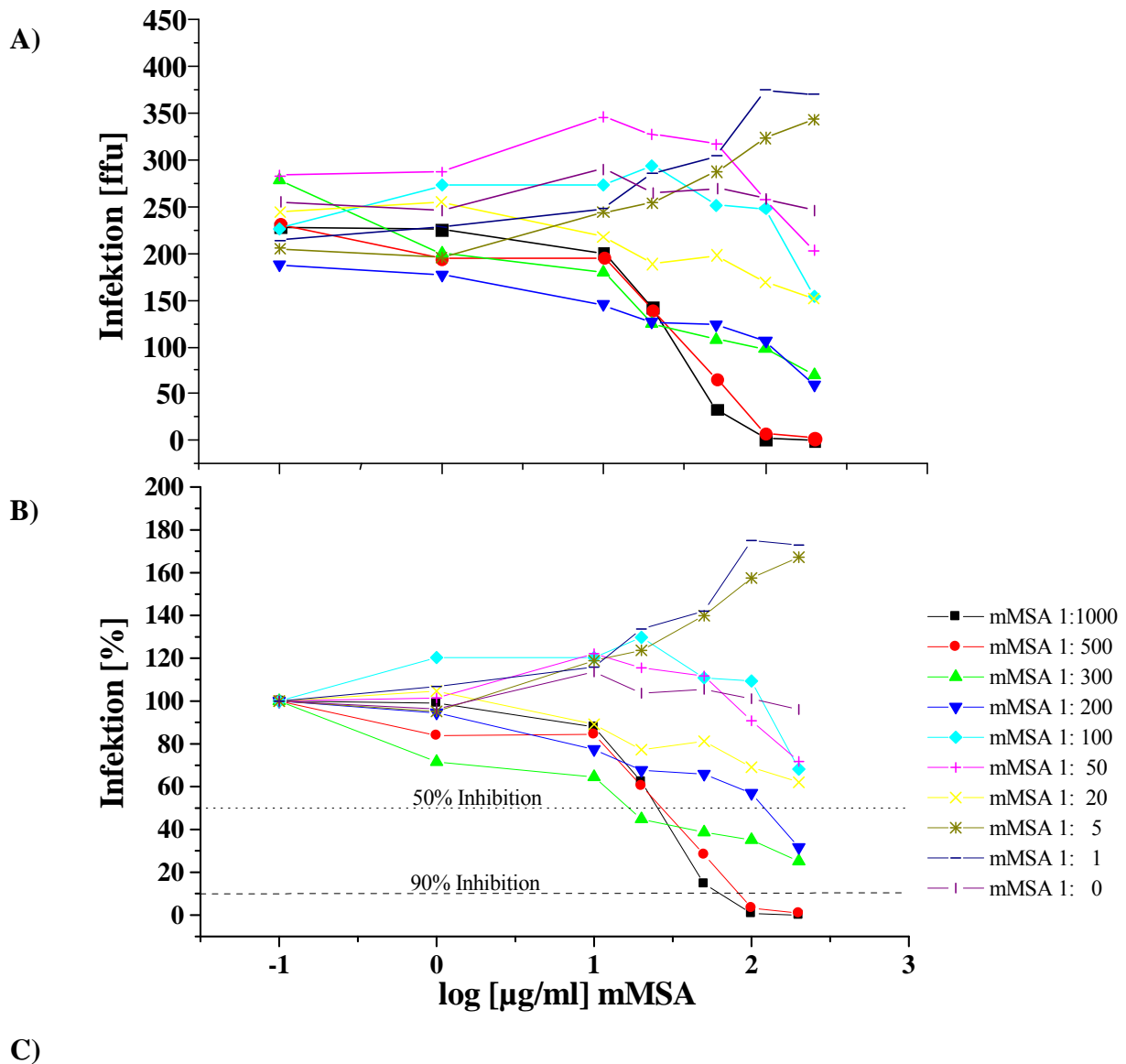


Abb.3.6: Neutralisation von NL4-3wt mit HOCl-modifiziertem MSA. **A)** Es wurden mMSA-Proben 1:0 bis 1:1000 hergestellt und in einem HIV-Infektionstest getestet. Für diesen wurden 10.000 TZM-bl-Zellen nach Probenzugabe mit 250 ffu NL4-3wt (MOI = 0,025) infiziert. Dann wurde die Zellkultur nach einer 48-stündigen Inkubation mit 3,5%iger Formaldehydlösung fixiert. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit X-Gal gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt. Es wurden jeweils 3 Werte pro Konzentration gemessen und gemittelt. **B)** Darstellung der Ergebnisse aus A) in Prozent. Zusätzlich ist die 50%ige (gepunktete Linie) und 90%ige (gestrichelte Linie) Hemmkonzentration gezeigt. **C)** Die Ergebnisse aus B) sind tabellarisch zusammengefaßt. - = nicht bestimmbar. $SD_{mMSA} \leq 22\%$

3.1.5 Neutralisation von HIV-1 NL4-3wt mit getrocknetem HOCl-modifizierten HSA

In den bisherigen Versuchen mit HIV-1 NL4-3wt hat sich gezeigt, dass HOCl-modifiziertes mHSA 1:1000 antivirale Aktivität besitzt. In dem folgenden Versuch sollte nun überprüft werden, ob durch das Trocknen der Proteine und anschließender Lagerung von bis zu einem Jahr dieser antivirale Effekt erhalten bleibt.

Für diesen Versuch wurde modifiziertes HSA 1:1000 aus dem Kapitel 3.1.1 mittels einer Speedvac (Fa. Nunc) für 4 Stunden im Vakuum getrocknet (Methode 2.2.2.4). Anschließend wurden die Proteine bei -20°C , 4°C , Raumtemperatur und 56°C gelagert. Um die Wirksamkeit der getrockneten Proteine nach der Lagerung zu überprüfen wurden die Proben nach 1, 3, 12, 21, 44, 226 und 365 Tagen in ddH₂O gelöst und in einem HIV-Infektionstest eingesetzt. Hierfür wurde die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (Methode 2.2.2.2). Anschließend wurden die Proteine im HIV-Infektionstest in einer Endkonzentration von 0,5, 1, 10, 20, 50, 100, 200, und 400 $\mu\text{g/ml}$ mHSA getestet. Es wurden jeweils 500 infektiöse Einheiten/*Well* des HI-Virus NL4-3wt eingesetzt, die in einer vorangegangenen TCID₅₀-Bestimmung (Methode 2.2.4.5) titriert wurden. Pro Test wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von mHSA in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Protein wurde als 100% definiert, die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von mHSA in den verbleibenden Endkonzentrationen entsprechend auf diesen Wert normiert. Die Ergebnisse der HIV-Infektionsuntersuchungen sind in Abb. 3.7A) bis D) dargestellt. Die 50%ige Virushemmung wurde direkt aus der Graphik abgeleitet (gestrichelte Linie) und die Werte tabellarisch in Abb. 3.7.E) zusammengefasst. Zusätzlich wurde mithilfe des Kalkulationsprogramms GraphPad Prism die IC₅₀ und das dazugehörige Bestimmtheitsmaß (R^2) berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7.F) abgebildet.

Ein Vergleich der 50%igen Hemmkonzentration des getrockneten mHSA mit den mHSA-Hemmkonzentrationen aus den vorangegangenen Kapiteln (3.1.2 und 3.1.4) zeigt deutlich, dass nach Trocknung des modifizierten Proteins die antivirale Aktivität erhalten bleibt.

Dabei ist zu erkennen, dass die Lagerung der getrockneten Proteine bei 4°C bis zu einem Jahr ohne Verlust der inhibitorischen Effektivität möglich ist. Die bei -20°C gelagerten Proteine verlieren ihre inhibitorische Wirksamkeit nach 21 Tagen. Die

50%ige Hemmkonzentration nimmt um das 3-fache ab. Nach 224 Tagen ist bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben ein Abfall der Hemmkonzentration um das 2 bis 3-fache zu beobachten. Bei einer Lagertemperatur von 56°C bleibt die antivirale Wirkung erhalten.

Die durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf kalkulierten IC_{50} -Werte fallen um 2 µg/ml mHSA geringer aus als die abgelesenen Werte. Das Bestimmtheitsmaß liegt zwischen 0,9 bis 1. Vergleicht man die IC_{50} -Werte untereinander, so zeigt sich, dass die optimale Lagertemperatur bei 4°C liegt. Aber auch die Lagerung bei 56°C ist mit minimalem Verlust der antiviralen Wirksamkeit möglich. Der IC_{50} -Wert von den bei Raumtemperatur gelagerten Proben verschlechterte sich am Tag 224. Der IC_{50} -Wert von den bei -20°C gelagerten Proben sogar schon am Tag 44.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Lagerung der Proben bei 4°C und 56°C, nicht aber bei -20°C, optimal ist. Bei Raumtemperatur ist die Lagerung bis zu 44 Tagen ohne Verlust der antiviralen Aktivität möglich. Es ist die Lagerung bei 4°C zu bevorzugen. Durch den Trocknungsprozess ist kein Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit zu beobachten.

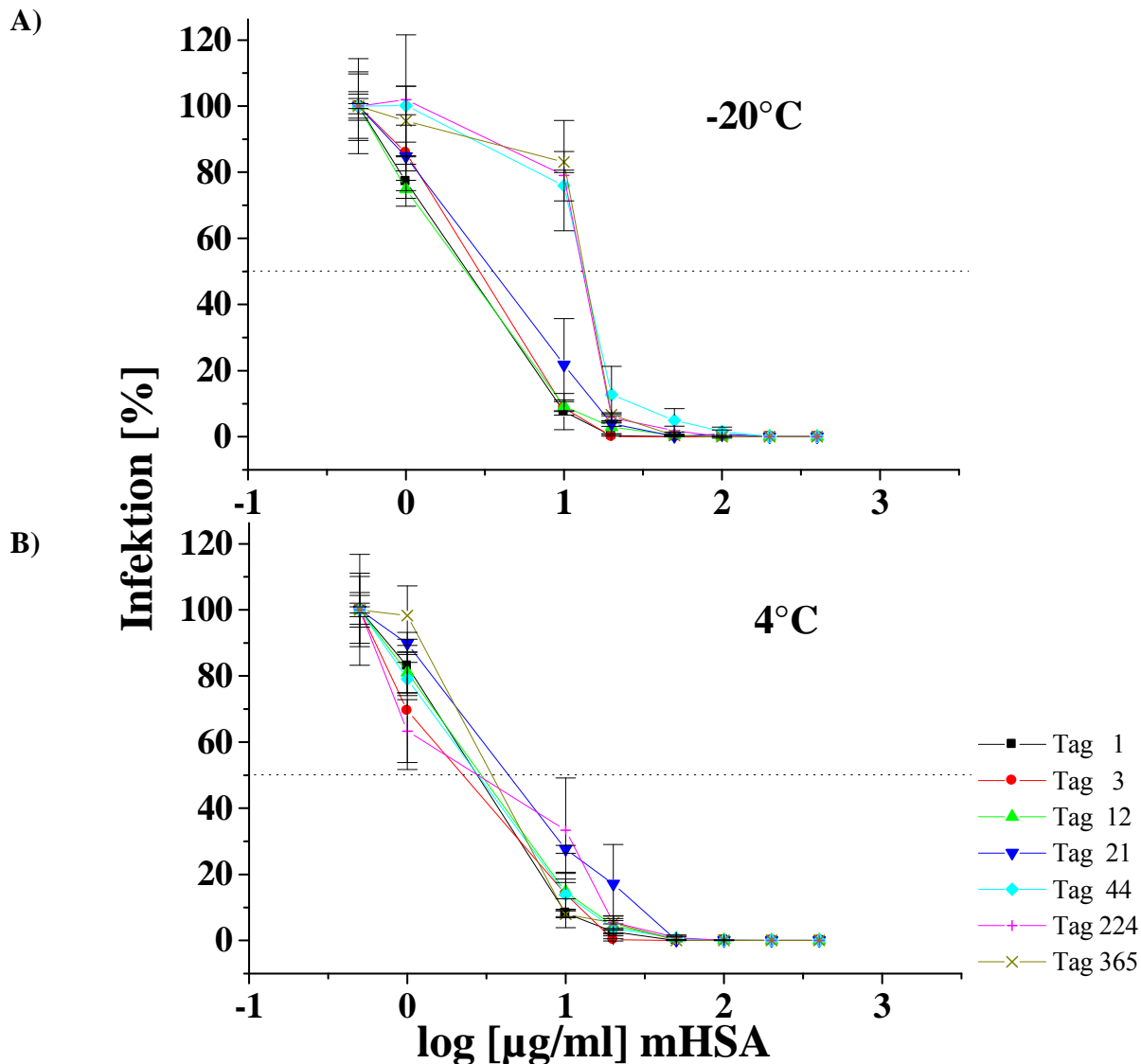
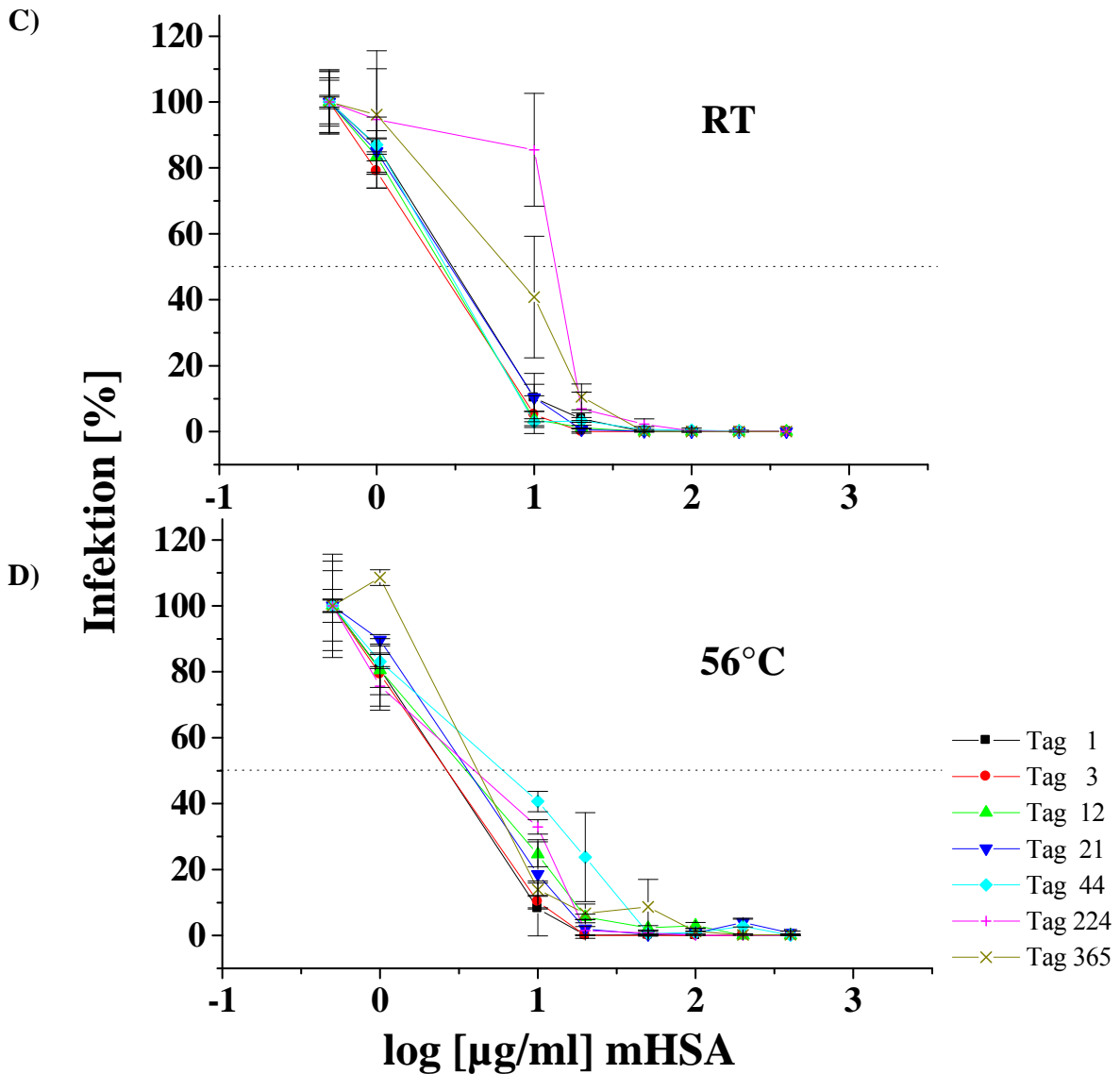


Abb. 3.7: Neutralisation des HIV-1 NL4-3wt mit getrocknetem HOCl-modifizierten HSA. HSA wurde im Protein:HOCl-Verhältnis 1:1000 modifiziert und unter Vakuum getrocknet. Nach einer Lagerzeit von 1 bis 365 Tagen bei **A)** -20°C **B)** 4°C **C)** RT und **D)** 56°C wurden die modifizierten Proteine in ddH₂O gelöst und in einem HIV-Infektionstest eingesetzt. Hierfür wurden 10.000 TZM-bl-Zellen mit 500 ffu HIV NL4-3wt (MOI = 0,05) in Anwesenheit des modifizierten Serumalbumins infiziert. Nach 48 Stunden wurde die Zellkultur mit 3,5% Formaldehyd fixiert. Die HIV-infizierten Zellen wurden nach einer X-Gal-Färbung lichtmikroskopisch ausgezählt. Es sind die Mittelwerte von drei gemessenen Konzentrationen und die dazugehörige Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken angegeben. Die 50%ige Hemmkonzentration wurde direkt aus den Graphiken abgeleitet (gestrichelte Linie) und zur Übersicht tabellarisch in Graphik E) dargestellt. Die relativen IC₅₀-Werte wurden durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf berechnet ($Y = A_2 + [A_1 - A_2] / (1 + 10^{[X - \text{LogIC}_{50}]})$; A1 = höchster Y-Wert; A2 = niedrigster Y-Wert) und sind in E) den 50%igen Hemmkonzentrationen gegenüber gestellt. $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß. $SD_{-20^{\circ}\text{C}} \leq 20\%$; $SD_{4^{\circ}\text{C}} \leq 18\%$; $SD_{\text{RT}} \leq 21\%$ und $SD_{56^{\circ}\text{C}} \leq 16\%$.



E)

		Lagerzeit in Tagen:						
		1	3	12	21	44	224	365
-20°C	50%ige Hemmung ($\mu\text{g/ml}$)	2	3	2	4	13	13	13
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	1	1	1	2	11	11	12
	R ²	1	0,99	1	1	0,93	0,90	0,89
4°C	50%ige Hemmung ($\mu\text{g/ml}$)	3	2	3	4	3	3	4
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	1	1	1	4	1	2	2
	R ²	0,99	1	1	1	1	0,95	0,98
RT	50%ige Hemmung ($\mu\text{g/ml}$)	3	3	3	3	3	14	7
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	2	1	1	1	1	12	5
	R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,88	0,99
56°C	50%ige Hemmung ($\mu\text{g/ml}$)	3	3	4	4	6	4	4
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	1	1	2	2	6	3	2
	R ²	0,99	1	1	0,99	0,99	0,97	0,97

3.2 Bindungsstudien von HOCl-modifizierten HSA, BSA und MSA mit HIV-1-Glykoproteinen

Es wurde im Kapitel 3.1.2 belegt, dass mHSA 1:1000, mBSA 1:1000 und mMSA 1:1000 das X4-trope HIV-1 NL4-3wt inhibiert. Mittels SPR-Untersuchungen sollte nun gezeigt werden, dass das Oberflächenprotein gp120IIIIB (X4-trop), nicht aber das Transmembranprotein gp41MN (X4-trop) mit den HOCl-modifizierten Serumalbuminen interagiert.

Für den Test wurden auf zwei verschiedenen Flusszellen eines CM5-Biosensors nach der Methode 2.2.2.14 gp120 bzw. gp41 immobilisiert. Es wurden alle Injektionen bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 6 Minuten durchgeführt und als Laufpuffer HBS-EP pH 7,4 verwendet. Für die Immobilisierung wurden gp120 bzw. gp41 in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein auf die jeweilige Flusszelle injiziert.

Bei der Kopplung des Liganden gp120 auf die Sensoroberfläche kam es zu einer Bindung von 10600 RU (mHSA-Messung), von 10200 RU (mBSA-Messung) und von 9200 RU (mMSA-Messung). Weiterhin kam es zu einer Bindung des Liganden gp41 von 9600 RU (alle Messungen).

Für die Messungen wurden HSA, BSA und MSA mit HOCl im Protein:HOCl-Verhältnis 1:1000 nach der Methode 2.2.2.1 modifiziert und mit HBS-EP-Puffer auf eine Endkonzentrationen von 50, 25, 10, 5 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein eingestellt. Die Injektion der Analyten und somit die Kontaktzeit mit den Liganden erfolgte jeweils für 360 s. Die RU-Werte wurden 150 s nach Beginn der Dissoziationsphase gemessen. Nach jeder Messung wurde der Analyt durch dreimaliges Injizieren von 5 mM NaOH vom Liganden entfernt.

Die Ergebnisse der Messungen sind als Sensorgramme, die zum Vergleich übereinander gelagert wurden, in Abb. 3.8-3.10.A) und B) dargestellt. Eine Übersicht der gemessenen Werte ist in 3.8-3.10.C) als Balkendiagramm dargestellt.

Man erkennt in Abb. 3.8-3.10, dass mHSA, mBSA und mMSA 1:1000 konzentrationsabhängig mit gp120, nicht aber mit gp41 interagiert. Es wurden 150 s nach Beginn der Dissoziationsphase 136 RU (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mHSA) und 93 RU (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mHSA) detektiert (Abb. 3.8.A). Bei den verbleibenden Konzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mHSA wurden 40 RU, 11 RU und 5 RU gemessen. Die Bindungskonstante K_D wurde mit dem Biaevaluationsprogramm der Fa. Biacore kalkuliert und betrug $5,0 \times 10^{-8}$ M. Bei der Interaktionsmessung von mBSA 1:1000 mit

gp120III_B (Abb. 3.9.A) wurden 150 s nach Beginn der Dissoziationsphase 119 RU (50 µg/ml mBSA), 48 RU (25 µg/ml mBSA), 32 RU (10 µg/ml mBSA) und 6 RU (1 µg/ml mBSA) gemessen. Die Bindungskonstante K_D von mBSA 1:1000 betrug $7,6 \times 10^{-7}$ M und fiel somit etwas geringer aus als die von mHSA 1:1000.

Danach wurde überprüft, ob die gp120III_B-Interaktion mit mMSA unter gleichen Versuchsbedingungen reproduzierbar ist (Abb. 3.10.A). Auch diesmal wurden 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml modifiziertes Serumalbumin auf den Liganden gp120III_B injiziert und 150 s nach Beginn der Dissoziationsphase die RU-Werte gemessen. Wie erwartet fand auch mit diesem modifizierten Serumalbumin eine Bindung statt. Es wurden mit sinkender Konzentration 102 RU, 43 RU, 11 RU, 6 RU und 1 RU gemessen. Die Bindungskonstante K_D von mMSA 1:1000 betrug $3,7 \times 10^{-8}$ M.

Die SPR-Messungen von mHSA, mBSA und mMSA 1:1000 in einer Konzentration von 1-50 µg/ml Protein mit der gp41-Sensoroberfläche ergaben 150 s nach Beginn der Dissoziationsphase keine RU-Werte über der Messgrenze von 10 RU (Abb. 3.9-3.10.B).

Somit wurde gezeigt, dass mHSA 1:1000, mBSA 1:1000 und MSA 1:1000 mit dem Oberflächenprotein gp120, jedoch nicht mit dem Transmembranprotein gp41, konzentrationsabhängig interagiert. Diese Messungen sind ein deutlicher Beleg, dass durch eine gp120-mHSA (bzw. mBSA oder mMSA)-Interaktion der NL4-3wt im HIV-Infektionstest neutralisiert wurde. Die K_D der oxidierten Serumalbumine liegen mit $7,6 \times 10^{-7}$ M (mBSA), $3,7 \times 10^{-8}$ M (mMSA) und $5,0 \times 10^{-8}$ M (mHSA) sehr hoch und sind vergleichbar mit den Affinitätskonstanten polyanionischer Mikrobizide (siehe Diskussion).

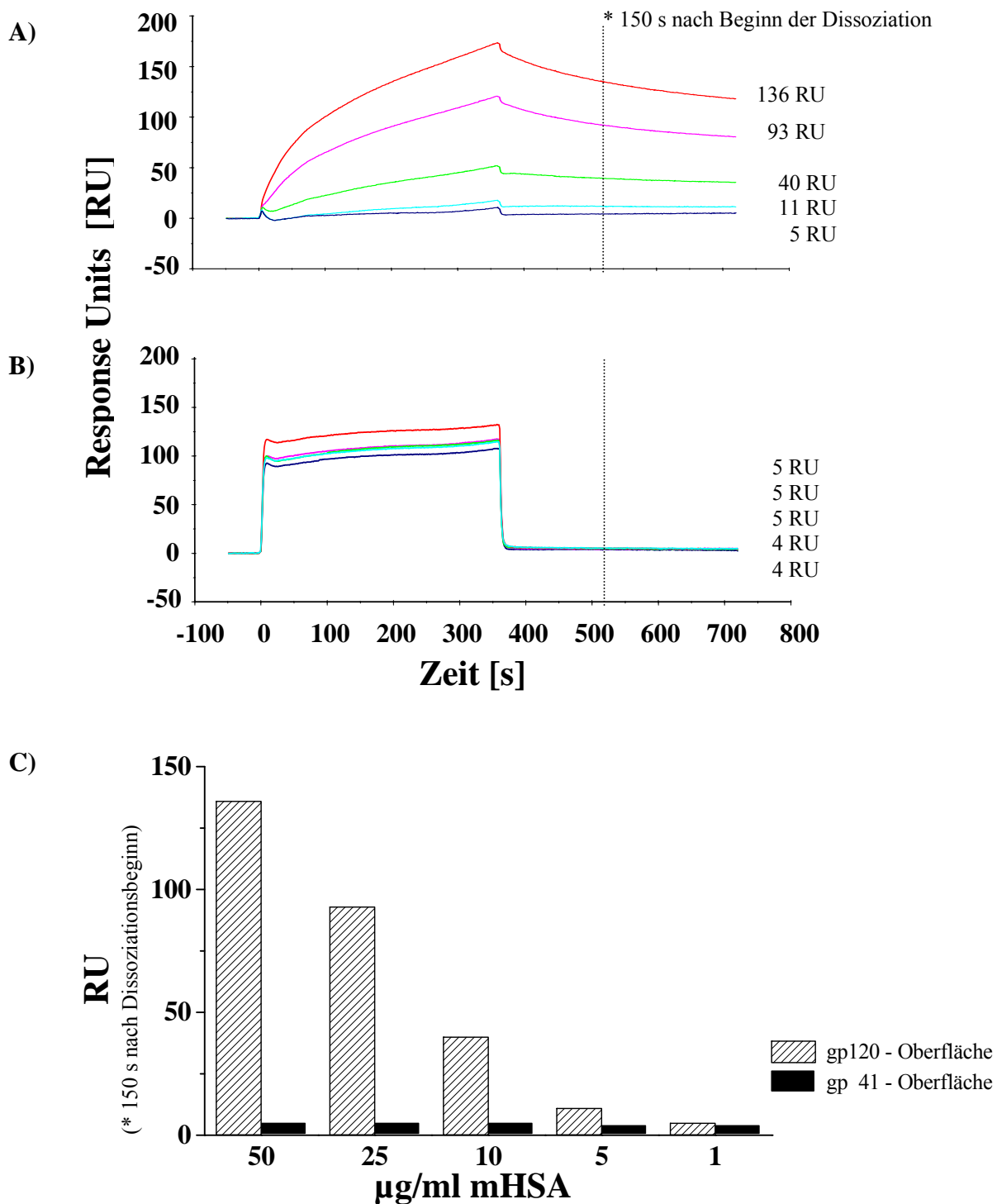


Abb. 3.8 SPR-Messungen von mHSA mit gp120 und gp41. Für den Test wurden auf zwei verschiedenen Flusszellen eines CM5-Biosensors 10600 RU gp120 (A) bzw. 9600 RU gp41 (B) immobilisiert. Anschließend wurde mHSA 1:1000 in unterschiedlichen Konzentrationen (von oben nach unten: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min über das gp120 bzw. gp41 geleitet. Es wurden 150 s (gestrichelte Linie) nach Beginn der Dissoziationsphase die RU-Werte gemessen. Die Ergebnisse sind in Graphik C) zusammenfassend dargestellt.

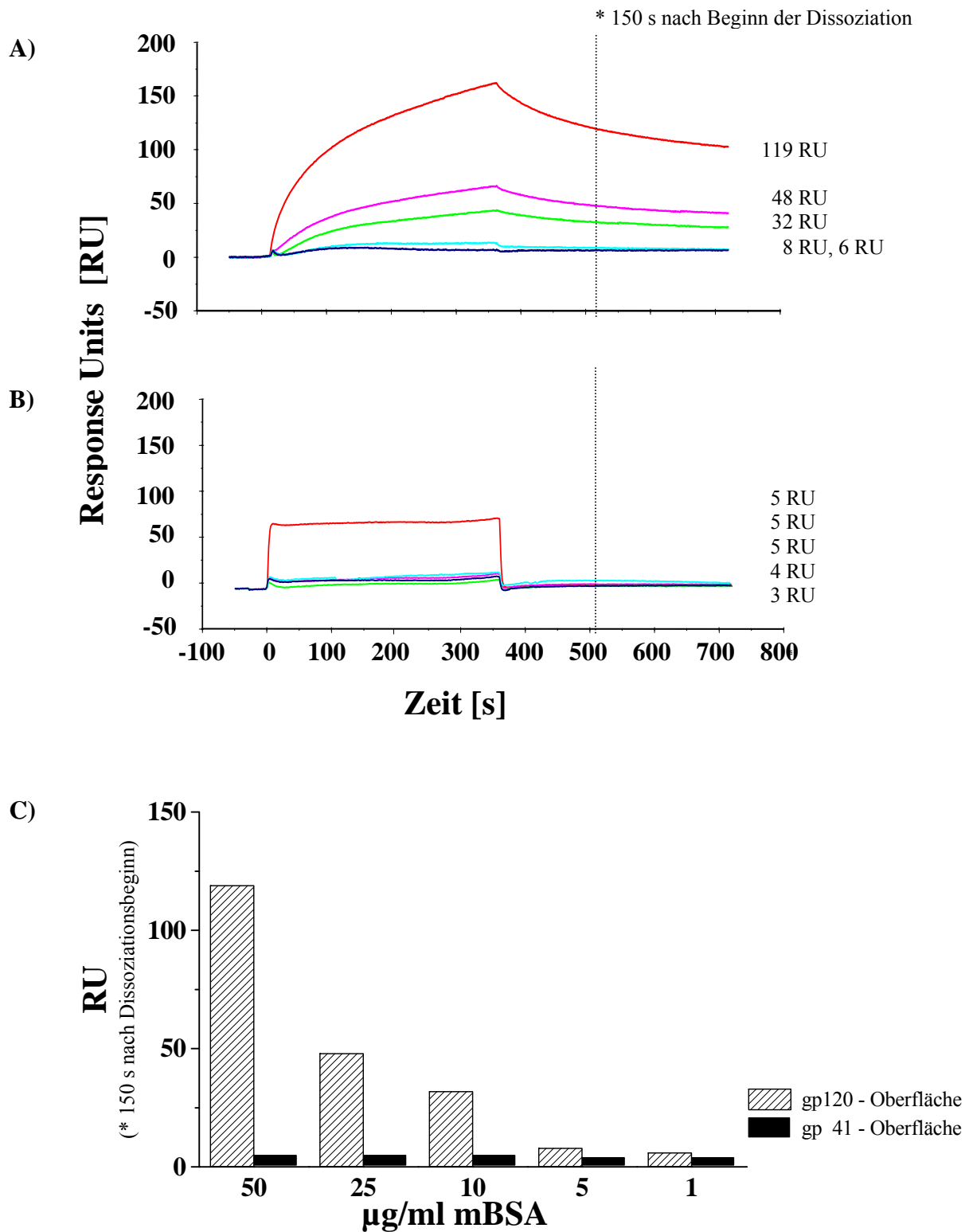


Abb. 3.9: SPR-Messungen von mBSA mit gp120 und gp41. Zuerst wurden für den Test auf zwei verschiedenen Flusszellen eines CM5-Biosensors 10200 RU gp120 (A) bzw. 9600 RU gp41 (B) immobilisiert. Anschließend wurden 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml mBSA 1:1000 mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min über das gp120 bzw. gp41 geleitet. Die RU-Werte, die 150 s (gestrichelte Linie) nach Beginn der Dissoziationsphase gemessen wurden, sind in C dargestellt.

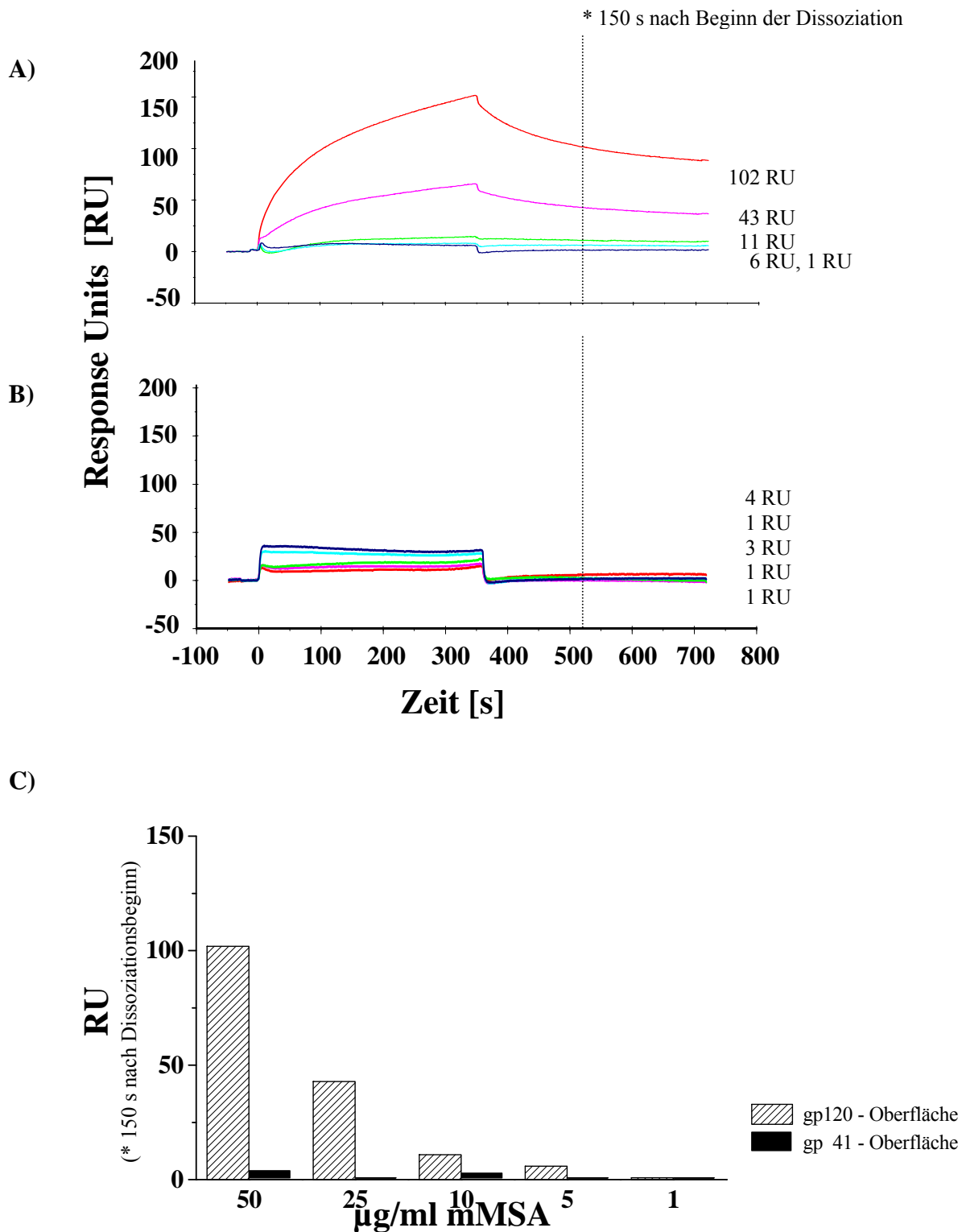


Abb. 3.10: SPR-Messungen von mMSA mit gp120 und gp41. Auf zwei verschiedenen Flusszellen eines CM5-Biosensors wurden 9200 RU gp120 (A) bzw. 9600 RU gp41 (B) immobilisiert. Danach wurden 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml mMSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min über das gp120 bzw. gp41 geleitet. Nach 150 s (gestrichelte Linie) wurden die RU-Werte gemessen. Die Ergebnisse sind in Graphik C) zusammenfassend dargestellt.

3.3 Untersuchungen mit biotinyliertem mHSA

Im Kapitel 3.2 wurde mittels SPR-Untersuchungen gezeigt, dass HOCl-modifiziertes HSA mit gp120 auf einem Biosensor interagiert. Für eine gp120-mHSA-Interaktionsmessung mit immobilisiertem mHSA muss, nach einer etablierten Methode (Vossmann, M. 2004), immobilisiertes HSA nachträglich auf der Sensoroberfläche mit HOCl zu mHSA modifiziert werden. Es wird angenommen, dass die 100 nm starke Biosensoroberfläche aus Karbohydropolymeren durch diese Reaktion chemisch verändert wird. Eine chemische Kopplung über die primären Amine des mHSA nach Aktivierung der Sensoroberfläche mit EDC/NHS ist nicht durchführbar. Um nun das mHSA als Liganden auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren, wurde es im Folgenden biotinyliert. Anschließend wurde das biotinylierte mHSA für die SPR-Messungen über die Biotingruppen auf einem Streptavidin (SA)-Biosensor immobilisiert (Kapitel 2.2.2.14). Um Vorweg die antivirale Wirksamkeit des biotinylierten mHSA zu überprüfen, wurde es in einem HIV-Infektionstest eingesetzt (Kapitel 2.2.4.2).

3.3.1 Neutralisation von NL4-3wt mit biotinyliertem mHSA

Das nach der Methode 2.2.2.1 hergestellte mHSA 1:1000 wurde mittels zweier verschiedener Methoden biotinyliert. Zum Einen wurde das mHSA mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Methode 2.2.2.9.1) über die primären Amine, z.B. von Lysinresten, markiert. Zum Anderen wurde das mHSA mit Biotin-LC-PEO-Amin (Methode 2.2.2.9.2) über die Carboxylgruppen von Aspartat und Glutamat biotinyliert. Nach durchgeführter Reaktion wurde der Biotinüberschuß in den Proben durch eine Dialyse entfernt (Methode 2.2.2.1.4). Anschließend wurde das Biotin:Protein-Verhältnis nach der Methode 2.2.2.10 quantifiziert. Es wurde festgestellt, dass das mHSA mit einem molaren Protein:Biotin-Verhältnis von 1:0,4 und 1:1,8 biotinyliert wurde. Das biotinylierte mHSA wurde zusammen mit biotinyliertem HSA (Kontrolle) auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Methode 2.2.2.5) und mittels eines Western-Blot-Verfahrens nach der Methode 2.2.2.8 sichtbar gemacht (Abb. 3.11).

Deutlich ist die erfolgreiche Biotinylierung von mHSA durch Sulfo-NHS-LC-Biotin und Biotin-LC-PEO-Amin zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob es durch die Biotinylierung zu einem Verlust der antiviralen Effektivität kam, wurde das biotinylierte mHSA 1:1000 in einem HIV-Infektionstest eingesetzt (Methode 2.2.4.2).

Die Messungen erfolgten bei Proteinendkonzentrationen von 0,5 bis 400 µg/ml. Als Positivkontrolle wurde nicht-biotinyliertes mHSA 1:1000 eingesetzt. Es wurden jeweils drei Messungen pro Test durchgeführt. Für die HIV-Infektion der Zellen wurden 300 *ffu/Well* des NL4-3wt pipettiert, wobei die $TCID_{50}$ nach der Methode 2.2.4.5 in einem vorangegangenen HIV-Infektionstest bestimmt worden war. Die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von mHSA in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml Protein wurde als 100% definiert (Abb. 3.12.A).

Um die Effektivität der Inhibitoren vergleichen zu können wurde die 50%ige relative inhibitorische Konzentration (rel. IC_{50} , *50% relative inhibitory concentration*) berechnet (Methode 2.2.4.6). Hierfür wurde zunächst ein sigmoidaler Kurvenverlauf mit den vorhandenen Daten durch das Kalkulationsprogramm GraphPad Prism erstellt. Außerdem wurde das Bestimmtheitsmaß (R^2) über den Korrelationskoeffizienten R berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12.B dargestellt.

Für nicht-biotinyliertes mHSA wurde ein rel. IC_{50} -Wert > 1 µg/ml berechnet. Für biotinyliertes mHSA in einem Biotinamin:Protein-Verhältnis von 0,4:1 und 1,8:1 wurde eine rel. $IC_{50} > 16$ µg/ml und $IC_{50} > 8$ µg/ml berechnet. Die verbleibenden biotinylierten Proteine in einem Sulfobiotin:Protein-Verhältnis von 0,4:1 und 1,8:1 zeigten einen rel. IC_{50} -Wert von > 7 µg/ml und 2 µg/ml. Ein Vergleich dieser Werte zeigt einen Abfall der Wirksamkeit in der Reihe:

$$mHSA_{\text{ohne Biotin}} \sim mHSA_{\text{Sulfobiotin 1:1,8}} \sim mHSA_{\text{Sulfobiotin 1:0,4}} > mHSA_{\text{Biotinamin 1:1,8}} \\ > mHSA_{\text{Biotinamin 1:0,4}}$$

Für $mHSA_{\text{ohne Biotin}}$ wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,98, für $mHSA_{\text{Biotinamin 1:0,4}}$ von 0,9 und für $mHSA_{\text{Biotinamin 1:1,8}}$ von 0,95 berechnet. Das Bestimmtheitsmaß für $mHSA_{\text{Sulfobiotin 1:0,4}}$ war 0,97 und für $mHSA_{\text{Sulfobiotin 1:1,8}}$ 0,92. Zusätzlich wurde die durch Geradenanpassung kalkulierte rel. IC_{50} mit der aus der Graphik direkt abgeleiteten Wirkstoffkonzentration verglichen, bei der 50% des HI-Virus inhibiert wurden (Abb. 3.12.A, gestrichelte Linie). Der Abfall der Wirksamkeit verläuft wie bei den kalkulierten IC_{50} -Werten in der beschriebenen Reihenfolge. Die Werte der 50%igen

Hemmkonzentration fallen verglichen mit denen der kalkulierte rel. IC_{50} um 1-3 $\mu\text{g/ml}$ Protein geringer aus.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt einen deutlichen Verlust der antiviralen Wirksamkeit, wenn mHSA mit Biotin-LC-PEO-Amin gekoppelt wurde. Dieses gilt für mHSA mit einem Biotin:Protein-Verhältnis von 1,8:1 und 0,4:1. Daneben zeigt eine Kopplung mit Sulfo-NHS-LC-Biotin im Biotin:Protein-Verhältnis von 1:0,4 einen geringen Verlust und in einem Protein:Biotin-Verhältnis von 1:1,8 sogar keinen Verlust der antiviralen Wirksamkeit. Diese Charge wurde für die folgenden SPR-Untersuchungen ausgewählt.

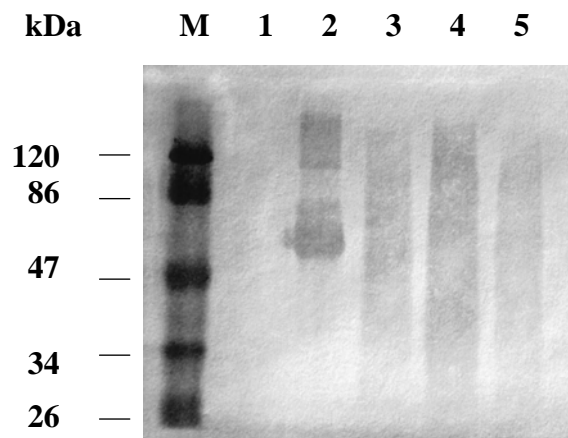


Abb. 3.11: Darstellung von biotinyliertem mHSA. Modifiziertes HSA 1:1000 wurde mit Sulfo-NHS-Biotin und Biotin-LC-PEO-Amin markiert. Es wurde das Biotin:Protein-Verhältnis der Inhibitoren nach der Methode 2.2.2.10 bestimmt. Danach wurde das biotinylierte mHSA in einem Protein:Biotin-Verhältnis von 1:0,4 bzw. 1:1,8 auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel (1:1 mit Probenpuffer) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde biotinyliertes HSA im Biotin:Protein-Verhältnis von 9:1 verwendet. Die Proteine wurden mittels eines Western-Blot-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Inkubation mit HP-konjugierten Streptavidin in PBS (1:2000) erfolgte eine Färbung der Proteine mit TMB. Der Belegungsplan des SDS-Polyacrylamidgels ist im Folgenden gezeigt.

M = Molekulargewichtsmarker

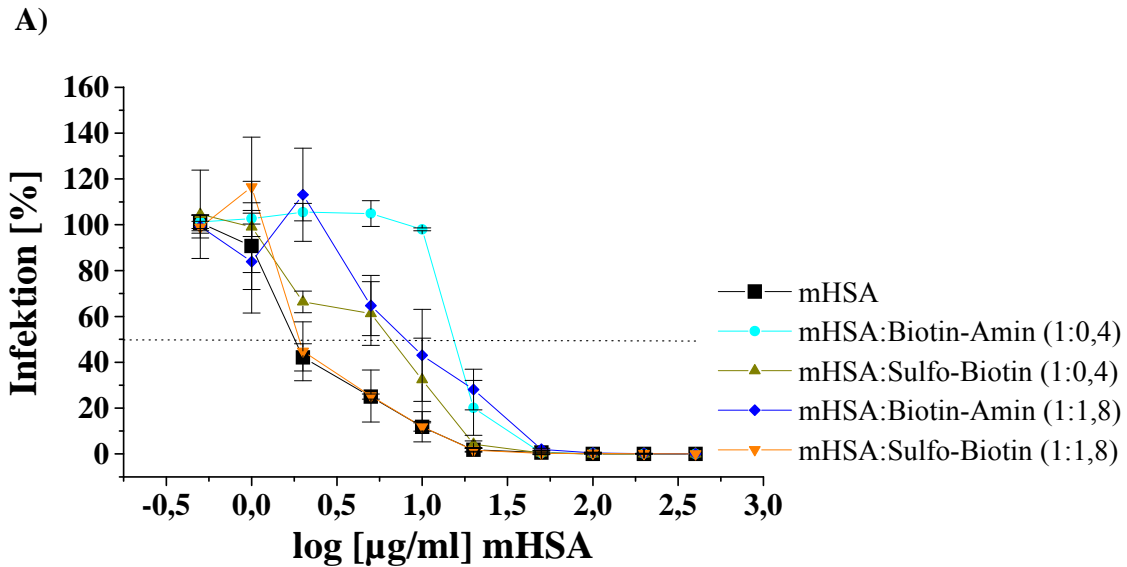
Bahn 1 = mHSA 1:1000; 10 µg/Tasche

Bahn 2 = HSA_{sulfobiotin}; Protein:Biotin-Verhältnis = 1:9; 1 µg/Tasche

Bahn 3 = mHSA_{Sulfobiotin} 1:1000; Protein:Biotin-Verhältnis = 1:0,4; 10 µg/Tasche

Bahn 4 = mHSA_{Sulfobiotin} 1:1000; Protein:Biotin-Verhältnis = 1:1,8; 10 µg/Tasche

Bahn 5 = mHSA_{Aminbiotin} 1:1000; Protein:Biotin-Verhältnis = 1:0,4; 10 µg/Tasche



B)

	mHSA	Biotinamin:mHSA		Sulfobiotin:mHSA	
	nicht biotinyliert	0,4:1	1,8:1	0,4:1	1,8:1
50%ige Inhibition (µg/ml)	2	16	8	7	2
rel. IC ₅₀ (µg/ml)	1	17	9	4	1
R ²	0,98	0,90	0,95	0,97	0,92

Abb. 3.12: Neutralisation des HIV-1 NL4-3wt mit biotinyliertem mHSA. A: Es wurde das biotinylierte mHSA in einem Biotin:Protein-Verhältnis von 0,4:1 und 1,8:1, sowie als Positivkontrolle das nicht-biotinylierte mHSA, in einem HIV-Infektionstest eingesetzt. In diesem wurden 300 ffu HIV-1 NL4-3wt pro Well einer 96-Well-Platte (MOI = 0,03) in Anwesenheit von mHSA (biotinyliert und nicht biotinyliert) zugegeben. Es folgte nach einer 48-stündigen Inkubation die Fixierung der TZM-bl-Zellkultur mit 3,5%iger Formaldehydlösung und die Färbung mit X-Gal. Die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von mHSA in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml Protein wurde als 100% definiert. Es sind die Mittelwerte von drei Messungen und die dazugehörige Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken angegeben. SD mHSA ≤ 19%; SD mHSA_{Biotinamin 0,4} ≤ 12%; SD mHSA_{Biotinamin 1,8} ≤ 20%; SD mHSA_{Sulfobiotin 0,4} ≤ 22% und SD mHSA_{Sulfobiotin 1,8} ≤ 22%

B) Die 50%ige Hemmkonzentration wurde aus Graphik A) abgeleitet (gestrichelte Linie). Der rel. IC₅₀-Wert (gestrichelte Linie) wurde durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf kalkuliert ($Y = A_2 + [A_1 - A_2] / (1 + 10^{[X - \text{LogIC}_{50}]})$; A₁ = höchster Y-Wert; A₂ = niedrigster Y-Wert). R² = Bestimmtheitsmaß.

3.3.2 SPR-Messungen von biotinyliertem mHSA mit gp120IIIB

Für SPR-Messungen von biotinyliertem mHSA mit gp120 wurde das mHSA mit einem Protein:Biotin-Verhältnis von 1:1,8 aus dem vorangegangenen Kapitel verwendet. Das biotinylierte mHSA wurde auf einem SA-Biosensor, welcher mit Streptavidin immobilisiert war, gebunden. Hierfür wurde auf die Sensoroberfläche 30 µl biotinyliertes mHSA (50 µg/ml) für 6 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min injiziert. Die Affinitätskonstante K_D für eine Streptavidin-Biotin-Interaktion liegt bei 10^{-15} M. Es kam zu einer Anlagerung der Moleküle und zu einer Zunahme von 2000 RU. Zur Kontrolle wurde nach dem gleichen Protokoll (vgl. Methode 2.2.2.14) biotinyliertes HSA auf die zweite Flusszelle injiziert. Es kam zu einer Anlagerung des biotinylierten HSA und zu einer Zunahme von 3000 RU. Die Messungen erfolgten auf beiden Flusszellen mit gp120IIIB als Analyten in den Konzentrationen 120 µg/ml, 90 µg/ml, 60 µg/ml, 30 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, und 1 µg/ml Protein. Von den Proben wurden jeweils 30 µl für 6 min in einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min über den Biosensor geleitet. Die RU-Werte wurden 150 s nach Beginn der Dissoziationsphase gemessen. (Abb. 3.13.A und B, gestrichelte Linie). Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm in Abb. 3.13.C dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine konzentrationsabhängige Bindung zwischen gp120IIIB und biotinyliertem mHSA, nicht aber mit dem biotinylierten HSA, stattfand. Es wurden 150 s nach Beginn der Dissoziation von 120 µg/ml gp120 97 RU gemessen. Angrenzend 90 µg/ml gp120 wurden 76 RU detektiert. Daneben wurden mit den Proben in einer Konzentration von 60 µg/ml, 30 µg/ml und 15 µg/ml gp120 57 RU, 41 RU und 28 RU gemessen. Zuletzt wurden nach Injektion von 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml gp120 15 RU, 9 RU und 2 RU detektiert. Die Affinitätskonstante K_D wurde mit dem Biaevaluationsprogramm der Fa. Biacore kalkuliert und betrug $2,7 \times 10^{-10}$ M. Die K_D lag somit zwei log-Stufen höher, als die aus der mHSA-gp120-Interaktionsmessung mit immobilisiertem gp120 und nicht-biotinyliertem mHSA (Kapitel 3.2). Anders die Ergebnisse der Referenzflusszelle: Es wurde bei einer Konzentration von 120 µg/ml gp120 ein schwaches Signal (12 RU) gemessen. Bei den verbleibenden Konzentrationen wurde kein Signal oberhalb der Messgrenze von 10 RU beobachtet.

Es wurde durch die Biotinylierung von modifizierten HSA eine neue Methode zur Durchführung von SPR-Bindungsstudien zwischen mHSA und gp120 etabliert. Durch diese Methode wurde auf eine nachträgliche HSA-Oxidation auf dem Sensorchip

verzichtet. Die Bindungskonstante liegt mit $2,7 \times 10^{-10}$ M höher als jene in Kapitel 3.2 beschriebene (Ligand gp120; Analyt mHSA) mit $KD = 5 \times 10^{-8}$ M.

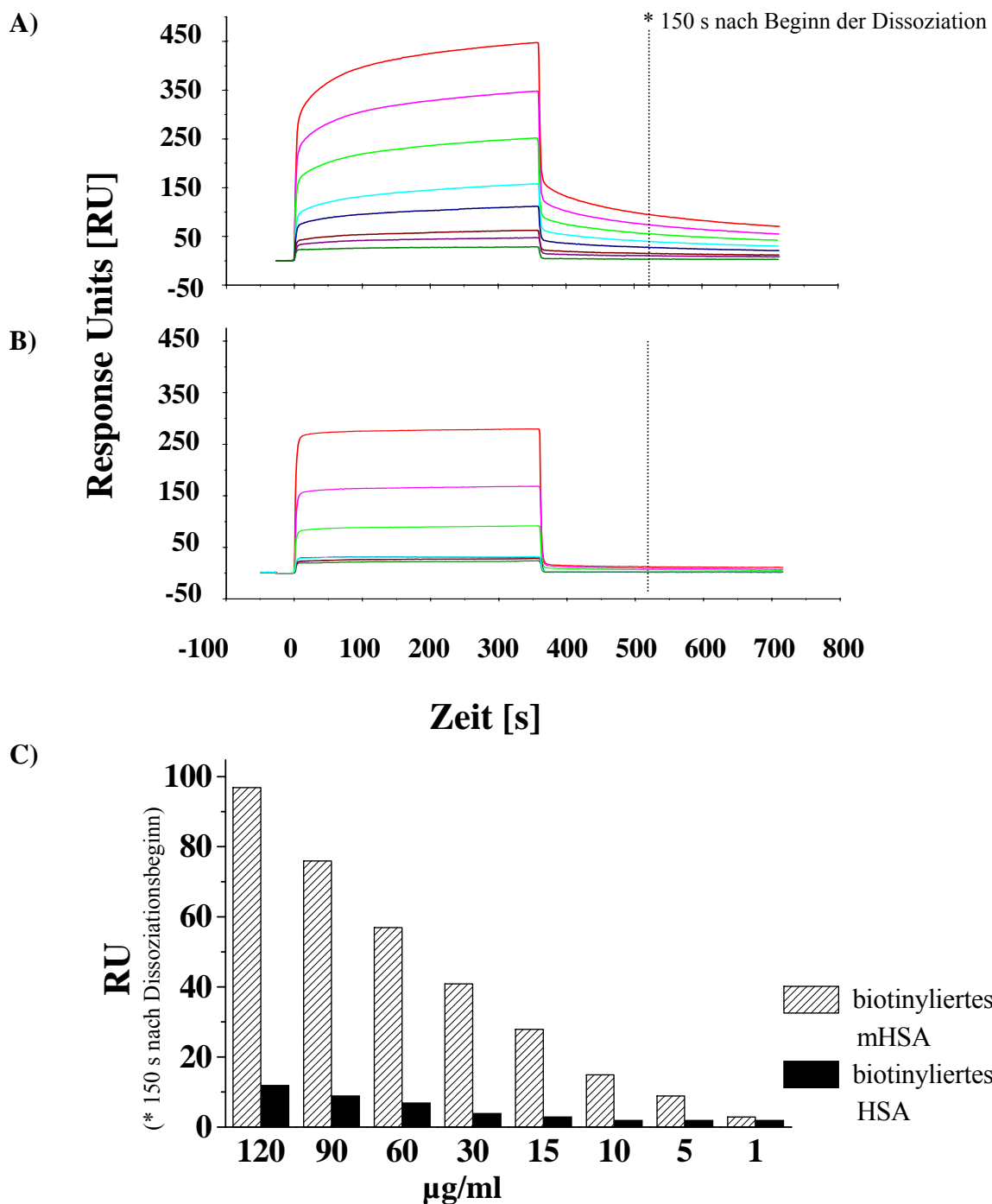


Abb. 3.13: SPR-Messungen von gp120 mit biotinylertem HSA und mHSA. Es wurden SPR-Messungen auf einem SA-(Streptavidin)-Biosensor durchgeführt. Hierfür wurden jeweils auf einer Flusszelle **A)** 2000 RU biotinylertes HOCl-modifiziertes HSA (HSA:HOCl-Verhältnis=1:1000) und **B)** 3000 RU biotinylertes HSA gebunden. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen (von oben nach unten: 120, 90, 60, 30, 15, 10, 5 und 1 µg/ml) gp120IIIb mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min über die immobilisierten Proteine geleitet. Es wurden 150 s nach Ende der Dissoziationsphase (gestrichelte Linie) die RU-Werte gemessen. Die Ergebnisse sind in **C)** zusammenfassend dargestellt.

3.4 Analyse von HOCl-modifizierten Proteinen

Für die Analyse von HOCl-modifizierten Proteinen wurde zuerst eine SDS-PAGE mit mHSA, mBSA und mMSA durchgeführt. Im Anschluss wurde untersucht, ob Trypsin und die Proteinase K Aminosäurenreste im mHSA 1:1000 erkennt, sodass ein Verdau stattfindet. Eine anschließende Fraktionierung von mHSA 1:1000 mittels FPLC sollte Aufschluss über die Möglichkeit einer Größenfraktionierung von modifiziertem HSA geben. Es wurde zusätzlich die antivirale Aktivität der Fraktionen gemessen. In einer weiteren Analyse wurde der Anteil freier Thiolgruppen in modifiziertem und nicht-modifiziertem HSA bestimmt, um Informationen über eine HOCl-Oxidation von Thiolgruppen zu bekommen.

3.4.1 Darstellung von HOCl-modifiziertem HSA, BSA und MSA mittels SDS-PAGE

Um die Auswirkungen eines steigenden molaren HOCl-Überschusses auf Serumalbumine zu untersuchen, wurden HOCl-modifizierte Proteine zuerst auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Methode 2.2.2.5 und 2.2.2.6).

Es wurden die modifizierten Serumalbumine HSA, BSA und MSA aus Kapitel 3.1.4 verwendet, welche in einem molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 modifiziert worden waren. Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm nach der Methode 2.2.2.2 bestimmt. Anschließend wurde pro Tasche eines SDS-Polyacrylamidgels 1 µg/ml modifiziertes Serumalbumin in einem molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 0:1, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50 und 1:100 aufgetragen. Da die Farbintensität der Proteinbanden nach einer Silberfärbung bei den Proteinbanden ab einem molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 nachlässt (siehe mHSA 1:100; Abb. 14.A) wurde die Menge der folgenden Proben (Protein:HOCl-Verhältnis = 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000) auf 10 µg Protein/Tasche erhöht.

Eine Verbreiterung der Serumalbuminbande bei allen drei Proteinen, nach erfolgter Modifikation mit einer steigenden HOCl-Menge ist deutlich auf den silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgelen zu erkennen. Dabei beginnt die Verbreiterung der Serumalbuminbande (67 kDa) ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:20.

Bei einem Verhältnis von 1:100 sind Reste der HSA-Bande zu erkennen. Diese geht mit einem steigenden HOCl-Überschuss in einen diffusen Bereich über, in dem die eigentliche Bande nicht mehr zu erkennen ist. Des Weiteren ist auf dem Gel A) bei einem HSA:HOCl-Verhältnis von 1:5 bis 1:50 eine neue Bande im 30 kDa-Bereich zu sehen, die mit weiterer HOCl-Zunahme verschwindet. Diese ist beim mBSA (Gel B) nicht zu beobachten. Das Gel C) mit modifiziertem MSA zeigt diese Bande sehr deutlich als Verunreinigung, die schon in der nichtoxidierten Probe auffällt. Deshalb ist davon auszugehen, dass die 30 kDa-Bande auf dem Gel A auch eine Verunreinigung ist und nicht durch eine Aggregatbildung niedermolekularer Fragmente zustande kommt. Der diffuse Bereich, bei allen drei Albuminen identisch, breitet sich über den gesamten detektierbaren Bereich aus.

Weiterhin war es interessant zu beobachten, dass HSA bzw. BSA und MSA, die in einem unterschiedlichen Reaktionsvolumen, aber in einem identischen Molverhältnis (Kapitel 3.1.4) mit HOCl modifiziert wurden, auf dem Silbergel den gleichen Fragmentierungsgrad zeigen.

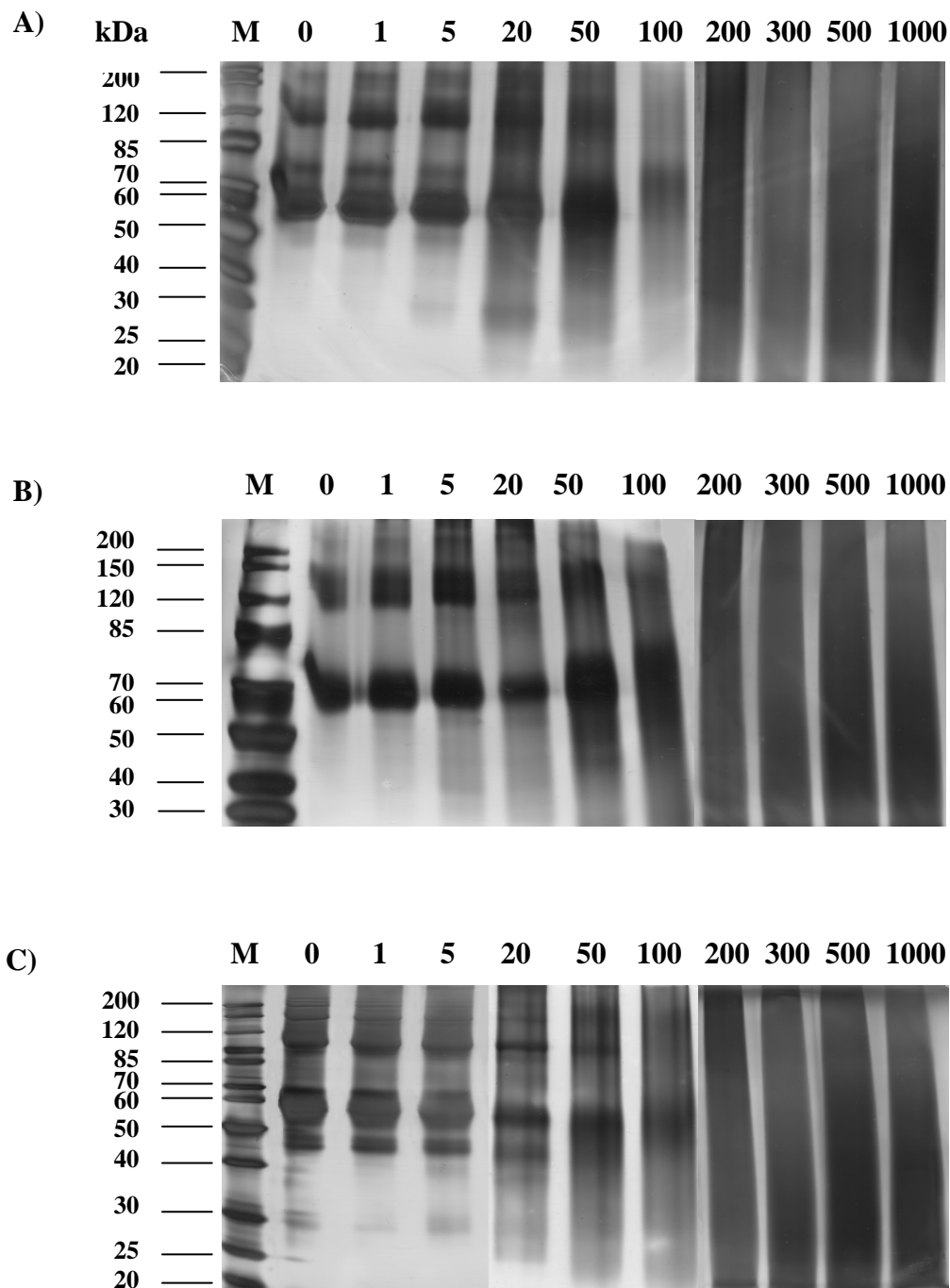


Abb. 3.14: A) HSA, B) BSA und C) MSA wurden mit HOCl im molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 modifiziert und elektrophoretisch auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

M = Molekulargewichtsmarker; 0-1000 = mol HOCl, mit dem 1 mol Serumalbumin modifiziert wurde.

3.4.2 Hydrolyse von HOCl-modifiziertem HSA mittels Proteinase K

Die im Kapitel 3.4.1 dargestellten HOCl-modifizierten HSA-Chargen zeigen im Silbergel mit steigendem molaren HOCl-Überschuss eine fortschreitende Verbreiterung der HSA-Bande. Es stellte sich die Frage, ob bei der Behandlung von HSA mit HOCl die Aminosäurereste bzw. Peptidbindungen soweit modifiziert wurden, dass ein Verdau mit Proteasen nicht möglich ist. Hawkins, C. L. und Davies, M. J. (1998) beschrieben eine Reaktion von HOCl mit Lysinseitenketten, aus der semistabile Chloramine resultieren. Diese reagieren weiter zu Stickstoffradikalen via Homolyse der N-Cl-Brücke.

Die Serinproteasen Trypsin und Proteinase K, welche an der Carboxylseite von spezifischen Aminosäuren angreifen, wurden im Folgenden für eine Hydrolyse der Peptidbindungen von mHSA 1:1000 eingesetzt. Dabei erkennt das Enzym Trypsin unabhängig von der Länge des Proteins bzw. Peptids die Lysin- und Argininreste und hydrolysiert an deren Carboxylseite die Peptidbindungen. Wohingegen die Proteinase K, die Peptidbindungen auf der Carboxylseite von aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren schneidet. Die kleinsten Peptide, welche die Proteinase K hydrolysiert, sind Tetrapeptide.

Für einen tryptischen Verdau wurde mHSA 1:1000 aus Kapitel 3.4.1 und zur Kontrolle HSA mit an einer Agarosematrix gekoppeltem Trypsin der Fa. Pierce versetzt. Nach der Reaktion wurden das Enzym durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurden die Proben im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen (Methode 2.2.2.5 und 2.2.2.6).

Deutlich ist in Abb. 3.15 zu sehen, dass das HSA (Kontrolle) durch einen tryptischen Verdau in 6 unterschiedlich große Peptide hydrolysiert wurde (Bahn 2). Das mit Trypsin verdaute mHSA 1:1000 in Bahn 3 zeigt im Vergleich zur unverdauten mHSA-Kontrolle in Bahn 1 keine Veränderung im Laufverhalten. Ein sichtbarer Verdau des mHSA 1:1000 mit Trypsin fand somit nicht statt.

Für die Durchführung des Proteinase K-Verdaues wurden zu einer mHSA-Endkonzentration von 2,5 mg/ml Protein 0, 2, 10, 20 und 60 µg/ml Proteinase K gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass alle Proben mit PBS pH 7,4 auf ein identisches Endvolumen von 1 ml eingestellt wurden. Von jeder Probe wurden nach dem Verdau jeweils 15 µl (~40 µg/Tasche mHSA) elektrophoretisch auf einem SDS-

Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Methode 2.2.2.5 und 2.2.2.6). Das Gel ist in Abb. 3.16 dargestellt.

Deutlich ist in Bahn 2 (Abb. 3.16) mHSA 1:1000 als diffuser Bereich zu erkennen (Kontrolle 1; 20-200 kDa). In Bahn 3 wiederum ist die Proteinase K dargestellt (Kontrolle 2; 29 kDa). In Bahn 4, 5, 6 und 7 sind die mHSA-Proben zu sehen, welche mit 2, 10, 20 und 60 µg/ml Proteinase K verdaut wurden. Dabei zeigt die Probe mit 2 µg/ml Proteinase K noch eine diffuse Bande zwischen 20 und 70 kDa, während die Fragmentgrößen der diffusen Banden in den Proben mit 10 und 20 µg/ml Proteinase K immer mehr abnehmen. In der Probe mit 60 µg/ml Proteinase K wurden keine Peptide größer als 40 kDa mehr detektiert.

Mit zunehmender Enzymmenge kam es also zu einer starken Hydrolyse der Peptidbindungen auf der Carboxylseite von aliphatischen, aromatischen und/oder hydrophoben Aminosäuren des mHSA 1:1000. Dabei korrelierte die Stärke der Hydrolyse mit der steigenden Enzymkonzentration.

Die Ergebnisse der Auswertung zeigen, dass eine Hydrolyse der Peptidbindungen an der Carboxylseite von Arginin- und Lysinresten des mHSA 1:1000 nicht möglich war. Jedoch fand ein tryptischer Verdau der Peptidbindungen an der Carboxylseite einer Reihe möglicher Aminosäuren (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr und Trp) im mHSA 1:1000 statt.

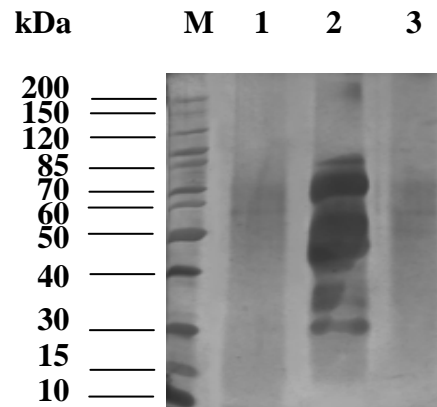


Abb. 3.15: Verdau von HOCl-modifiziertem HSA mittels Trypsin

Elektrophoretische Auftrennung von verdauten HSA-Proben (modifiziert und nicht modifiziert) auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. Der Verdau erfolgte mit auf Agarosekugeln immobilisiertem Trypsin, welches vor dem Gelauftrag abzentrifugiert wurde. Die Proteinbanden wurden anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

M = Molekulargewichtsmarker

Bahn 1 = mHSA, 15 µg/Tasche

Bahn 2 = Trypsin-verdautes HSA, 15 µg/Tasche

Bahn 3 = Trypsin-verdautes HSA 1:1000, 15 µg/Tasche

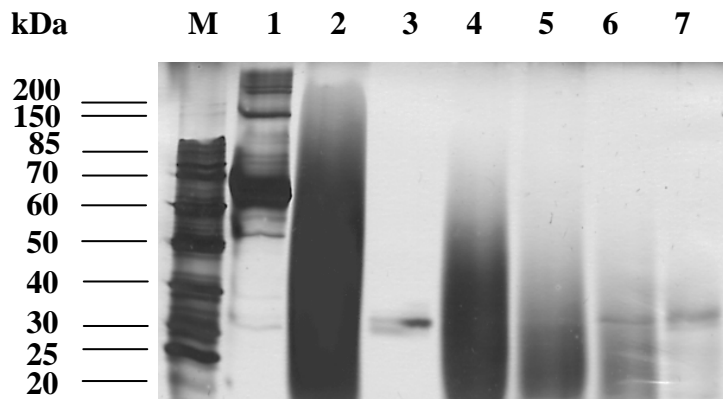


Abb. 3.16: Verdau von HOCl-modifiziertem HSA mittels Proteinase K

Elektrophoretische Auftrennung von Proteinase K-verdauten modifizierten HSA 1:1000 (Protein:HOCl). Es wurde ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel verwendet, auf dem die Proteinbanden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht wurden.

M = Molekulargewichtsmarker

Bahn 1 = HSA, 1 µg/Tasche

Bahn 2 = modifiziertes HSA 1:1000, 40 µg/Tasche

Bahn 3 = Proteinase K, 1 µg/Tasche

Bahn 4 = modifiziertes HSA 1:1000 mit 2 µg/ml Proteinase K verdaut, 40 µg/Tasche

Bahn 5 = " " " " 10 µg/ml " " "

Bahn 6 = " " " " 20 µg/ml " " "

Bahn 7 = " " " " 60 µg/ml " " "

3.4.3 Inhibition von HIV-1 NL4-3wt durch fraktioniertes mHSA

Im Kapitel 3.4.1 wurde gezeigt, dass sich HOCl-modifiziertes HSA 1:1000 im Silbergel über den detektierbaren Bereich von 20 bis 200 kDa auftrennt. Es stellte sich die Frage, ob eine Größenfraktionierung dieses diffusen Bereiches mittels Gelfiltration möglich ist und, ob diese Fraktionen wie unfraktioniertes mHSA hemmend auf eine Synzytienbildung wirken.

Für die Beantwortung dieser Fragen wurde mHSA 1:1000 mittels einer HiLoad Superdex 200-Säule, welche aus einer Agarose-Dextran-Matrix bestand, chromatographisch in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Hierfür wurden 2 ml mHSA, mit einer Proteinkonzentration von 7 mg/ml Protein, mittels einer FPLC-Anlage (Fa. Pharmacia) auf die Säule gegeben. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min und als Laufpuffer wurde TG pH 7,4 verwendet. Die Fraktionen (3,2 ml) wurden mittels eines Fraktionssammlers (Fa. Pharmacia, Modell Frac. 100) gesammelt. Die fraktionierten Proben wurden anschließend bei einer O.D. von 280 nm (Methode 2.2.2.2.2) photometrisch gemessen, um den Elutionsbereich von mHSA zu erhalten. Außerdem wurde die Proteinkonzentration jeder Fraktion mittels BCA-Reagenz (Methode 2.2.2.2.1) gemessen. Das Elutionsprofil der Fraktionen ist in Abb. 3.17.A) dargestellt.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Methode 2.2.2.5 und 2.2.2.6). Das Ergebnis ist in Abb. 3.17.B) dargestellt.

Die Kontrolle (Bahn 1 = Probenauftrag) zeigt, wie erwartet, auf dem Silbergel einen diffusen mHSA-Bereich zwischen 200 kDa und 20 kDa. Daneben ist in Fraktion 20 noch ein breiter mHSA-Bereich zwischen 85 kDa und 20 kDa zu sehen. Die Fraktion 21 weist einen diffusen mHSA-Bereich zwischen 70 und 20 kDa, Fraktion 22 zwischen 60 und 20 kDa auf. In den folgenden Fraktionen sind noch diffuse mHSA-Bereiche zwischen 50 und 20 kDa (Fraktion 23), 45 und 20 kDa (Fraktion 24), sowie zwischen 45 und 20 kDa (Fraktion 25) zu erkennen. Die letzten beiden Fraktionen 26 und 27 weisen nur noch einen diffusen Bereich zwischen 30 bzw. 25 bis 20 kDa auf. Deutlich ist in allen Fraktionen neben der diffusen HSA-Bande eine diskrete HSA Bande (67 kDa) festzustellen. Diese tritt exklusiv in den fraktionierten Proben auf. Man erkennt diese diskrete HSA-Bande besonders in der Fraktion 25, wo sie angereichert wurde. Außerdem sind in der Fraktion 25 Banden im 40 kDa, 120 kDa- und 200 kDa-Bereich

zu sehen. Diese fielen bereits im Silbergel des Kapitels 3.4.1, Abb.3.14.A) als Verunreinigung in der HSA-Probe auf.

Vergleicht man die Fraktionen 20 bis 27 (Bahn 2 bis 9) mit der Kontrolle (Bahn 1 = Probenauftrag) so wird deutlich, dass von der diffusen HSA-Bande niedermolekulare Bereiche abgetrennt wurden. Eine Größenfraktionierung im hochmolekularen Bereich war nicht möglich.

Die fraktionierten Proben wurden in einem Synzytientest auf ihre Virus-hemmende Effektivität getestet. Hierfür wurden am Vortag pro *Well* einer 96-*Well*-Platte 15.000 HeLaP4-Zellen ausgesät und anschließend mit den Fraktionen in einer Endkonzentration von 0, 10 und 50 µg/ml Protein versetzt. Die CD4⁺-Zelllinie wurde anschließend mit dem Vektor pSVrevATG160_{NL4-3wt} nach der Methode 2.2.3.5 transfiziert, wobei 0,05 µg DNA pro *Well* eingesetzt wurden. Nach Inkubation der Zellkultur wurden die Zellen mittels Hemacolor gefärbt (Methode 2.2.4.4).

Nach der Expression von gp120 auf der Zelloberfläche kam es zu einer Interaktion mit CD4 und dadurch zu einer Synzytienbildung (Positivkontrolle, Abb. 3.18. A1-A3). Die Negativkontrolle (mHSA, nicht-fraktioniert) zeigte keine Synzytienbildung (Abb.3.18.B2-B3). Wie erwartet wurde durch eine mHSA-gp120-Interaktion der Kontakt zu CD4 unterbunden. Bei den Fraktionen 20-27 (Abb.3.18.C-J) ist deutlich zu sehen, dass alle Fraktionen eine inhibitorische Wirksamkeit besaßen. Allerdings wurde eine Abnahme der Hemmkonzentration von 10 µg/ml auf 50 µg/ml beobachtet. Die Fraktion 25 mit diskreter HSA-Bande und diffusem mHSA zeigte einen inhibitorischen Effekt, welcher mit den übrigen Fraktionen identisch war (siehe Diskussion).

Es lässt sich feststellen, dass eine Größenfraktionierung von mHSA im niedermolekularen Bereich möglich war, und dass die gesammelten Fraktionen auf die Synzytienbildung hemmend wirkten.

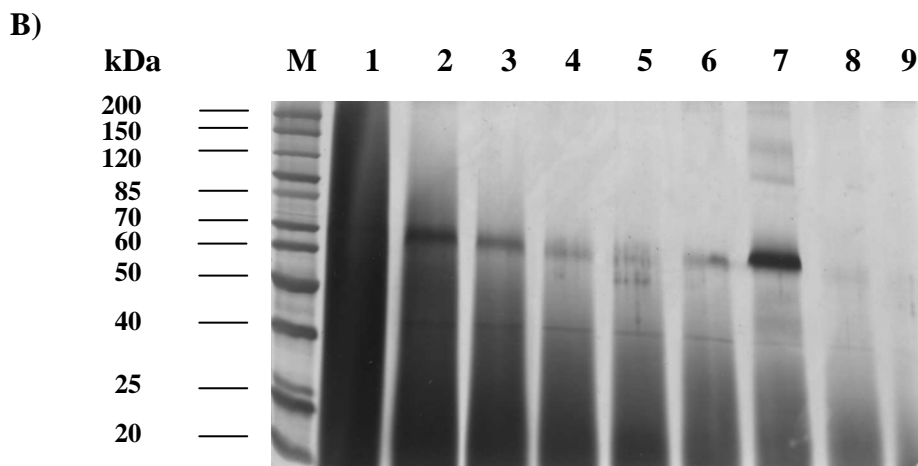
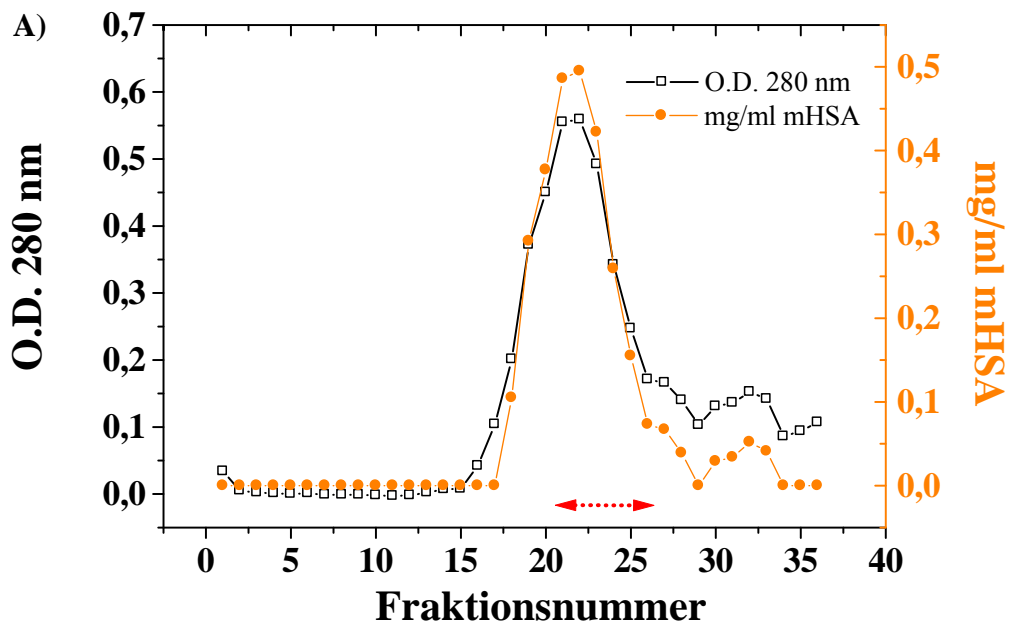


Abb. 3.17: Fraktionierung von mHSA. HSA wurde im Protein:HOCI-Verhältnis 1:1000 modifiziert und mittels einer Superdex 200-Säule chromatographisch aufgetrennt. Der Laufpuffer (TG pH 7,4) wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min auf die Säule gegeben. Es wurden 3,2 ml Fraktionen gesammelt und diese bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch gemessen. Das dazugehörige Elutionsprofil ist in Graphik A) gezeigt. Außerdem wurde der Proteingehalt mittels BCA-Reagenz bestimmt (Angabe in mg/ml).

B) Es wurden jeweils 10 µg der proteinhaltigen Fraktionen elektrophoretisch auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Das Gel wurde wie folgt beladen:

M = Molekulargewichtsmarker

Bahn 1 = modifiziertes HSA 1:1000 (Probenauftrag)

Bahn 2 = Fraktion 20

Bahn 3 = Fraktion 21

Bahn 4 = Fraktion 22

Bahn 5 = Fraktion 23

Bahn 6 = Fraktion 24

Bahn 7 = Fraktion 25

Bahn 8 = Fraktion 26

Bahn 9 = Fraktion 27

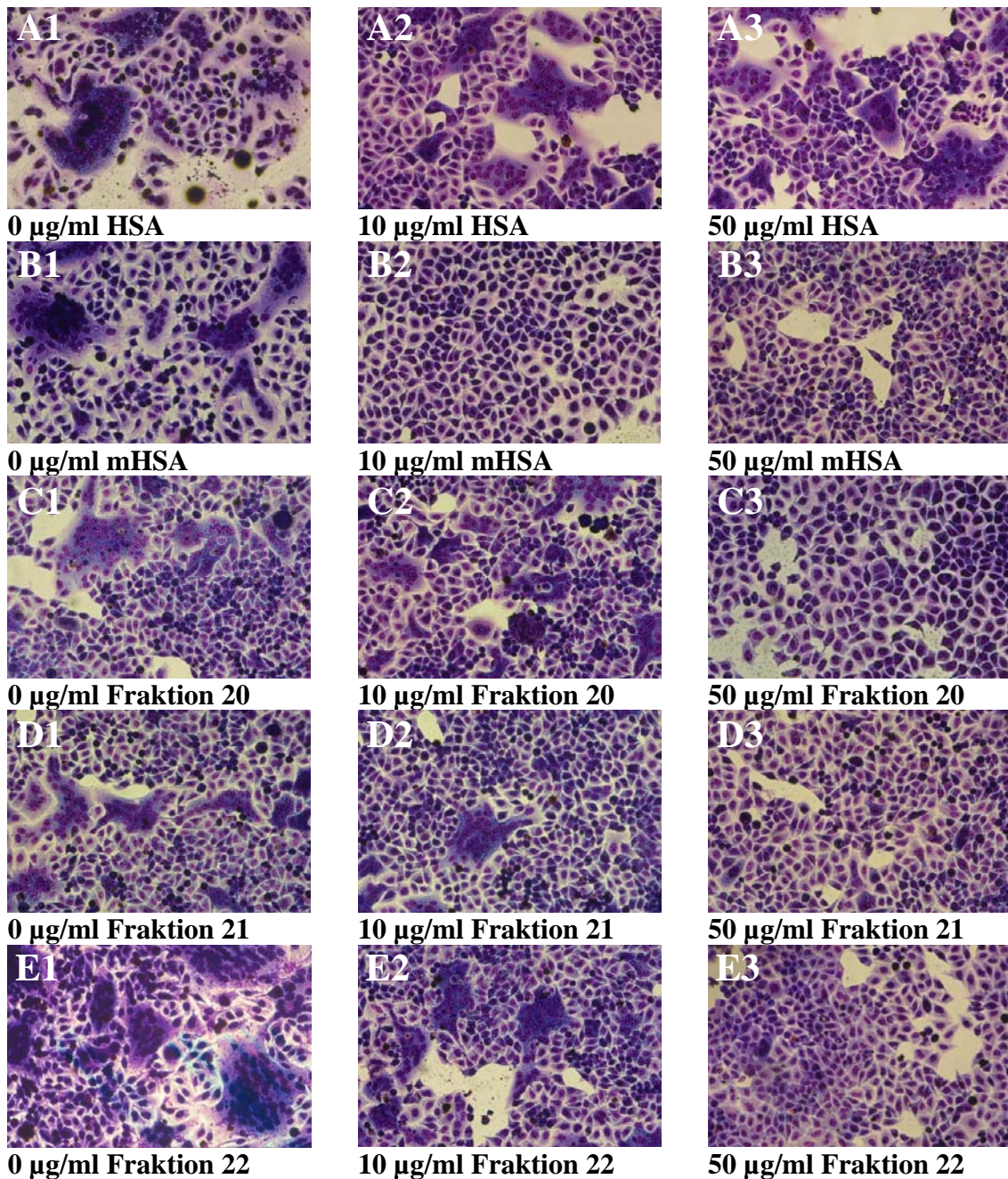
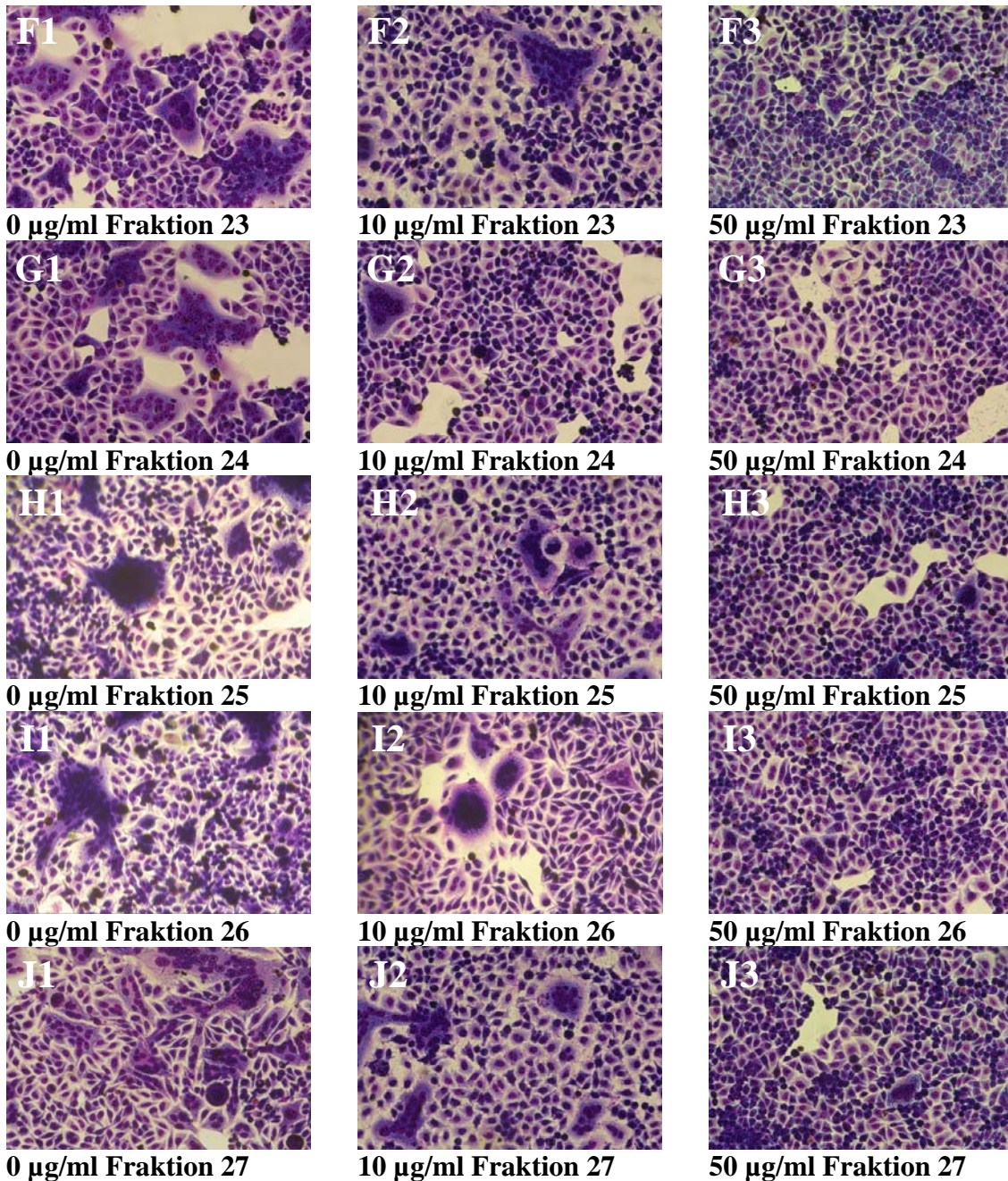


Abb. 3.18: Inhibition der pSVrevATG160_{NL4-3wt}-induzierten Synzytienbildung durch fraktioniertes mHSA. HSA wurde im Protein:HOCl-Verhältnis 1:1000 modifiziert und durch eine Superdex 200-Säule chromatographisch aufgetrennt. Der Laufpuffer (TG pH 7,4) wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 ml/min auf die Säule gegeben. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 20 bis 27 wurden in einem Synzytientest auf ihre antivirale Effektivität untersucht. Hierfür wurden 15.000 HeLaP4-Zellen/Well mit pSVrevATG160_{NL4-3wt} in Anwesenheit einer



Endkonzentration von 0, 10 und 50 µg Protein pro *Well* (siehe Bildbeschriftung) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Zellkerne sowie das Zellplasma durch Hemacolor angefärbt.

Bild A = HSA (Positivkontrolle)
 Bild B = mHSA 1:1000 (Negativkontrolle)
 Bild C = Fraktion 20
 Bild D = Fraktion 21
 Bild E = Fraktion 22

Bild F = Fraktion 23
 Bild G = Fraktion 24
 Bild H = Fraktion 25
 Bild I = Fraktion 26
 Bild J = Fraktion 27

3.4.4 Veränderung des Gehalts von freien Thiolgruppen nach einer HOCl-Modifikation von HSA

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch die Reaktion mit hypochloriger Säure der Anteil freier Thiolgruppen verändert wird, da bekannt ist, dass Cysteinreste verglichen mit anderen Aminosäuren schneller mit dieser Säure reagieren (Winterbourn, C. C., 1985). Für einen quantitativen Nachweis freier Thiolgruppen wurde HOCl-modifiziertes HSA in einem kolorimetrischen Test nach der Methode 2.2.2.11 untersucht. Als Reagenz wurde DTNB (Dithiobisnitrobenzoat, Ellmans-Reagenz) verwendet.

Für den Test wurde zuerst HSA mit HOCl im Protein:HOCl-Verhältnis 1:0.05, 1:1, 1:2, 1:3, 1:3.5 und 1:4 nach der Methode 2.2.2.1 modifiziert. Nach einer anschließenden Ultrafiltration (Methode 2.2.2.1.2) und dreimaligem Umpuffern mit Sörensenpuffer pH 8,0 wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Reagenz nach der Methode 2.2.2.21 bestimmt. Für den kolorimetrischen Test wurden jeweils 5 mg/ml, 7.5 mg/ml, 10 mg/ml, 12.5 mg/ml, 15 mg/ml, 17.5 mg/ml und 20 mg/ml vom mHSA 1:0, 1:0.05, 1:1, 1:3, 1:3.5 und 1:4 eingesetzt. Nach DTNB-Zugabe wurde der Gehalt an SH-Gruppen photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen (Abb.3.19 A).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass mit steigendem HOCl-Überschuss der Anteil freier SH-Gruppen abnahm. Für einen Vergleich von mHSA 1:0.05, 1:1, 1:2, 1:3, 1:3.5 und 1:4 wurde die Konzentration freier Thiolgruppen in einem nächsten Schritt mittels des Extinktionskoeffizienten (13600/M/cm) berechnet (Methode 2.2.2.11, Abb.3.19.B). Für die HSA-Lösung (Fraktion V) ergab sich ein Thiolgruppengehalt von 4,5 $\mu\text{mol/g}$ Protein. Wenn HSA mit einem 0,05-fachen molaren Überschuss modifiziert wird, sinkt der Thiolgruppenanteil auf 3,8 $\mu\text{mol/g}$ Protein. Bei einem HOCl:Protein-Verhältnis von 1:1 sinkt der Thiolgruppenanteil auf 3 $\mu\text{mol/g}$ Protein, bei einem HOCl:Protein-Verhältnis von 1:2 auf 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Protein. Die verbleibenden Proben mHSA 1:3, 1:3.5 und 1:4 zeigten einen Thiolgruppenanteil von 1, 0,5 und 0,3 $\mu\text{mol/g}$ Protein.

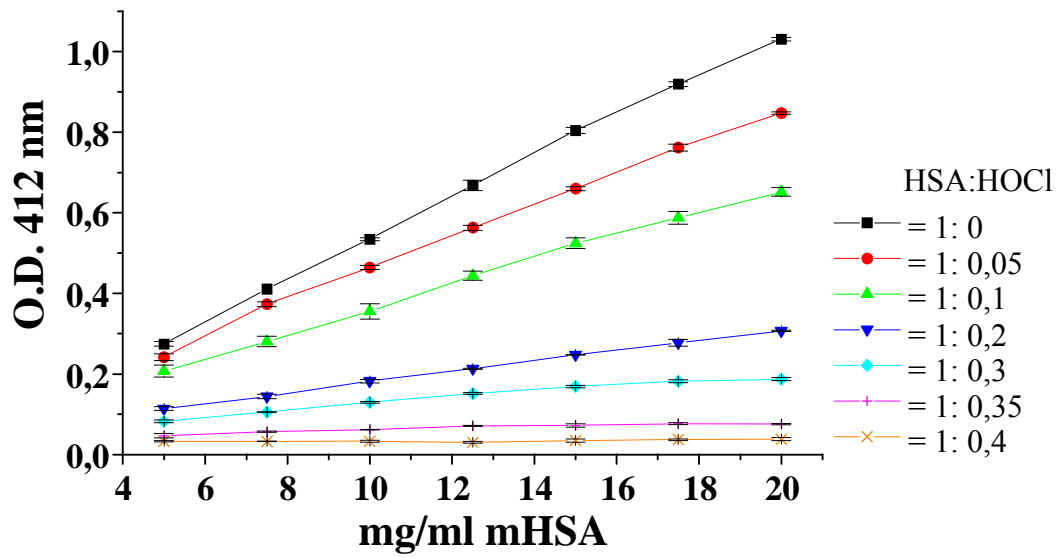
Ein prozentualer Vergleich der Thiolgruppenanteile von HSA mit bzw. ohne HOCl-Modifikation ist in Abbildung 3.19.C) zu sehen. Der Thiolgruppenanteil des nicht-modifizierten HSA wurde als 100% definiert und die verbleibenden Proben auf diesen Wert normiert.

Das mHSA 1:0,05 besaß verglichen mit HSA noch 85% seiner ursprünglichen Thiolgruppen. Das mHSA 1:1, 1:2 und 1:3 besaß nur noch 67%, 33% und 23% dieser SH-Gruppen. Bei den verbleibenden Proben mHSA 1:3.5 und mHSA 1:4 wurden 11% und 6% der ursprünglichen SH-Gruppen gemessen.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass mit dem steigenden molaren HOCl-Überschuss eine signifikante Abnahme der freien Thiolgruppen korreliert. Es wird deutlich, dass schon ein geringes Protein:HOCl-Verhältnis (>1:4) zu einem Verlust der freien Thiolgruppen führt. Im mHSA, welches mit einem Protein:HOCl-Verhältnis > 1:100 modifiziert wurde und dessen antiviraler Effekt im Kapitel 3.1.4 belegt wurde, sind somit keine freien Thiolgruppen vorhanden.

Abb. 3.19: Quantifizierung von Thiolgruppen durch DTNB. **A)** Es wurde mHSA in einem HSA:HOCl-Verhältnis von 1:0.05, 1:1, 1:2, 1:3, 1:3.5 und 1:4 und nichtmodifizierte HSA mit DTNB versetzt, inkubiert und bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch gemessen. Dabei wurden jeweils drei Proben pro Konzentration gemessen. Es sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) als Fehlerbalken angegeben. $SD \leq 0,008$ E. **B)** Danach wurde mittels der Extinktionen aus A) und der folgenden Gleichung der Anteil freier Thiolgruppen in $\mu\text{mol/l}$ berechnet: $C_0 = (A/\epsilon d) * V$, wobei A = Extinktion; $\epsilon = 13600/\text{M/cm}$; $d = 1$ cm; $V = 1000 \mu\text{l}/880\mu\text{l}$ (siehe auch Methodenteil). Die Konzentration C_0 ($\mu\text{mol/l}$) der jeweils getesteten Proben (5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 und 20 mg/ml Protein) wurde anschließend auf 1 g/l Protein bezogen. Es sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. **C:** Zusätzlich wurde der Thiolgruppenanteil prozentual dargestellt. Hierfür wurde HSA als 100% definiert und die verbleibenden Proben auf diesen Wert normiert. $SD \leq 5\%$

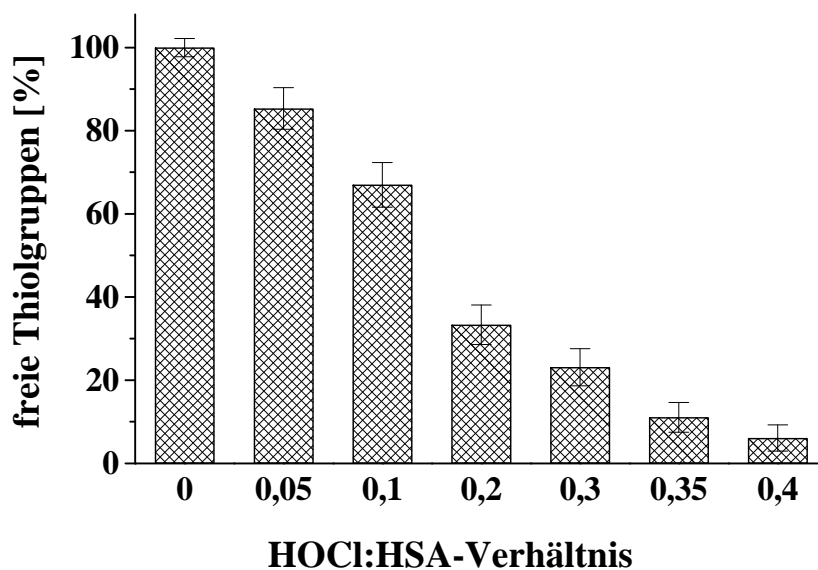
A)



B)

HSA:HOCl-Verhältnis	1:0	0,05	1:1	1:2	1:3	1:3,5	1:4
Thiolgehalt (µmol/g)	4,5	3,8	3	1,5	1,0	0,5	0,3
SD (µmol/g)	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1

C)



3.4.5 Quantifizierung von Aminosäureresten nach einer HOCl-Oxidation

Im Kapitel 3.4.4 wurde gezeigt, dass durch eine geringe Menge hypochloriger Säure die freien Thiolgruppen von HSA modifiziert wurden. Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch andere Aminosäurereste durch HOCl modifiziert werden. Zuerst wurde mittels kolorimetrischer Tests der Anteil von Carbonylgruppen und Aminogruppen, die wesentlichen Einfluss auf die Gesamtladung des Proteins haben, bestimmt. Anschließend wurde über eine Aminosäureanalyse der Anteil HOCl-modifizierter Aminosäurereste untersucht.

3.4.5.1 Veränderung des Carbonylgruppengehalts von Proteinen durch HOCl-Oxidation

Die Entstehung von Carbonylgruppen ist ein früher Marker bei Proteinoxidationen (Reznick, A. Z., Packer, L., 1994). Sie wurden bei einer Reihe von Proteinen (Hawkins, C. L und Davies, M. J., 1998) nach einer HOCl-Behandlung entdeckt. Levine, R. L. *et al.* (1994), etablierten ein Protokoll, mit dem Carbonylgruppen photometrisch gemessen werden konnten. Dabei wird DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) mithilfe von Carbonylgruppen zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon umgewandelt.

Für den Versuch wurden HSA, BSA und β -Galaktosidase nach der Methode 2.2.2.1 mit hypochloriger Säure im Protein:HOCl-Verhältnis von 1:5, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000 modifiziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Taurin (5 g/l) gestoppt. Die modifizierten HSA- und BSA-Chargen wurden durch Ultrafiltration (Methode 2.2.2.1.3) eingeengt und mit PBS pH 7,4 umgepuffert. Anders verhält es sich bei der modifizierten β -Galaktosidase. Diese wurde durch Ultrafiltration (Amicon-Zentrifugenröhrchen, Ausschlussgröße 10 kDa) eingeengt (Methode 2.2.2.1.2) und zweimal mit PBS pH 7,4 umgepuffert. Für den Carbonylgruppennachweis wurden 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,4 mg/ml Protein nach der Methode 2.2.2.1.3 mit DNPH versetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.20.A-C) dargestellt.

Aus den dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass mit steigendem HOCl-Überschuss der Anteil der Carbonylgruppen zunimmt.

Um den Carbonylgruppengehalt der oxidierten Proteine miteinander zu vergleichen, wurde mittels des Extinktionskoeffizienten ϵ die molare Konzentration der Carbonylgruppen nach der Methode 2.2.2.13 berechnet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 3.20.D) dargestellt.

Deutlich ist zu sehen, dass die Konzentrationen der Carbonylgruppen von mHSA, mBSA und m β -Gal 1:1000 im gleichen Bereich lagen. So wurde ein Carbonylgruppengehalt von 96 $\mu\text{mol/g}$ mHSA, von 109 $\mu\text{mol/g}$ mBSA und von 98 $\mu\text{mol/g}$ m β -Gal gemessen. In einem Verhältnis von 1:100 unterschieden sich die Carbonylgruppen-Konzentrationen um bis zu 43 $\mu\text{mol/g}$ Protein (63 $\mu\text{mol/g}$ mHSA, 89 $\mu\text{mol/g}$ mBSA und 46 $\mu\text{mol/g}$ m β -Gal). Der Carbonylgruppengehalt nahm in der modifizierten β -Galaktosidase 1:5 bis 1:100 langsamer zu, verglichen mit dem mHSA und mBSA 1:5 bis 1:100.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass mit einem steigenden HOCl-Überschuss eine signifikante Zunahme der Carbonylgruppen-Konzentrationen bei mHSA, mBSA und m β -Gal zu beobachten war.

Da die antivirale Aktivität von modifizierten Proteinen mit einer steigenden HOCl-Konzentration zunimmt (Kapitel 3.1.4), ist somit belegt, dass der antivirale Effekt mit einer Zunahme der Carbonylgruppen-Konzentration korreliert.

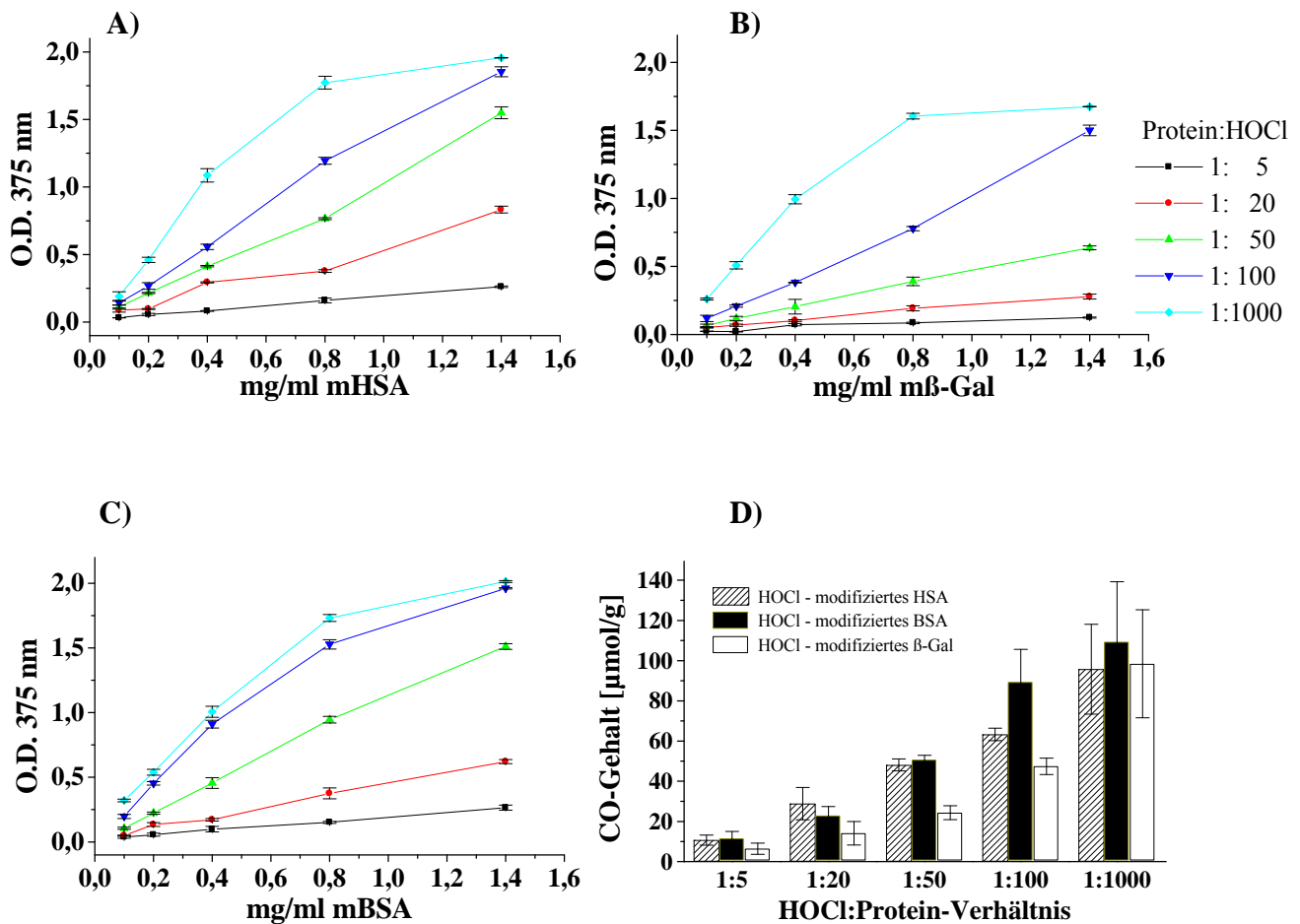


Abb. 3.20: Quantifizierung des Carbonylgruppengehalts von HOCl-modifizierten Proteinen. Es wurde HOCl-modifiziertes **A)** HSA, **B)** β -Galaktosidase und **C)** BSA im Protein:HOCl-Verhältnis von 1:5, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000 hergestellt und in einem Carbonylgruppentest eingesetzt. DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin) reagiert zusammen mit einer Carbonylgruppe zu einem im Photometer detektierbaren 2,4-Dinitrophenylhydrazon, welches bei einer Wellenlänge von 375 nm gemessen wurde. Dabei wurden jeweils drei Proben pro Konzentration gemessen. Es sind die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken angegeben. $SD_{\text{mHSA}} \leq 0,047$ E; $SD_{\text{mBSA}} \leq 0,043$ E und $SD_{\text{SDm}\beta\text{-Ga}} \leq 0,054$ E. **(D)** Mit dem Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde der Carbonylgruppengehalt in μmol berechnet und anschließend auf die Probenkonzentration von einem Gramm pro Liter bezogen. Es wurden jeweils 5 Werte gemittelt. $SD_{\text{mHSA}} \leq 22 \mu\text{mol/g}$ Protein; $SD_{\text{mBSA}} \leq 16 \mu\text{mol/g}$ und $SD_{\text{SDm}\beta\text{-Ga}} \leq 27 \mu\text{mol/g}$ Protein.

3.4.5.2 Veränderung des Aminogruppengehalts von Proteinen durch HOCl-Oxidation

Es stellte sich weiterhin die Frage, in welchem Maße die im vorherigen Kapitel belegte Zunahme der Carbonylgruppen von mHSA, mBSA und m β -Gal mit einer Veränderung der Aminogruppen und somit mit einer Veränderung der Gesamtladung des Proteins einhergeht. Die Reaktion von primären Aminen, wie die von Lysinseitenketten oder terminalen α -Aminogruppen, mit HOCl, führt zur Bildung von Mono- und Dichloraminen (RNCl₂-Formationen) (Hawkins, C. L und Davies, M. J., 1998). Durch eine Hydrolyse der ϵ -Chloramine von modifizierten Lysinresten kommt es zur Bildung von Aldehyden und zur Abspaltung von NH₃ (Hazell, L. J. et al., 1994).

Für die Quantifizierung der Aminogruppen von Proteinen wurde ein kolorimetrischer Test nach der Methode 2.2.2.12 durchgeführt. Die hierfür verwendeten Proteine wurden nach der Methode 2.2.2.1 und 2.2.2.1.1 und 2.2.2.1.2 hergestellt. Nach einer Bestimmung der Proteinkonzentration (Methode 2.2.2.2.1) wurden 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml und 1 mg/ml HSA, BSA und β -Galaktosidase in HOCl-modifizierter Form mit TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) inkubiert und bei einer Wellenlänge von 335 nm photometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde der Versuch mit den Proteinen in nativer Form durchgeführt.

In Abb. 3.21.A-C) sind die Ergebnisse dieser Messung für mHSA, mBSA und m β -Galaktosidase dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Anteil an NH₂-Gruppen nach einer HOCl-Behandlung im HOCl:Protein-Verhältnis von 1:1000 bei allen drei Proteinen signifikant abnahm. Dabei wurde mit den modifizierten Proteinen jeweils die Hälfte der ursprünglichen Extinktionen des nativen Proteins gemessen. Somit korreliert die antivirale Aktivität von mHSA, mBSA und m β -Gal 1:1000 mit einer Abnahme der Aminogruppen bzw. mit einer Abnahme der positiven Gesamtladung.

Mithilfe des Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 14000/\text{M}/\text{cm}$ wurde in einem nächsten Schritt der Aminogruppengehalt nach der Methode 2.2.2.12 berechnet (Abb. 3.21.D)

Es ergab sich für HSA eine Aminogruppen-Konzentration vor der HOCl-Behandlung von 194 $\mu\text{mol}/\text{g}$ Protein und nach der HOCl-Behandlung von 63 $\mu\text{mol}/\text{g}$ Protein. Die Werte des bovinen Serumalbumins lagen leicht unter denen des humanen

Serumalbumins: Die Aminogruppen-Konzentration für BSA lag vor der HOCl-Behandlung bei 133 $\mu\text{mol/g}$ Protein und nach der HOCl-Behandlung bei 50 $\mu\text{mol/g}$ Protein. Die Berechnung der Aminogruppen-Konzentration von β -Galaktosidase vor der HOCl-Behandlung ergab 180 $\mu\text{mol/g}$ Protein und nach der HOCl-Behandlung 68 $\mu\text{mol/g}$ Protein. Somit lag die Aminogruppen-Konzentration von m β -Gal 1:1000 in dem Bereich von mHSA 1:1000.

Die Ergebnisse ergeben im Vergleich mit den nativen Proteinen eine Abnahme des Aminogruppengehalts von 67% (mHSA), 62% (mBSA) und 62% (m β -Gal).

Es sollte überprüft werden, welche Amin-haltigen Aminosäurereste durch HOCl modifiziert wurden. Hierfür wurde der prozentuale Lysin-, bzw. Argininanteil in HSA, BSA und MSA vor und nach einer HOCl-Behandlung mittels Aminosäurenanalyse (Methode 2.2.2.3) bestimmt. Zur Kontrolle wurde Valin, das gegenüber HOCl chemisch inert ist, analysiert. Es wurde HSA, BSA und MSA aus Kapitel 3.1.4 verwendet, welches im molaren Serumalbumin:HOCl-Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 modifiziert wurde. Die Durchführung der Aminosäurenanalyse erfolgte in Kooperation mit dem FZ Borstel, Abt. Strukturbiochemie.

In Abb. 3.22.A) sind die Ergebnisse dieser Messung für HSA, in Abb. 3.22.B) für BSA und in Abb. 3.22.C) für MSA zusammengefasst.

Ein Vergleich der Aminosäuren mit der Kontrolle (Valin) zeigt, dass sich der Lysinanteil nicht signifikant bei allen drei Proteinen veränderte. Dahingegen war mit einem steigenden HOCl-Überschuss eine signifikante Veränderung des Argininanteils zu beobachten. Dieser lag, verglichen mit dem des nativen HSA (=100%), bei 80% (1:100) und 51% (1:300). Der Argininanteil 98% des modifizierten HSA 1:500 fiel aufgrund eines Messfehlers heraus.

Der Argininanteil des modifizierten BSA lag bei 65% (1:100) und 44% (1:300). Ein besonders starker Abfall des Arginingehalts wurde bei den mMSA-Proben beobachtet: Bei einem MSA:HOCl-Verhältnis von 1:100 wurden 57% der ursprünglichen Arginine detektiert und bei einem Verhältnis von 1:300 21%.

Ein Vergleich des Lysinanteils mit dem Valinanteil von mHSA, mBSA und mMSA 1:1000 zeigt, dass der Anteil beider Aminosäuren bei allen drei Proteinen im gleichen Bereich liegt. So wurde ein Valingehalt von 87% (mHSA), 83% (mBSA) und 88% (mMSA), sowie ein Lysingehalt von 75% (mHSA), 71% (mBSA) und 80%

(mMSA) gemessen. Ein Vergleich mit den Argininen zeigt dahingegen einen Anteil von 48% (mHSA), 55% (mBSA) und 25% (mMSA). Ein relativer Vergleich mit dem Valingehalt von mHSA, mBSA und β -GAL 1:1000 zeigt, dass der Argininanteil um 58% (mHSA), 54% (mBSA) und 78% (mMSA) abfiel.

Somit wurde gezeigt, dass die Abnahme der Aminogruppen, die im kolorimetrischen Test gemessen wurde, mit einer Veränderung des Argininanteils einhergeht. Dabei wurde der Arginingehalt im mHSA 1:1000 und mBSA 1:1000 im gleichen Maße verändert. Die größte Veränderung des Arginingehalts wurde dahingegen in dem modifizierten MSA 1:1000 gemessen.

Die Veränderung des Lysinanteils korreliert nicht signifikant mit einer Abnahme des NH_2 -Anteils.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass nach einer HOCl-Modifikation von HSA, BSA und β -Gal, in einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000, eine signifikante Abnahme der freien Aminogruppen-Konzentrationen mit dieser Methode zu beobachten war. Diese Abnahme der Aminogruppen-Konzentrationen korrelierte mit einer Veränderung des Argininanteils, nicht aber mit einer Veränderung des Lysinanteils.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die antivirale Effektivität von mHSA, mBSA und mMSA mit einer Abnahme der positiven Ladung und somit mit einer Zunahme der negativen Gesamtladung des Proteins einhergehen könnte.

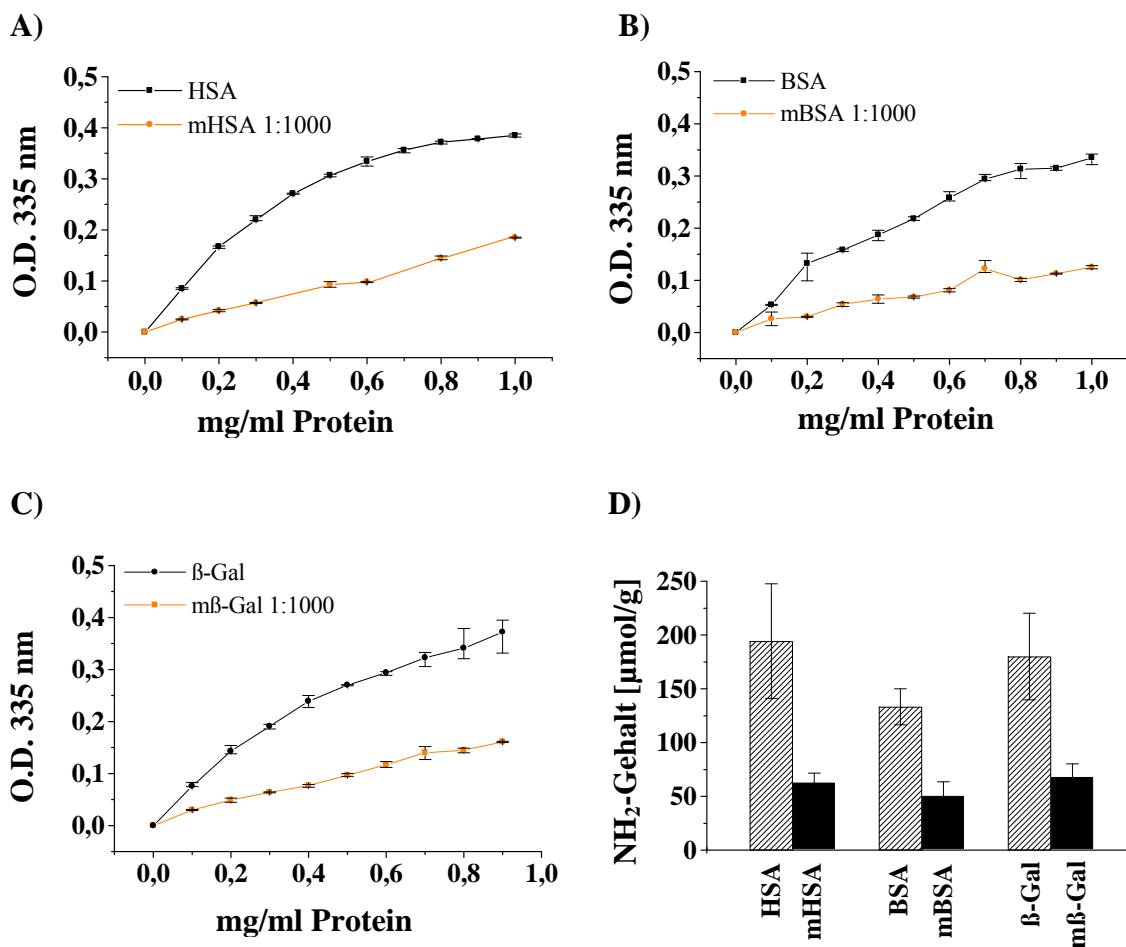


Abb. 3.21: Quantifizierung des Aminogruppengehalts nach einer HOCl-Modifikation. Es wurde A) HSA, B) BSA und C) β -Galaktosidase mit HOCl im Protein:HOCl-Verhältnis 1:1000 modifiziert. Anschließend wurde via 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS), welches zusammen mit NH_2 -Gruppen Sulfitkomplexe bildet, der Aminogruppengehalt im Photometer bei einer Wellenlänge von 335 nm bestimmt. Dabei wurden jeweils drei Proben pro Konzentration gemessen. Es sind die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken angegeben. $\text{SD}_{\text{mHSA}} \leq 0,006 \text{ E}$; $\text{SD}_{\text{mBSA}} \leq 0,034 \text{ E}$ und $\text{SD}_{\text{SDm}\beta\text{-Ga}} \leq 0,031 \text{ E}$.

D: Danach wurde mittels des Extinktionskoeffizienten ϵ ($= 14.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Molarität der Aminogruppen bestimmt und anschließend auf die Probenkonzentration von einem Gramm bezogen. Es wurden jeweils 10 Werte gemittelt. $\text{SD}_{\text{mHSA}} \leq 53 \mu\text{mol/g}$ Protein; $\text{SD}_{\text{mBSA}} \leq 17 \mu\text{mol/g}$ und $\text{SD}_{\text{SDm}\beta\text{-Ga}} \leq 40 \mu\text{mol/g}$ Protein.

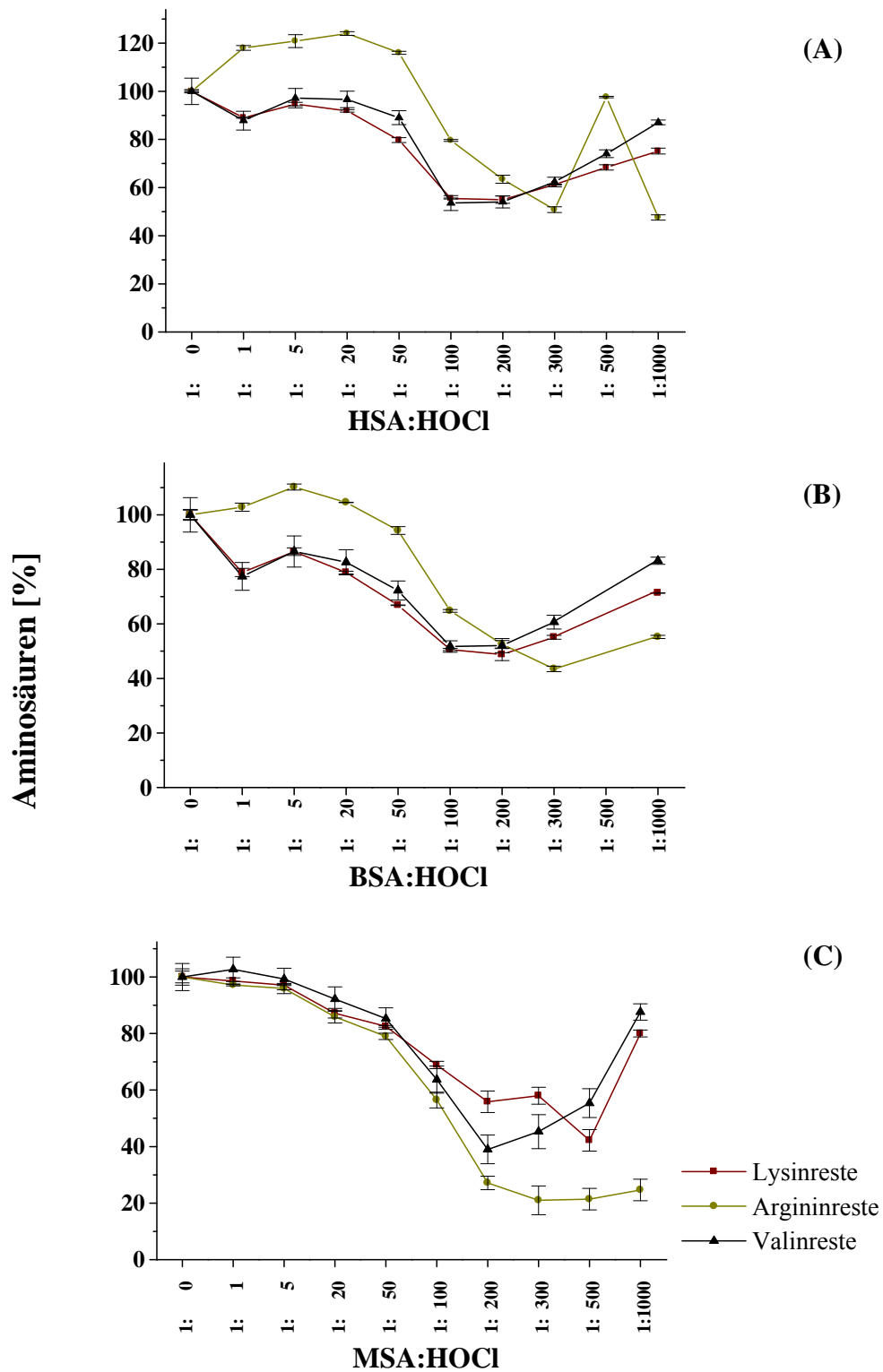


Abb. 3.22: Quantitative Bestimmung von Arginin, Lysin und Valin in HOCl-modifizierten Proteinen. Es wurden HSA, BSA und MSA aus Kapitel 3.1.4, welche in einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 modifiziert wurden, für eine Aminosäurenanalyse (Methode 2.2.2.3) verwendet. In Graphik **A**) wurden die Arginine, Lysine und Valine von modifiziertem HSA, in Graphik **B**) von modifiziertem BSA und in Graphik **C**) von modifiziertem MSA dargestellt. Dabei wurde natives HSA, BSA und MSA als 100% definiert und die restlichen Proben auf diesen Wert normiert. Es wurden jeweils 2 Werte gemittelt. Die SD wurde als Fehlerbalken gezeigt. $SD_{Lys} \leq 4\%$; $SD_{Arg} \leq 5\%$.

3.4.5.3 Aminosäurenanalyse von HOCl-modifiziertem HSA, BSA und MSA

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.1.4, 3.4.4, 3.4.5.1 und 3.4.5.2 machen deutlich, dass zum Einen durch eine HOCl-Oxidation von Proteinen eine antivirale Wirkung entsteht und, dass zum Anderen diese mit einer Veränderung des Thiol-, Carbonyl- und Aminogruppenanteils einhergeht. Durch eine Aminosäurenanalyse sollte der Anteil der Aminosäurereste Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Ser, Thr, Glu, Asp, His, Lys und Arg von HOCl-modifiziertem HSA, BSA und MSA bestimmt werden.

Wird durch die Aminosäurenanalyse einer der Aminosäurereste nicht mehr nachgewiesen, so wird davon ausgegangen, dass der jeweilige Aminosäurerest durch HOCl modifiziert wurde.

Für diesen Test wurde unterschiedlich modifiziertes HSA, BSA und MSA aus dem Kapitel 3.1.4 verwendet. Nach einer Konzentrationsbestimmung (Methode 2.2.2.2) wurde mit den modifizierten Proteinen eine Aminosäurenanalyse nach der Methode 2.2.2.3 in Kooperation mit dem FZ Borstel, Abt. Strukturbiochemie durchgeführt.

Als erstes wurden die HOCl-modifizierten humanen Serumalbumine untersucht (Abbildung 3.23.A-F). Der nach der Hydrolyse der mHSA-Proben entstandene Anteil von Aminosäuren wurde auf die Kontrolle bezogen. Diese entsprach den Aminosäuren aus HSA und wurde als 100% definiert. Die Aminosäuren deren Gehalt sich signifikant durch HOCl-Behandlung veränderte, wurden in der Graphik als nicht unterlegter Kreis gezeigt und den Aminosäuren gegenüber gestellt, deren Gehalt sich nicht bzw. relativ gering veränderte.

Es wurde deutlich, dass sich der prozentuale Anteil der Aminosäuren Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Glu, Pro und Lys relativ gering gegenüber den im Folgenden genauer betrachteten Aminosäuren Cys, Met, Phe, Tyr, His und Arg durch HOCl veränderte.

In Abb.3.23.A ist die Veränderung des Cysteingehalts innerhalb der mHSA-Proben dargestellt. Im Vergleich mit den Cysteinen des nativen HSA (=100%) wurden im mHSA 1:5 71% und im mHSA 1:20 46% Cysteine gemessen. Ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:50 wurden keine Cysteine mehr nachgewiesen.

Auch die Methionine veränderten sich mit zunehmendem HOCl-Überschuss (Abb.3.23.B). Zuerst wurden 98% der ursprünglichen Methionine im mHSA 1:1, dann 62% (mHSA 1:50) und anschließend 39% (mHSA 1:1000) gemessen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der prozentuale Anteil der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin nach einer HOCl-Behandlung abnahm (Abb.3.23.C und D). So besaß mHSA 1:1 anfänglich 96%, bei einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 dann 60%, und zuletzt bei einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 noch 12% der ursprünglichen Phenylalanine. Der Tyrosingehalt veränderte sich von 100% im nativen Protein zu 80% im mHSA 1:1 über 60% im mHSA 1:20. Es wurden 16% der ursprünglichen Tyrosine im mHSA 1:50 gemessen. Ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 wurden keine Tyrosine mehr nachgewiesen.

Danach wurde gezeigt, dass der Anteil der basischen Aminosäuren Histidin und Arginin (siehe auch Kapitel 3.4.5.2) im HSA durch die hypochlorige Säure verändert wurde (Abb.3.23.E und F). Von den Histidinen wurden im mHSA 1:1 89%, im mHSA 1:20 85%, und ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 0% nachgewiesen. Der Anteil der Arginine lag zwischen 63% (mHSA 1:200) und 48% (mHSA 1:1000).

Um die Veränderungen der Aminosäureanteile jeder Probe mit der inhibitorischen Wirksamkeit vergleichen zu können, wurde die antivirale Effektivität von unterschiedlich modifiziertem mHSA in der Abb. 3.23.G) dargestellt. Es handelt sich hierbei um Werte, die in einem HIV-Infektionstest bei einer Endkonzentration von 100 µg/ml Protein gemessen wurden (vgl. Kapitel 3.1.4).

Es wird deutlich, dass eine zunehmende HOCl-Oxidation der Aminosäuren Cys, Met, Phe, Tyr, His und Arg mit einer Zunahme der inhibitorischen Wirksamkeit korreliert. So wurde im HIV-Infektionstest bei einer Endkonzentration von 100 µg/ml mHSA zum ersten Mal ein antiviraler Effekt mit der Probe mHSA 1:100 beobachtet. In dieser Probe wurde ein Cystein-, Tyrosin- und Histidinanteil nicht mehr detektiert.

Als zweites wurden die modifizierten bovinen Serumalbumine untersucht. Auch hier wurden die Aminosäuren, deren prozentualer Anteil sich signifikant veränderte, in den Abbildungen 3.24.A-F) als nicht unterlegter Kreis dargestellt.

Die Abnahme der Cysteinanteile Abb. 3.24.A), der Methioninanteile Abb. 3.24.B), der Tyrosinanteile Abb. 3.24.D) und der Phenylalaninanteile Abb. 3.24.C) verlief ähnlich wie jene des modifizierten HSA.

Der Histidingehalt (Abb. 3.24.E) nahm von 79% (mBSA 1:1), auf 37% (mBSA 1:100) und 18% (mBSA 1:200) ab. Es wurden keine Histidine in den mBSA-Proben mit einem Protein:HOCl Verhältnis $>1:300$ nachgewiesen.

Daneben wurden innerhalb der Probe mBSA 1:1000 55% der ursprünglichen Arginine gemessen.

Der antivirale Effekt von mBSA beginnt, wie beim mHSA, ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100. Innerhalb dieser Proben wurden die Cysteine und Tyrosine nicht mehr detektiert.

Als drittes wurden die Proben der HOCl-modifizierten murinen Serumalbumine analysiert. Auch diesmal wurde eine signifikante Veränderung des prozentualen Anteils der Aminosäuren Cys, Met; Phe; Tyr; His und Arg beobachtet (Abb. 3.25.A-F).

Ein Vergleich der Cysteinanteile (Abb. 3.25.A) mit dem des nativen MSA (=100%) zeigte, dass im mMSA 1:1 91% und im mMSA 1:50 26% der ursprünglichen Cysteine gemessen wurden. Bei einer Verhältnis $> 1:100$ wurden keine Cysteine mehr nachgewiesen.

Auch der Gehalt der Methionine und Phenylalanine veränderte sich signifikant (Abb. 3.25.B und C). So wurde anfänglich ein Methioninanteil von 109% (mMSA 1:1) und dann von 46% (mMSA 1:1000) nachgewiesen. Daneben wurden in der mMSA 1:1-Probe 99%, in der mMSA 1:100-Probe 83% und in der mMSA 1:1000-Probe 31% Phenylalanine gemessen.

Es wurde kein Tyrosinanteil (Abb. 3.25.D) ab einem Protein:HOCl-Verhältnis $> 1:100$ detektiert.

Außerdem wurden 98% (mMSA 1:5) und schließlich keine (mMSA 1:200) Histidine mehr nachgewiesen (Abb. 3.25.E).

Vom ursprünglichen Argininanteil (Abb. 3.25.F) des nativen MSA wurden 97% im mMSA 1:1 und noch 25% im mMSA 1:1000 gemessen.

Auch diesmal wurden die Werte des HIV-Infektionstest für einen Vergleich herangezogen. Ein antiviraler Effekt wurde mittels der mMSA-Proben, im Gegensatz zu den mHSA- und mBSA-Proben, erst ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:200 gemessen (Abb.3.25.G). In diesem Verhältnis wurden keine Cysteine, Tyrosine und Histidine detektiert.

Ein Vergleich der Ergebnisse von mHSA und mBSA zeigt, dass die Cysteine, die Methionine, die Tyrosine und die Phenylalanine, die mit identischen HOCl-Konzentrationen reagierten, annähernd gleich stark durch HOCl oxidiert wurden. Dahingegen wurden die Histidine im HSA schon bei geringerer HOCl-Konzentration angegriffen. Die Argininreste von HSA und BSA verhielten sich ähnlich.

Das modifizierte mMSA, welches, verglichen mit mHSA und mBSA, eine verminderte antivirale Effektivität bei gleicher HOCl-Behandlung aufwies, wich in der Veränderung des Aminosäureanteils gering ab: So wurden die Cysteine und Methionine in den mMSA-Proben weniger stark angegriffen. Der Anteil des Phenylalanins lag leicht unter dem der mHSA- und mBSA-Proben. Der Histinanteil war ähnlich dem des mHSA. Ein Vergleich des Arginingehalts (vgl. Kapitel vorher) von mHSA, mBSA und mMSA zeigt eine stärkere Abnahme in der mMSA-Probe nach einer HOCl-Behandlung.

Ein Vergleich dieser Werte zeigt eine Abnahme des prozentualen Aminosäureanteils mit steigendem Protein:HOCl-Verhältnis in der Reihe:

mHSA: Cys > Tyr > His > Met > Phe > Arg

mBSA: Cys > Tyr > Met > His > Phe > Arg

mMSA: Tyr > Cys > His > Met > Arg > Phe

Die Auswertung der Aminosäurenanalyse von mHSA, mBSA und mMSA zeigt, dass die Aminosäuren Alanin, Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin, Prolin und Lysin eine geringere Sensitivität gegenüber einer HOCl-Behandlung hatten, als die Aminosäurereste Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Arginin.

Zusätzlich zeigt die Auswertung der Ergebnisse von mHSA, mBSA und mMSA, dass mit zunehmender HOCl-Konzentration und Oxidation der Aminosäurereste Cys, Met, Phe, Tyr, His und Arg die Fähigkeit steigt, HIV NL4-3wt zu neutralisieren.

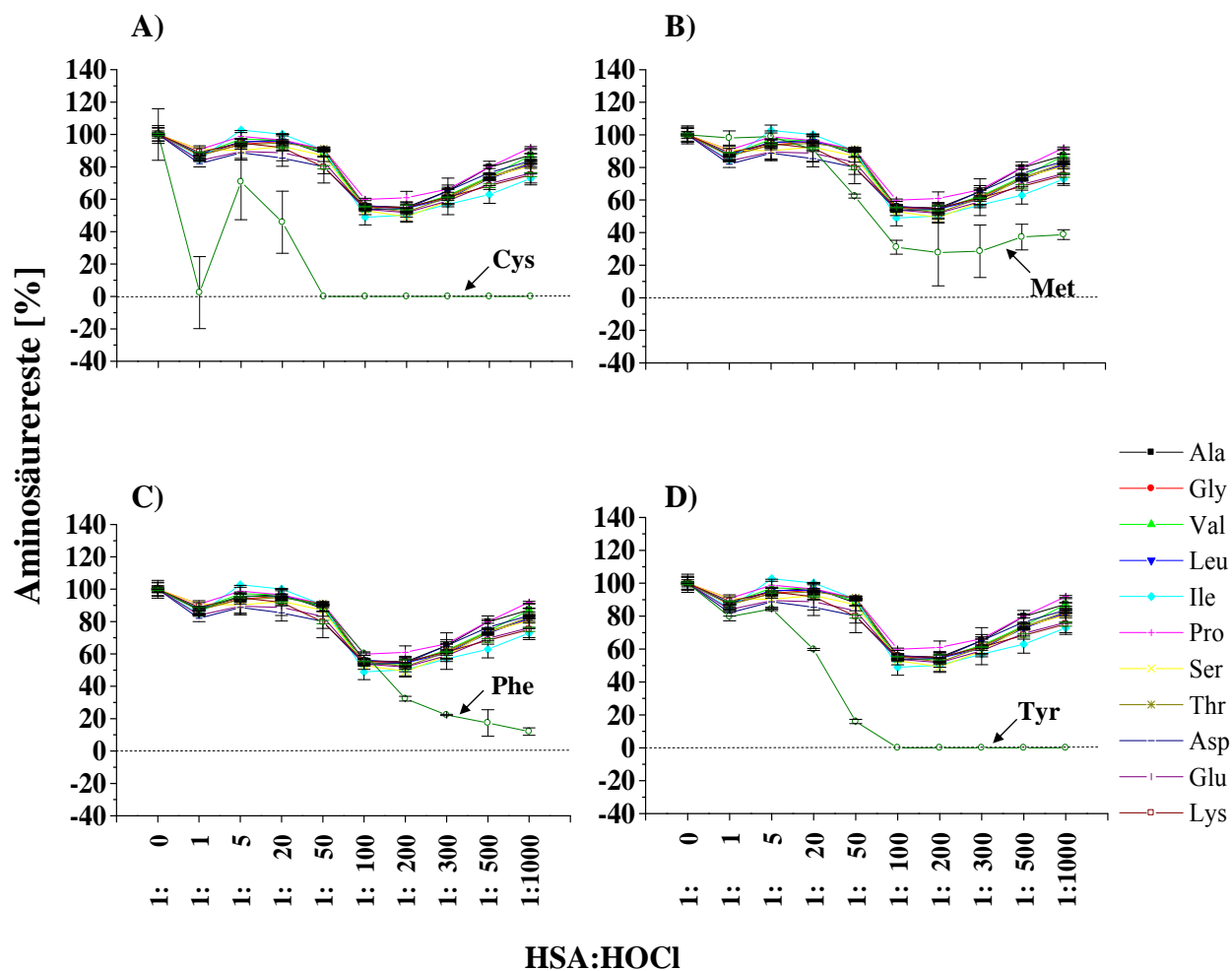
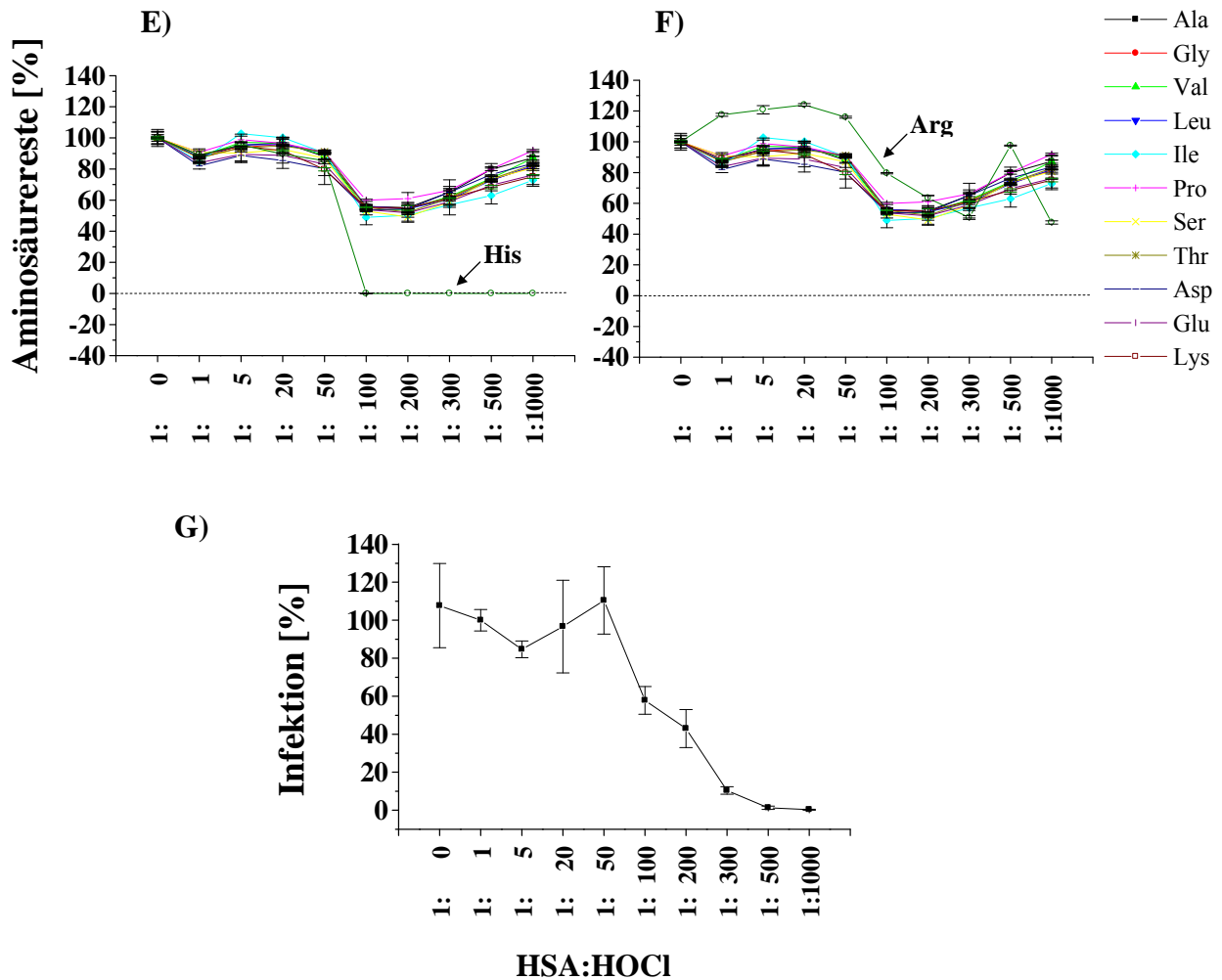


Abb. 3.23: Aminosäurenanalyse und HIV-Infektionstest von mHSA. Für die Aminosäurenanalyse wurde mHSA 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 aus dem Kapitel 3.1.4 verwendet. Die Proteine wurden dann bei 120°C für 16 Stunden in 8 N HCl hydrolysiert und die freien Aminosäuren mit PITC derivatisiert. Die Auftrennung erfolgte mittels PicoTag-Säule, sowie HPLC-Anlage der Fa. Watson. Insgesamt wurden jeweils 2 Messungen pro Protein durchgeführt und die Standardabweichung SD als Fehlerbalken gezeigt. Es wurden diejenigen Aminosäuren, dessen prozentualer Anteil sich relativ ähnlich nach einer HOCl-Behandlung veränderte, als Kontrollen in der Graphik A-F dargestellt (Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Glu, Pro und Lys). Diese Aminosäuren wurden den **A)** Cysteinen, den **B)** Methionen,



den C) Phenylalaninen, den D) Tyrosinen, den E) Histidinen und den F) Argininen gegenübergestellt. In Graphik G) wurde die antivirale Aktivität der mHSA-Proben in einem HIV-Infektionstest (Kapitel 3.1.4) mit dem Stamm NL4-3wt überprüft. Hierfür wurden die modifizierten Proteine in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Protein getestet (C). Es wurden pro Konzentration 3 Werte gemittelt und die Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

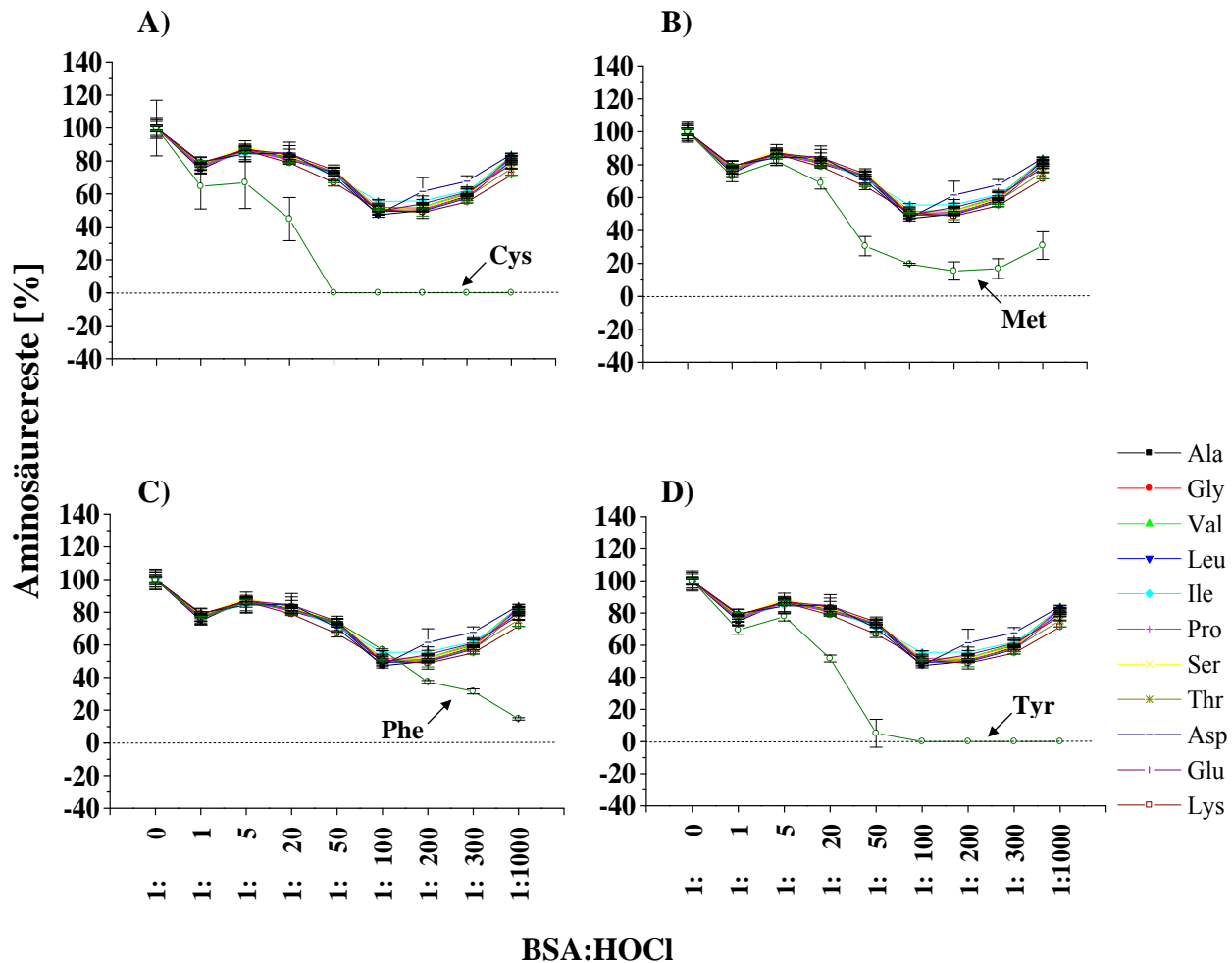
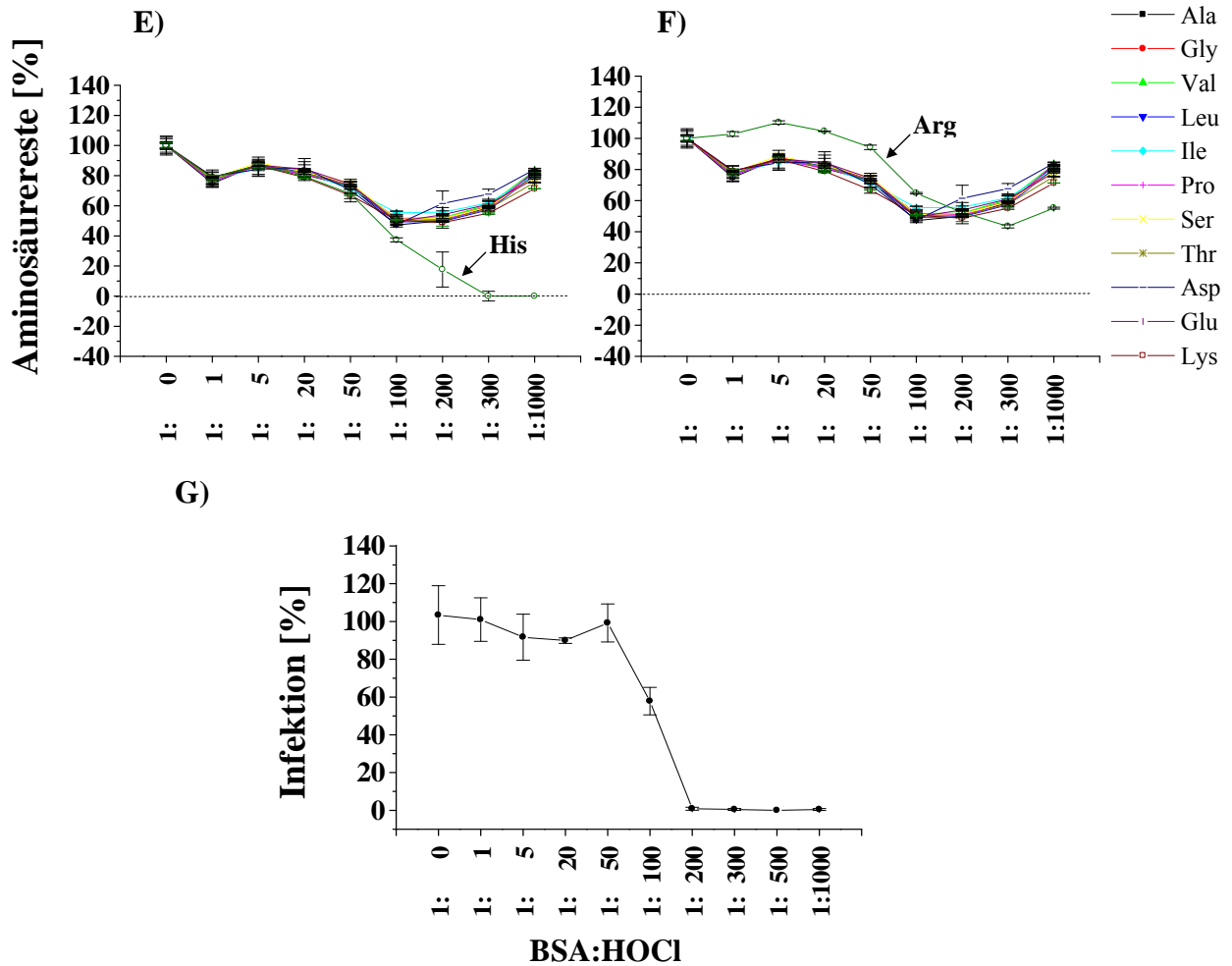


Abb. 3.24: Aminosäurenanalyse und HIV-Infektionstest von mBSA. Es wurden für eine Aminosäurenanalyse die mBSA-Proben aus dem Kapitel 3.1.4 verwendet (mBSA 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000) und nach der Methode 2.2.2.3 einer Aminosäurenanalyse unterzogen. Es wurden jeweils 2 Messungen pro Protein durchgeführt und die Standardabweichung SD als Fehlerbalken dargestellt. Die Aminosäuren **A)** Cystein, **B)** Methion, **C)** Phenylalanin, **D)** Tyrosin, **E)** Histidin und **F)** Arginin wurden den Aminosäuren gegenübergestellt, deren prozentualer Anteil sich



nach einer HOCl-Behandlung ähnlich veränderten (Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Glu, Pro und Lys).

Weiterhin wurde in Graphik G) die antivirale Aktivität der mBSA-Proben, welche in einem HIV-Infektionstest (Kapitel 3.1.4) getestet wurde, dargestellt. Es wurden pro 100 µg/ml Protein 3 Werte gemittelt und die Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

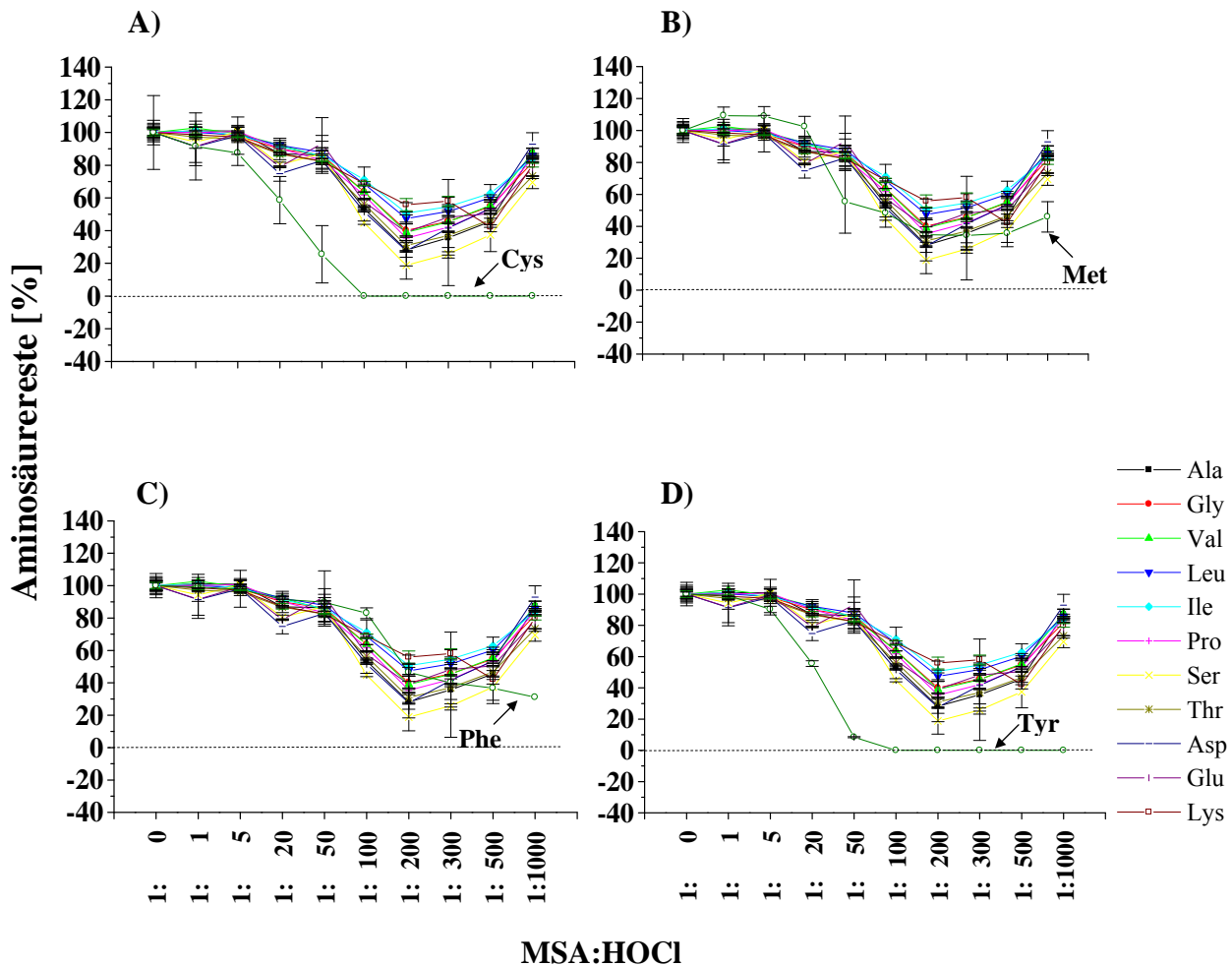
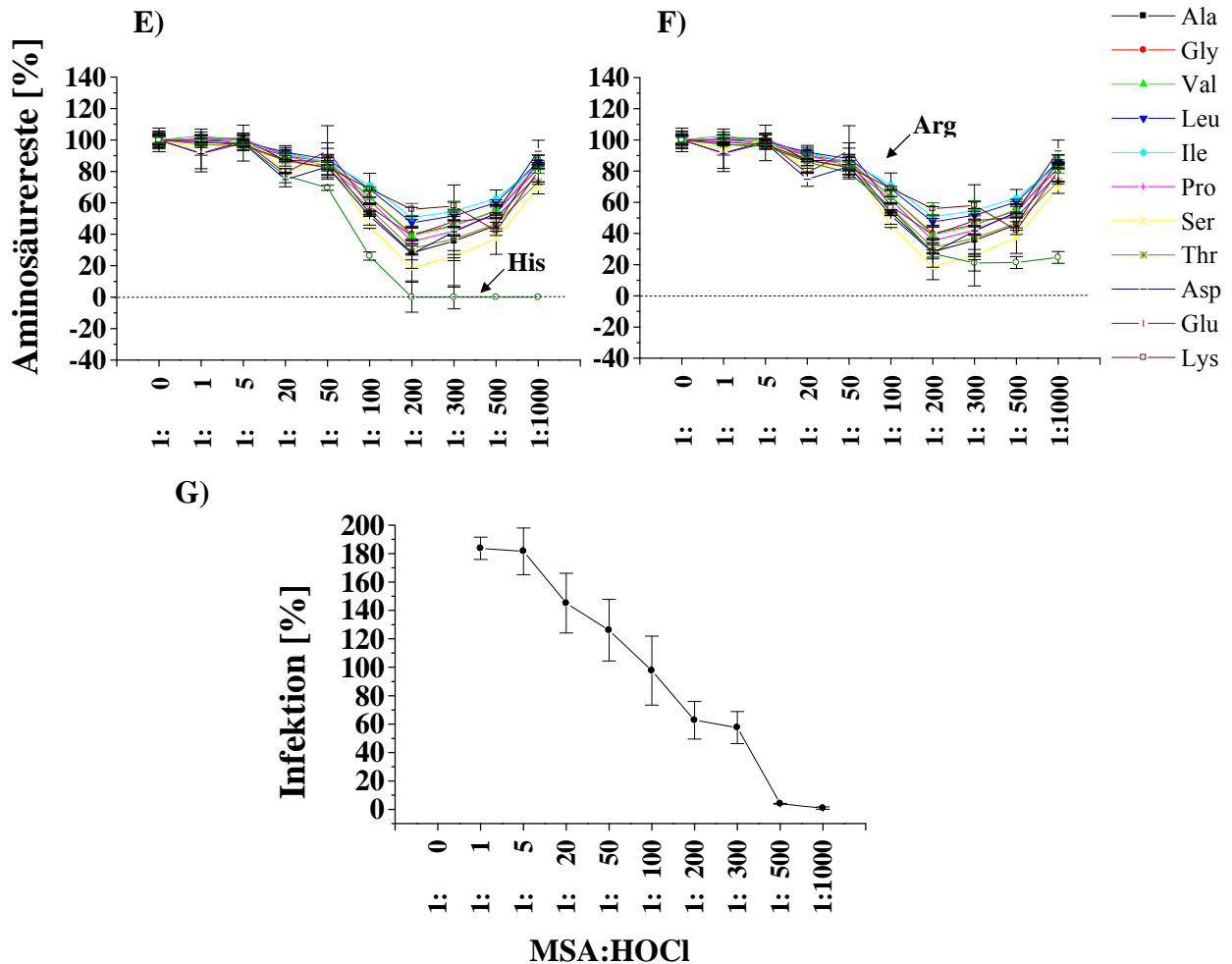


Abb. 3.25: Aminosäurenanalyse und HIV-Infektionstest von mMSA. Für den Test wurden die mMSA-Proben, welche mit HOCl in einem Verhältnis von 1:0, 1:1, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500 und 1:1000 modifiziert wurden, aus dem Kapitel 3.1.4 verwendet. Es folgte eine Aminosäurenanalyse nach der Methode 2.2.2.3. Es wurden jeweils 2 Messungen pro Protein durchgeführt und die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt. Die Aminosäurereste **A)** Cys, **B)** Met, **C)** Phe, **D)** Tyr, **E)** His und **F)** Arg wurden anschließend einzeln den Aminosäurenresten Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Glu, Pro und Lys gegenübergestellt, welche sich nach einer HOCl-



Behandlung ähnlich veränderten.

Graphik **G)**: Die antivirale Aktivität der mMSA-Proben wurde in einem HIV-Infektionstest (Kapitel 3.1.4) mit dem Stamm NL4-3wt überprüft. Hierfür wurden die modifizierten Proteine in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Protein getestet. Es wurden pro Konzentration 3 Werte gemittelt und die Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

3.4.6 Untersuchung von HOCl-modifizierten Poly(Glu,Lys,Arg) und HSA-Peptiden

In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass HSA, BSA und MSA nach einer HOCl-Behandlung eine antivirale Aktivität besitzt. Zusätzlich wurde im vorangegangenen Kapitel belegt, dass die antivirale Aktivität mit einer Veränderung der Aminosäuren Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Arginin korreliert.

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch Proteine bzw. Peptide, die ein Molekulargewicht kleiner als 70 kDa besitzen, nach einer HOCl-Behandlung einen antiviralen Effekt aufweisen. Für die Durchführung des Versuchs sollte zum Einen eine Peptidsequenz aus dem HSA und zum Anderen das Polymer Poly(Glu, Lys, Tyr) verwendet werden.

3.4.6.1 Untersuchung der inhibitorischen Aktivität von HOCl-modifiziertem Poly(Glu,Lys,Tyr)

Für das Experiment wurde das Polymer Poly(Glu,Lys,Tyr) der Fa. Sigma-Aldrich verwendet, welches ein Molekulargewicht von 23300 Da und ein Aminosäurenverhältnis von 6:3:1 besitzt. Der Anteil der Aminosäure Tyrosin, welche durch HOCl modifizierbar ist, beträgt somit 10%.

Im Jahre 1995 zeigten Javaherian, K. und McDanal, C., dass synthetisch hergestelltes Poly(Glu,Ala,Tyr) im Verhältnis 6:3:1 durch den hohen Glutamatanteil und der damit einhergehenden negativen Ladung einen Polyanionencharakter und somit eine antivirale Aktivität besitzt. Der IC_{90} -Wert betrug im Zellfusionstest 60 $\mu\text{g/ml}$.

Somit stellte sich neben der Frage, ob nach der Reaktion mit HOCl im Protein:HOCl-Verhältnis 1:1000 das 23 kDa-Polymer Poly(Glu,Lys,Tyr) antiviral wirkt, auch die Frage, ob ohne HOCl-Modifikation das Poly(Glu,Lys,Tyr) wie Poly(Glu, Ala, Tyr) einen antiviralen Effekt besitzt.

Für die Beantwortung dieser Fragen wurde Poly(Glu,Lys,Tyr) vor und nach einer HOCl-Behandlung (Methode 2.2.2.1) im HIV-Infektionstest (Methode 2.2.4.2) gemessen.

Für diesen Test wurden jeweils 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml modifiziertes und nicht modifiziertes Polymer eingesetzt.

In Abb. 3.27 ist zu sehen, dass das unveränderte Poly(Glu,Lys,Tyr) eine inhibitorische Aktivität besaß. Allerdings wurde innerhalb dieses Messbereiches keine Virusinhibition < 70% gemessen, so dass eine Bestimmung der IC₅₀ bzw. IC₉₀ nicht möglich war. Das HOCl-modifizierte Poly(Glu,Lys,Tyr) zeigt dahingegen eine wesentlich stärkere antivirale Aktivität. Der IC₅₀-Wert wurde mittels des Programms GraphPad Prism berechnet und beträgt > 80 µg/ml Peptid. Das Bestimmtheitsmaß (R²) betrug 1.

Damit ergab sich aus diesem Test,

- dass das Poly(Glu,Lys,Tyr) mit einer IC₅₀ >> 200 µg/ml wesentlich schlechter inhibierte, als das von Javaherian, K. und McDanal, C. verwendete Poly(Glu,Ala,Tyr).
- dass durch eine HOCl-Modifizierung von Poly(Glu,Lys,Tyr), in einem HOCl:Polymer-Verhältnis von 1:1000, die antivirale Aktivität stark zunahm. Die IC₅₀ liegt im HIV-Infektionstest bei 80 µg/ml Peptid.

Somit wurde belegt, dass eine HOCl-Behandlung des 23 kDa-Polymers Poly(Glu,Lys,Tyr) zu einer gesteigerten antiviralen Aktivität führt.

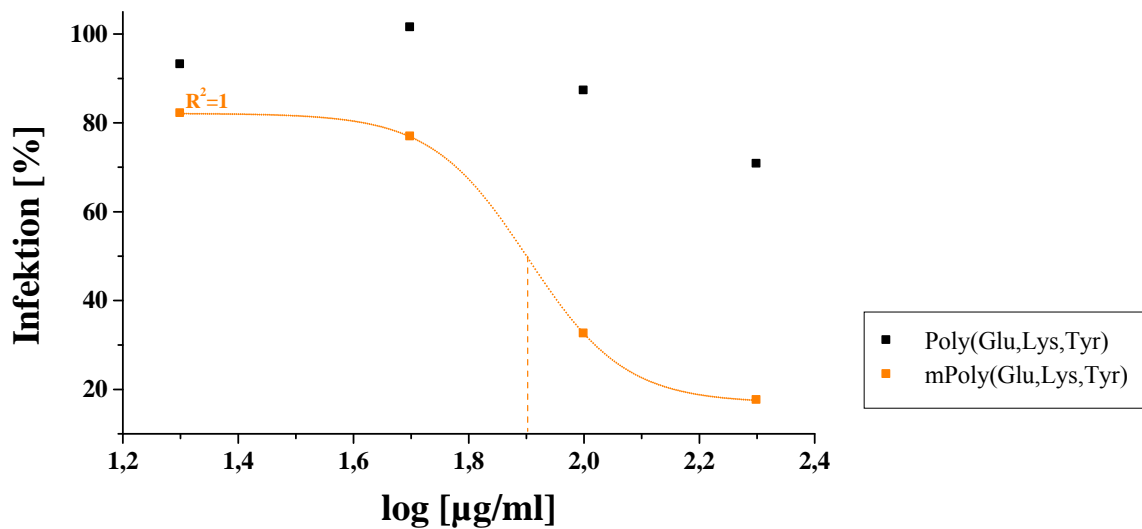


Abb. 3.27: Neutralisation des HIV NL4-3wt mit Poly(Glu,Lys,Tyr). In einem HIV-Infektionstest wurde Poly(Glu,Lys,Tyr), welches mit einem 1000-fachen molaren HOCl-Überschuss modifiziert bzw. nicht modifiziert wurde, getestet. Es wurden 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml modifiziertes Polymer pro Well einer 96-Well-Platte gegeben, auf die am Vortag jeweils 10.000 TZM-bl-Zellen/Well ausgesät wurden. Anschließend wurden die Zellen der Wells mit jeweils 300 ffu HIV-1 NL4-3wt (MOI = 0,03) infiziert. Es folgte eine Fixierung mit 3,5%iger Formaldehydlösung nach 48 Stunden. Die infizierten Zellen wurden mittels X-Gal angefärbt. Die Anzahl der infizierten Zellen ohne Peptid wurde gleich 100% gesetzt. Es wurden jeweils 3 Werte pro Konzentration gemessen und gemittelt. Der rel. IC₅₀-Wert (gestrichelte Linie) wurde durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf (gepunktete Linie) kalkuliert ($Y = A2 + [A1 - A2] / (1 + 10^{X - \text{LogIC}_{50}})$; A1 = höchster Y-Wert; A2 = niedrigster Y-Wert). R² = Bestimmtheitsmaß.

3.4.6.2 Untersuchung von HSA-Peptiden

Es sollte untersucht werden, ob Peptide, die ein Molekulargewicht ~ 3 kDa besitzen nach einer HOCl-Behandlung einen antiviralen Effekt aufweisen. Hierfür sollten Teilstrukturen aus dem bereits erfolgreich getesteten HSA, BSA und MSA verwendet werden. Es wurden Teilstrukturen mit einem großen Anteil HOCl-oxidierbarer (Cys, Met, Phe, Tyr, His und Arg) und zur Kontrolle mit einem kleineren Anteil HOCl-oxidierbarer Aminosäurereste gesucht. Diese sollten eine Länge von 25 Aminosäuren besitzen.

In einem ersten Schritt wurden innerhalb der Aminosäuresequenzen von HSA, BSA und MSA die reaktiven Aminosäurereste Cys, Met, Phe, Tyr, His und Arg farblich hervorgehoben (siehe Abb. 3.26). Es wurde gezeigt, dass sich diese Aminosäurereste über das gesamte Protein verteilen. Es gibt Bereiche, wo es zu einer Klusterbildung kommt. Ein Bereich, mit einem hohen Anteil von Cys, Met, Phe, Tyr, His und Arg wurde in der Abbildung 3.26 markiert (1. Peptid). Außerdem wurde ein Bereich gefunden und markiert, welcher einen hohen Anteil gering veränderbarer Aminosäuren besitzt (Abb. 3.26; 2. Peptid). Es wurden diese zwei Peptide aus dem HSA gewählt und in einem nächsten Schritt deren Synthese in Auftrag gegeben (FZ Borstel, Abt. Strukturbiochemie).

Peptid 1: YLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYK

Peptid 2: AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV

Das Peptid 1 besitzt einen Anteil von 48 Mol% der oxidierbaren Aminosäurereste und ein Molekulargewicht von 3256 Da. Das Peptid 2 wiederum weist einen Anteil von 8 Mol% modifizierbarer Aminosäurereste und ein Molekulargewicht von 2692 Da auf.

Zuerst wurde untersucht, ob diese Peptide für eine HOCl-Behandlung und anschließendem HIV-Infektionstest geeignet sind.

Die Peptide wurden nach der Methode 2.2.2.1 mit einem 100-fachen bzw. 1000-fachen molaren Überschuss HOCl versetzt. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von Taurin (5 g/l) gestoppt. Um die Proteine zu konzentrieren, wurde ein 1 kDa-Dialyseschlauch verwendet, welcher mit PEG 8000 überschichtet wurde. Als

weitere Kontrolle wurde BSA nach dem gleichen Protokoll modifiziert und konzentriert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 4°C wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Reagenz (Methode 2.2.2.2.1) durchgeführt. Die Kontrolle (mBSA 1:1000) war hochkonzentriert und besaß im HIV-Infektionstest eine virizide Wirkung (nicht gezeigt). Die mit HOCl versetzten HSA-Peptide konnten dagegen nicht mehr nachgewiesen werden. Auch eine TCA-Fällung, eine Proteintrocknung, sowie eine HPLC-Auftrennung zeigten, dass keine Peptidfragmente mehr nachzuweisen waren.

Da das modifizierte BSA bei allen Versuchen erhalten blieb, liegt der Schluss nahe, dass die Peptide, welche ein Molekulargewicht von ca. 3 kDa besitzen, durch HOCl in einem HOCl:Peptid-Verhältnis von 1:100 und 1:1000 so stark oxidiert wurden, dass ein Nachweis nicht mehr möglich war.

Damit wurde belegt, dass HSA-Peptide mit einem Molekulargewicht von 3 kDa nicht, dahingegen aber Polymere mit einem Molekulargewicht von 23 kDa und Proteine mit einem Molekulargewicht von 67 kDa für eine HOCl-Modifizierung im Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 und anschließendem HIV-Infektionstest geeignet sind.

		10	20	30	40	50																																														
HSA	1	M	K	W	V	T	F	I	S	L	L	F	L	F	S	S	A	Y	S	R	G	V	F	R	R	D	A	H	K	S	E	V	A	H	R	F	K	D	L	G	E	E	N	F	K	A	L	V	L	I	A	
BSA	1	M	K	W	V	T	F	I	S	L	L	L	L	F	S	S	A	Y	S	R	G	V	F	R	R	D	T	H	K	S	E	I	A	H	R	F	K	D	L	G	E	E	H	F	K	G	L	V	L	I	A	
MSA	1	M	K	W	V	T	F	L	L	L	L	F	V	S	G	S	A	F	S	R	G	V	F	R	R	E	A	H	K	S	E	I	A	H	R	Y	N	D	L	G	E	Q	H	F	K	G	L	V	L	I	A	
		60	70	80	90	100																																														
HSA	51	F	A	Q	Y	L	Q	Q	C	P	F	E	D	H	V	K	L	V	N	E	V	T	E	F	A	K	T	C	V	A	D	E	S	A	E	N	C	D	K	S	L	H	T	L	F	G	D	K	L	C	T	
BSA	51	F	S	Q	Y	L	Q	Q	C	P	F	D	E	H	V	K	L	V	N	E	L	T	E	F	A	K	T	C	V	A	D	E	S	H	A	G	C	E	K	S	L	H	T	L	F	G	D	E	L	C	K	
MSA	51	F	S	Q	Y	L	Q	K	C	S	Y	D	E	H	A	K	L	V	Q	E	V	T	D	F	A	K	T	C	V	A	D	E	S	A	A	N	C	D	K	S	L	H	T	L	F	G	D	K	L	C	A	
		110	120	130	140	150																																														
HSA	101	V	A	T	L	R	E	T	Y	G	E	M	A	D	C	C	A	K	Q	E	P	E	R	N	E	C	F	L	Q	H	K	D	D	N	P	N	L	P	R	L	V	R	P	E	V	D	V	M	C	T	A	
BSA	101	V	A	S	L	R	E	T	Y	G	D	M	A	D	C	C	E	K	Q	E	P	E	R	N	E	C	F	L	S	H	K	D	S	P	D	L	P	K	L	K	P	D	P	N	T	L	C	D	E			
MSA	101	I	P	N	L	R	E	N	Y	G	E	L	A	D	C	C	T	K	Q	E	P	E	R	N	E	C	F	L	Q	H	K	D	D	N	P	S	L	P	P	F	E	R	P	E	A	E	A	M	C	T	S	
		160	170	180	190	200																																														
HSA	151	F	H	D	N	E	E	T	F	L	K	K	Y	L	Y	E	I	A	R	R	H	P	Y	F	Y	A	P	E	L	L	F	F	A	K	R	Y	K	A	A	F	T	E	C	Q	A	A	D	K	A	A		
BSA	150	F	K	A	D	E	K	K	F	W	G	K	Y	L	Y	E	I	A	R	R	H	P	Y	F	Y	A	P	E	L	L	Y	A	N	K	Y	N	G	V	F	Q	E	C	Q	A	E	D	K	G	A			
MSA	151	F	K	E	N	P	T	T	F	M	G	H	Y	L	H	E	V	A	R	R	H	P	Y	F	Y	A	P	E	L	L	Y	A	E	Q	Y	N	E	I	L	T	Q	C	C	A	E	A	D	K	E	S		
		210	220	230	240	250																																														
HSA	201	C	L	L	P	K	L	D	E	L	R	D	E	G	K	A	S	S	A	K	Q	R	L	K	C	A	S	L	Q	K	F	G	E	R	A	F	K	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	R	F	P	K	A	
BSA	200	C	L	L	P	K	I	E	T	M	R	E	K	V	L	T	S	S	A	R	Q	R	L	R	C	A	S	I	Q	K	F	G	E	R	A	L	K	A	W	S	V	A	R	L	S	Q	K	F	P	K	A	
MSA	201	C	L	T	P	K	L	D	G	V	K	E	K	A	L	V	S	S	V	R	Q	R	M	K	C	S	S	M	Q	K	F	G	E	R	A	F	K	A	W	A	V	A	R	L	S	Q	T	F	P	N	A	
		260	270	280	290	300																																														
HSA	251	E	F	A	E	V	S	K	L	V	T	D	L	T	K	V	H	T	E	C	C	H	G	D	L	L	E	C	A	D	D	R	A	D	L	A	K	Y	I	C	E	N	Q	D	S	I	S	S	K	L	K	
BSA	250	E	F	V	E	V	T	K	L	V	T	D	L	T	K	V	H	K	E	C	C	H	G	D	L	L	E	C	A	D	D	R	A	D	L	A	K	Y	I	C	D	N	Q	D	T	I	S	S	K	L	K	
MSA	251	D	F	A	E	I	T	K	L	A	T	D	L	T	K	V	N	K	E	C	C	H	G	D	L	L	E	C	A	D	D	R	A	E	L	A	K	Y	M	C	E	N	Q	A	T	I	S	S	K	L	Q	
		310	330	340	350																																															
HSA	301	E	C	C	D	K	P	L	L	E	K	S	H	C	I	A	E	V	E	N	D	E	M	P	A	D	L	P	L	A	A	D	F	V	E	S	K	D	V	C	K	N	Y	A	E	A	K	D	V	F		
BSA	300	E	C	C	D	K	P	L	L	E	K	S	H	C	I	A	E	V	E	K	D	A	I	P	E	N	L	P	L	P	L	A	A	D	F	A	E	D	K	D	V	C	K	N	Y	Q	E	A	K	D	A	F
MSA	301	T	C	C	D	K	P	L	L	K	K	A	H	C	L	S	E	V	E	H	D	T	M	P	A	D	L	P	A	I	A	A	D	F	V	E	D	Q	E	V	C	K	N	Y	A	E	A	K	D	V	F	
		360	370	380	390	400																																														
HSA	351	L	G	M	F	L	Y	E	Y	A	R	R	H	P	D	Y	S	V	V	L	L	R	L	A	K	T	Y	E	T	L	E	K	C	C	A	A	A	D	P	H	E	C	Y	A	K	V	F	D	E			
BSA	350	L	G	S	F	L	Y	E	Y	S	R	R	H	P	E	Y	A	V	S	V	L	L	R	L	A	K	E	Y	E	A	T	L	E	E	C	C	A	K	D	D	P	H	A	C	Y	S	T	V	F	D	K	
MSA	351	L	G	T	F	L	Y	E	Y	S	R	R	H	P	D	Y	S	V	S	L	L	R	L	A	K	K	Y	E	A	T	L	E	K	C	C	A	E	A	N	P	P	A	C	Y	G	T	V	L	A	E		
		410	420	430	440	450																																														
HSA	401	F	K	P	L	V	E	E	P	Q	N	L	I	K	Q	N	C	E	L	F	E	Q	L	G	E	Y	K	F	Q	N	A	L	L	V	R	Y	T	K	K	V	P	Q	V	S	T	P	T	L	V	E	V	
BSA	400	L	K	H	L	V	D	E	P	Q	N	L	I	K	Q	N	C	D	Q	F	E	K	L	G	E	Y	G	F	Q	N	A	L	I	V	R	Y	T	R	K	V	P	Q	V	S	T	P	T	L	V	E	V	
MSA	401	F	Q	P	L	V	E	E	P	K	N	L	V	K	T	N	C	D	L	Y	E	K	L	G	E	Y	G	F	Q	N	A	L	L	V	R	Y	T	Q	K	A	P	Q	V	S	T	P	T	L	V	E	A	
		460	470	480	490	500																																														
HSA	451	S	R	N	L	G	K	V	G	S	K	C	C	K	H	P	E	A	K	R	M	P	C	A	E	D	Y	L	S	V	V	L	N	Q	L	C	V	L	H	E	K	T	P	V	S	D	R	V	T	K	C	
BSA	450	S	R	S	L	G	K	V	G	T	R	C	C	T	K	P	E	S	E	R	M	P	C	T	E	D	Y	L	S	L	I	L	N	R	L	C	V	L	H	E	K	T	P	V	S	E	K	V	T	K	C	
MSA	451	A	R	N	L	G	R	V	G	T	K	C	C	T	L	P	E	D	Q	R	L	P	C	V	E	D	Y	L	S	A	I	L	N	R	V	C	L	L	H	E	K	T	P	V	S	E	H	V	T	K	C	
		510	520	530	540	550																																														
HSA	501	C	T	E	S	L	V	N	R	R	P	C	F	S	A	L	E	V	D	E	T	Y	V	P	K	E	F	N	A	E	T	F	T	F	H	A	D	I	C	T	L	S	E	K	E	R	Q	I	K	K	Q	
BSA	500	C	T	E	S	L	V	N	R	R	P	C	F	S	A	L	T	P	D	E	T	Y	V	P	K	A	F	D	E	K	L	F	T	F	H	A	D	I	C	T	L	P	D	T	E	K	Q	I	K	K	Q	
MSA	501	C	S	G	S	L	V	E	R	R	P	C	F	S	A	L	T	V	D	E	T	Y	V	P	K	E	F	K	A	E	T	F	T	F	H	S	D	I	C	T	L	P	E	K	E	K	Q	I	K	K	Q	
		560	570	580	590	600																																														
HSA	551	T	A	L	V	E	L	V	K	H	K	P	K	A	T	K	E	Q	L	K	A	V	M	D	D	F	A	A	F	V	E	K	C	C	K	A	D	D	K	E	T	C	F	A	E	E	G	K	K	L	V	
BSA	550	T	A	L	V	E	L	L	K	H	K	P	K	A	T	E	Q	L	K	T	V	M	E	N	F	V	A	F	V	D	K	C	C	A	A	D	D	K	E	A	C	F	A	V	E	G	P	K	L	V		
MSA	551	T	A	L	A	E	L	V	K	H	K	P	K	A	T	A	Q	L	K	T	V	M	D	D	F	A	Q	F	L	D	T	C	C	K	A	A	D	K	D	T	C	F	S	T	E	G	P	N	L	V		
		601																																																		
HSA	601	A	A	S	Q	A	A	L	G	L	609																																									
BSA	600	V	S	T	Q	T	A	L	A	607																																										
MSA	601	T	R	C	K	D	T	L	A	608																																										

Abb. 3.26: Vergleich der Aminosäuresequenz von HSA, BSA und MSA. Es wurden zwei Sequenzen identifiziert, die einen hohen Anteil (Peptid 1) und einen niedrigen Anteil (Peptid 2) HOCl-modifizierbarer Aminosäurereste besitzen. Die Sequenzen der Serumalbumine wurden aus der NCBI-Enzymdatenbank entnommen und mit dem Programm Bioedit bearbeitet. Homologe Aminosäurenbereiche = schwarz umrandet. Modifizierbare Aminosäurereste = hellrot dargestellt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Proteine mithilfe von hypochloriger Säure (HOCl) modifiziert. Durch die HOCl-Behandlung erhielten die Proteine die Eigenschaft HIV-1 zu neutralisieren. Es stellte sich die Frage, durch welche Veränderungen die HIV-neutralisierende Eigenschaft hervorgerufen wird.

4.1 Herstellung oxidierter Proteine im technischen Maßstab

Für die experimentelle Durchführung dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt ein Herstellungsverfahren etabliert, das es ermöglichte, den Inhibitor anstatt im Milligramm-Maßstab im Gramm-Maßstab herzustellen (Kapitel 3.1.1). Mithilfe der ursprünglichen Methode wurden die Proteine nach einer HOCl-Modifikation von der überschüssigen hypochlorigen Säure durch eine Sephadex PD-10-Säule der Fa. Amersham getrennt. Diese erlaubte ein Probenvolumen von 2,5 ml bei einer Konzentration von 10 mg/ml HSA. Um nun den Maßstab zu erhöhen, wurde für diese Arbeit ein Ultrafiltrationssystem der Fa. Amersham gewählt. Dieses basiert auf porösen Hohlfasern, welche eine Ausschlussgröße von ca. 10 kDa aufweisen. Eine peristaltische Pumpe befördert die Proteinlösung aus einem 1l-Reservoir in eine Kartusche mit den Hohlfasern. Hier findet die Abtrennung der Komponenten < 10 kDa statt. Mit der als Quixstand System bezeichneten Anlage können bis zu 10 l Proteinlösung filtriert, dialysiert (= diafiltriert) oder konzentriert werden. So konzentrierten Markaryan, A. und Mitarbeiter (2001) mit einem Quixstand System einen 4 l-Überstand ein, welcher einen von *Pseudomonas aeruginosa* exprimierten Antikörper enthielt. Mithilfe von porösen Hohlfasern diafiltrierten Weinstock, K. und Balou, C. E. (1986) einen 1 l Überstand aus Hefen mit α -Agglutinin zwischen zwei Aufreinigungsschritten gegen 12 l Puffer. Industriell wird das Hohlfasersystem mittlerweile zur Aufreinigung von Flusswasser verwendet. Dabei werden z.B. von der Fa. DAICEL, Japan und NADIR Filtration GmbH, Germany Hohlfaser-Module gebaut, die aus 4 Bündeln zu jeweils ca. 5000 Hohlfasern bestehen. Diese besitzen ein Ausschlussvolumen von 150 kDa und können bis zu 80-100 l/m²h Flusswasser filtrieren.

Durch die Umstellung der Herstellungsmethode auf das Hohlfasersystem wurde eine Methode geschaffen, die es ermöglichte, die HOCl-modifizierten Proteine im technischen Maßstab herzustellen. Es wurden 2,9 g/5 l Protein nach der HOCl-Behandlung konzentriert (23 mg/ml) und vom Taurin, welches zum Stoppen der

Reaktion mit der hypochlorigen Säure zugegeben wurde, abgetrennt. Zusätzlich erfolgte mit dem System nach der Konzentrierung eine Dialyse gegen PBS, welches die verbliebenen Taurinreste aus der Proteinlösung wusch. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der HIV-Inhibitor, der mit dieser Methode hergestellt wurde, im MTT-Test (Kapitel 3.1.3) eine geringere Zelltoxizität besaß, als der Inhibitor, der mit der ursprünglichen Methode hergestellt wurde. Somit verringerte die Diafiltration die Zelltoxizität *in vitro*, die vermutlich auf HOCl-Reste oder oxidiertes Taurin zurückzuführen ist.

Ein weiterer Vorteil der Umstellung auf das Hohlfasersystem ist die erhöhte Produktmenge. Die Experimente konnten nun mit Chargen gleicher Qualität durchgeführt werden. Daneben verkürzte die neue Methode die Herstellungszeit.

Die Verwendung des nächst größeren Hohlfasermodells ermöglicht eine Ultrafiltration von 50 bis 1000 l. Somit kann bei einer potentiell therapeutischen Anwendung der HIV-Inhibitor mit dem gleichen System in noch größeren Mengen produziert werden.

4.2 Etablierung einer alternativen Lagerung von HOCl-modifizierten Proteinen

Die HOCl-modifizierten Proteine werden bei -20°C gelagert. Da in vielen HIV-Verbreitungsgebieten hohe Temperaturen vorherrschen, sollte folglich bei einer möglichen therapeutische Anwendung der Inhibitor unempfindlich gegenüber hohen Temperaturen sein.

Es stellte sich die Frage, ob durch das Trocknen des Inhibitors die antivirale Aktivität erhalten bleibt, und ob somit eine alternative Lagerung möglich ist. Es gibt mehrere Trocknungsverfahren, wobei die gängigsten die Gefriertrocknung und die Vakuumtrocknung sind. Vorteilhafter ist die Vakuumtrocknung (Speedvac; Fa. Nunc), bei der die Konzentrierung bereits im flüssigen Zustand beginnt und das Einfrieren der Proben umgangen wird. Außerdem kann die Trocknung durch die Verwendung einer beheizbaren Speedvac beschleunigt werden. Es besteht allerdings bei den Trocknungsvorgängen die Gefahr, dass die Proteine denaturieren bzw. Aggregate bilden (Constantino, H. R. *et al.*, 1995, Lin, J.J. *et al.*, 2000) und auf diese Weise ihre Aktivität verlieren.

Es konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mit der Speedvac hergestellten trockenen Proteinproben antiviral in HIV_{NL4-3wt}-Infektionstests wirken und die inhibitorische Aktivität bei hohen Temperaturen bis zu einem Jahr erhalten bleibt (Kapitel 3.1.5).

Somit stellt die Vakuumtrocknung ein gutes System dar, um den HIV-Inhibitor zu trocknen und diesen über einen längeren Zeitraum bei hohen Temperaturen zu lagern. Bei einer potentiellen Anwendung als Medikament wäre somit ein Transport in warme Länder auch ohne Kühlung möglich.

4.3 Interaktionsmessungen von biotinyliertem mHSA mit gp120IIIB

Mit der *Surface Plasmon Resonance* (SPR)-Technik kann eine konzentrationsabhängige Bindungsstudie zwischen biologischen Molekülen in Echtzeit durchgeführt werden. Mit relativ geringem Ausgangsmaterial werden Informationen über die Bindung eines Moleküls an einen Partner und über die Kinetik einer Interaktion erhalten. So führten Wu, H. und Mitarbeiter (1996) Bindungsstudien durch, welche die Interaktion von rekombinanten sCD4 und D1D2 (CD4-Domäne 1 und 2) mit gp120 zeigten. Die Bindungskonstante K_D betrug $1,9 \times 10^8$ M (sCD4) und $1,8 \times 10^8$ M (D1D2).

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde eine konzentrationsabhängige Bindung zwischen dem HIV-Oberflächenprotein gp120IIIB und HOCl-modifiziertem HSA (mHSA 1:500) gezeigt, sowie eine Bindungskonstante von $K_D = 3 \times 10^{-8}$ M bestimmt (Voßmann, M., 2005). Zusätzlich wurden innerhalb dieser Arbeit Interaktionsmessungen mit den nach der neuen Methode hergestellten Inhibitoren mHSA, mBSA sowie mMSA 1:1000 und dem gp120IIIB durchgeführt (Kapitel 3.2). Neben einer konzentrationsabhängigen Bindung wurde die K_D der oxidierten Serumalbumine gemessen. Diese lag mit $7,6 \times 10^{-7}$ M (mBSA), $3,7 \times 10^{-8}$ M (mMSA) und $5,0 \times 10^{-8}$ M (mHSA) im Bereich der von Wu, H. und Mitarbeiter (1996) gemessenen gp120-CD4 (D1D2)-Interaktion.

Es traten allerdings Probleme bei der Kopplung der HOCl-modifizierten Proteine auf. So konnten die HOCl-modifizierten Serumalbumine nicht durch eine Aminkopplung auf einem CM5-Biosensor mit carboxymethylierter Dextranmatrix gebunden werden. Es erfolgte zuerst eine Kopplung des nativen Serumalbumins auf der Oberfläche des Biosensors. Das Albumin wurde, nachdem der Biosensor aus dem

System genommen wurde, mit einer HOCl-Lösung modifiziert. Dadurch kam es zu einem unerwünschten Abfall des (RU-) Signals um 50%, was auf eine Oxidierung des Liganden oder auf eine teilweise Zerstörung der Dextranmatrix schließen lässt. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die un stabile Oberfläche nach erfolgter HOCl-Behandlung, welche sich in einer unruhigen Grundlinie während der Messung widerspiegelt.

Es sollte herausgefunden werden, ob eine direkte Kopplung von mHSA möglich ist.

Durch die Reaktion von HOCl mit Serumalbumin findet eine Veränderung innerhalb des Proteins statt. So kann die hypochlorige Säure mit der Aminogruppe des α -C-Atoms von Aminosäuren zu einem instabilen Aminosäure-Chloramin reagieren, welches in ein Aldehyd, Ammoniumion, CO_2 und ein Chloridion zerfällt (Zgliczynski, J. M. *et al.*, 1968 und 1971; Klebanoff, S. J., 2005). Außerdem reagiert die hypochlorige Säure mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin und bildet ein instabiles Lysin-Chloramin. Die Stickstoff-Chlor-Bindung unterliegt dann einer Homolyse, welche zu einem N-Radikal führt (Hawkins, C. L. und Davies M. J., 1999). Neben der Veränderung durch eine Homolyse wurde vorgeschlagen, dass das Lysin-Chloramin einer Hydrolyse unterliegt. Dabei wird Ammoniak und ein Aldehyd gebildet.

Um zu untersuchen, wie groß die Modifikationen durch die hypochlorige Säure im mHSA 1:1000 ist, wurden kolorimetrische Tests zur Bestimmung des Anteils der Amino- und Carbonylgruppen durchgeführt (Kapitel 3.4.5.2 und 3.4.5.1). Es konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil freier Aminogruppen in Serumalbuminen mit steigendem HOCl-Überschuss abnahm und der Anteil der Carbonylgruppen zunahm. Folglich nimmt die negative Gesamtladung innerhalb HOCl-modifizierter Proteine zu.

Somit könnten die negativ geladenen funktionellen Gruppen des HOCl-modifizierten Serumalbumins die verbliebenen positiv geladenen Aminogruppen abschirmen und so eine Bindung an die carboxymethylierte Dextranmatrix verhindern.

Mit Heparin, einem auf Zelloberflächen vorkommenden sulfatisierten Polysaccharid, wurden von Moulard, M. und Mitarbeiter (2000) SPR-Bindungsstudien durchgeführt. Das Heparin ist durch seine Sulfatgruppen negativ geladen und gehört zu den Polyanionen. Für eine Immobilisierung auf einem SA-Biosensor, welcher auf seiner Oberfläche Streptavidin gebunden trug, biotinylierten sie das Heparin. Es wurde anschließend eine konzentrationsabhängige Bindungsstudien mit gp120_{HXBc2} durchgeführt, bei der eine Bindungskonstante von $5,5 \times 10^{-7}$ M gemessen wurde.

Für die angestrebten SPR-Untersuchungen wurde mHSA 1:1000 innerhalb dieser Arbeit erfolgreich mit Biotin über die Carboxylgruppen und über die verbliebenen primären Amine gekoppelt (Kapitel 3.3). Die antivirale Eigenschaft der biotinylierten Inhibitoren wurde im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Moulard, M. (2000), in einem HIV-1_{NL4-3wt}-Infektionstest überprüft (Kapitel 3.3.1). Durch die Biotinylierung blieb die antivirale Eigenschaft erhalten.

Das biotinylierte mHSA 1:1000 wurde erfolgreich auf einem Streptavidin-Biosensor gekoppelt. Die Bindungsstudie mit gp120IIIIB als Analyten ergab eine konzentrationsabhängige Bindung und eine Bindungskonstante von $>10^{-9}$ M (Kapitel 3.3.2).

Somit wurde eine Methode etabliert, die es erlaubte, HOCl-modifiziertes Serumalbumin direkt auf dem Biosensor zu koppeln. Durch die neue Methode kam es außerdem zu einer stabileren Messung und zu einem besseren Wert der Bindungskonstante. Das lässt den Schluss zu, dass der Ligand wesentlich stabiler auf der Biosensoroberfläche gebunden vorliegt und so eine verbesserte Messung möglich ist.

Der Vergleich mit der Bindungskonstante aus der Arbeitsgruppe um Moulard, M. zeigt außerdem, dass HOCl-modifiziertes Serumalbumin eine > 100 -fach höhere Affinität zum X4-tropen gp120 hat, als das Polyanion Heparin. Heparin wird in der Literatur als möglicher Adsorptions-Inhibitor diskutiert (Baba, M. *et al.*, 1988), welcher als Mikrobizid eingesetzt werden könnte (Balzarini, L. und Van Damme, L., 2005). Das sulfatisierte Polysaccharid bindet spezifisch an gp120 und hemmt die HIV-Infektion *in vitro* mit einer IC_{50} von 7 $\mu\text{g/ml}$ (Baba, M. *et al.*, 1988). Diese Werte wurden in dieser Arbeit mit den HOCl-modifizierten Proteinen ebenfalls erreicht (Kapitel 3.1.2; IC_{50} mHSA > 5 $\mu\text{g/ml}$). Somit ist mHSA mit Heparin vergleichbar und als weiterer Kandidat für ein Mikrobizid vorstellbar.

4.4 Untersuchungen von HOCl-induzierten Veränderungen in Proteinen mittels Aminosäurenanalyse

Aus der Literatur ergaben sich weitere Hinweise über die Auswirkungen von industriell hergestellter und mit dem MPO-H₂O₂-Cl₂-System gebildeter hypochloriger Säure auf Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. So machten Veröffentlichungen der letzten Jahre deutlich, dass einige funktionelle Gruppen bevorzugt durch die

hypochlorige Säure angegriffen werden (siehe unten). Um die Veränderungen der Aminosäurereste durch HOCl quantitativ erfassen zu können, wurde eine Aminosäurenanalyse in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Holst (FZ Borstel) durchgeführt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit einer steigenden HOCl-Konzentration die Aminosäuren Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Arginin innerhalb von HSA, BSA und MSA im Vergleich zu den verbliebenen Aminosäuren modifiziert wurden (Kapitel 3.4.5.3). Es wurden dabei ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 (mHSA, mBSA) bzw. 1:200 (mMSA) keine Tyrosine, Cysteine und Histidine mehr detektiert. Mit einem weiter ansteigenden HOCl-Überschuss nahm der Anteil des Phenylalanins ab.

Ab diesem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 (HSA und BSA) bzw. 1:200 (MSA) tritt erstmalig ein antiviraler Effekt im HIV-1_{NL4-3wt}-Infektionstest auf (Vergleiche Kapitel 3.1.4). Dieser nimmt mit einer höheren HOCl-Konzentration zu. Dahingegen zeigte eine Modifikation der Serumalbumine im Verhältnis 1:1 bis 1:50 (HSA und BSA) im Infektionstest keine signifikante Inhibition des HIV-1.

Daraus folgt, dass die Veränderungen innerhalb der Serumalbumine ab einem 100-fachen (HSA und BSA) bzw. 200-fachen HOCl-Überschuss verantwortlich für den inhibitorischen Effekt sind.

Somit wurde zum ersten Mal mit den Daten dieser Arbeit ein klarer Bezug zwischen der antiviralen Aktivität und der HOCl-induzierten Veränderung der Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin in Serumalbuminen gezeigt.

Welche Veränderungen werden durch HOCl an Cystein-, Histidin-, Tyrosin-, und Phenylalaninresten in Serumalbuminen induziert ?

Um diese Frage zu beantworten wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Es werden im Folgenden die Modifikationen durch die hypochlorige Säure in der Reihenfolge Aminosäure, Peptid und schließlich Protein genauer betrachtet, da mit einer zunehmenden Anzahl von Aminosäureresten die Komplexität und somit die Reaktionsmöglichkeiten zunehmen.

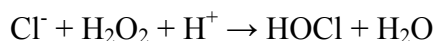
Cystein

Die Literaturrecherche ergab, dass die schwefelhaltige Aminosäure Cystein, neben Methionin mit einer Geschwindigkeitskonstante von $>10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ am „schnellsten“ von allen Aminosäuren mit der hypochlorigen Säure reagiert (Winterbourn, C. C., 1985; Armesto, X. L., 2000). Die Ergebnisse aus der Aminosäurenanalyse dieser Arbeit bestätigten die Reaktivität des Cysteins: Diese Aminosäure wurde in HSA, BSA und MSA als erste durch die hypochlorige Säure modifiziert (Kapitel 3.4.5.3; Abb. 3.23.-25.A).

Es stellte sich die Frage, welche Modifikationen in den Cysteinresten von HSA, BSA und MSA stattgefunden haben könnten.

Die Arbeitsgruppe um Pereira, W. E. (1973) konnte mittels Dünnschichtchromatographie zeigen, dass Cysteinsäure (RSO_3H) aus der Reaktion der Aminosäure Cystein mit hypochloriger Säure (Verhältnis 1:2) entsteht. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen konnte zusätzlich das instabile Zwischenprodukt Sulfenylchlorid (RCH_2SCl) detektiert werden (Fu, X. *et al.*, 2002), welches in weiteren Reaktionen mit Nukleophilen reagiert. So kann Cysteinsäure aus Sulfenylchlorid durch die Reaktion mit H_2O entstehen (Hawkins, C. L. *et al.*, 2003).

Daneben wurden Oxidationen von Drozd, R. und Mitarbeitern (1988) mithilfe der Myeloperoxidase (MPO) durchgeführt, welche die folgende Reaktion *in vivo* katalysiert (Harrison, J. E. und Schutz, J., 1976; Foote, C. S. *et al.*, 1983):



Mit einem MPO- H_2O_2 - Cl_2 -System, welches hypochlorige Säure produziert, und einem Cysteinderivat (Verhältnis 1,7:1), bei dem die Aminogruppe mit einem Acetylrest maskiert war, wurde auch das Reaktionsprodukt Cysteinsäure gebildet. Diese wurde mittels Papier- und Säulenchromatographie detektiert.

Bei einer Oxidation kann weiterhin aus zwei Cysteinen Cystin entstehen, welches erneut mit HOCl reagiert. Diese Reaktion wurde mit Acetyl-Cystin und dem MPO- H_2O_2 - Cl_2 -System im Verhältnis 1,7:1 gezeigt (Drozd, R. *et al.*, 1988). Auch hierbei wurde ein Sulfenylchlorid-Zwischenprodukt ($\text{RS}^+(\text{Cl})\text{SR}$) (Hawkins, C. L. *et al.*, 2003) und das Produkt Cysteinsäure nachgewiesen.

Die Aminosäurenanalyse, die in dieser Arbeit verwendet wurde, differenziert dahingegen nicht zwischen Cystein und Cystin, da Cystein meistens während des Prozesses der Analyse zu Cystin oxidiert und auch teilweise zerstört werden kann. Das Ergebnis der Aminosäurenanalyse gibt somit die relative Veränderung des

Cysteingehalts aus den modifizierten humanen Serumalbuminen gegenüber dem nicht-modifizierten HSA (Kontrolle) wieder. Diese spielt in diesem Zusammenhang eine größere Rolle als die absoluten Werte. Ein Nachteil der Methode ist, dass ein Disulfid und somit eine intra- bzw. intermolekulare Querverbindung nicht getrennt vom Cystein detektiert werden kann.

Die in dieser Arbeit gemessene fortschreitende Modifikation des Cysteingehalts mit einem steigenden HOCl-Überschuss kann durch eine Bildung von Cysteinsäure oder auch durch eine Bildung von Radikalen verursacht werden: Reagiert Sulfenylchlorid mit hypochloriger Säure, bildet sich ein Sulfenyl-Radikal (RS[•]) (Kalyanaraman, B., 1995; Shacter, E., 2000), welches weiterreagiert.

Dieses könnte die Beobachtungen aus der massenspektrometrischen Untersuchung (MALDI-TOF) der Arbeit von Kirst, M. (2004) und dieser Arbeit (nicht gezeigt) erklären: Mit Unterstützung von Herrn Dr. Clos wurden die von mir hergestellten Proben mHSA 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000 massenspektrometrisch untersucht. Es zeigte sich ein Massenpeak für HSA bei 66 kDa in den Proben mHSA 1:5 bis 1:50. Die Proben mHSA 1:100 und 1:1000 wiesen dahingegen keine auswertbaren Molekülpeaks auf. Somit ist eine fortschreitende Fragmentierung der Serumalbumine durch Radikale vorstellbar.

Mit zunehmender Größe der Proteine wird der Vorgang der HOCl-Modifikation komplexer, da mehrere funktionelle Gruppen für eine Reaktion zur Verfügung stehen. Bereits reduziertes Glutathion (GSH), bestehend aus den Aminosäureresten Glutamat, Cystein und Glycin, zeigt nach einer HOCl-Behandlung (Verhältnis 1:0,6) neben Glutathion-Disulfiden eine Veränderung im Amingehalt (Winterbourn, C. C. und Brennan, S. O., 1997). Es wurde mithilfe einer HPLC-Auftrennung und einem Standard gezeigt, dass Glutathion-Sulfonsäure als ein höheres Oxidationsprodukt auftritt. Bei einem HOCl-Überschuss kann weiterhin ein Sulfonylchlorid (-SO₂Cl) entstehen, welches mit Amingruppen Sulfonamide (RSO₂NHR) bilden kann. Diese Reaktion kann auch intramolekular erfolgen, so dass es zu einem Ringschluss kommt. (Winterbourn, C. C. und Brennan, S. O., 1997).

Die Versuche von Fu, X. und Mitarbeitern (2002) mit dem Peptid PFKCG und PFRCG zeigten, dass die ε-Aminogruppe des Lysinrestes bzw. die Guanidingruppe des Argininrestes intra- und intermolekular mit der Thiolgruppe des Cysteinrestes nach HOCl-Zugabe (Peptid:HOCl-Verhältnis = 1:0,5) reagiert. Es bilden sich Sulfenamide (RSNHR), Sulfinamide (RSONHR) und Sulfonamide, die mittels der Tandem

Massenspektrometrie nachgewiesen wurden. Daneben reagiert die α -Aminogruppe des Peptids PFVCG unter Quervernetzung mit der Thiolgruppe des Cysteins nach einer HOCl-Behandlung (Fu, X. *et al.*, 2002).

Für das HOCl-modifizierte Serumalbumin besteht also die Möglichkeit einer HOCl-induzierten intra- und intermolekularen Quervernetzung mittels S-S- und N-S-Bindung. Für diese Veränderung im mHSA spricht, dass im Silbergel (Kapitel 3.4.1) die diffuse HSA-Bande mit steigendem HOCl-Überschuss in einem höhermolekularen Bereich abgebildet wird.

Allerdings wird dieses erst ab einer Modifikation im molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:100 deutlich, während die Experimente von Winterbourn, C. C. und Brennan, S. O., (1997), sowie von Fu, X. und Mitarbeitern (2002) in einem Verhältnis von $\sim 1:1$ durchgeführt wurden. Dass die Zunahme des Molekulargewichts von mHSA erst ab einem 100-fachen molaren HOCl-Überschuss zu sehen ist, liegt vermutlich an der Proteingröße und der Anzahl der reaktiven Gruppen bzw. Cysteinreste. Bei den beschriebenen Experimenten handelt es sich um Peptide mit einem Mw von < 1 kDa mit je einem Cystein pro Molekül. Dem stehen 36 Cysteinreste im humanen Serumalbumin (~ 70 kDa) gegenüber, welches in dieser Arbeit verwendet wurden.

Für einen Vergleich der Ergebnisse aus dieser Arbeit bezüglich der HOCl-induzierten Veränderungen von Cysteinen in Serumalbuminen stehen in der Literatur nur wenige Veröffentlichungen mit ebenfalls höhermolekularen Proteinen zur Verfügung. Die Arbeitsgruppe von Raftery, M. J. und Mitarbeitern (2001) zeigte mit einem cytoplasmatischen Protein aus Neutrophilen (= S100A8, 10 kDa), dass die Cysteinreste nach einer HOCl-Modifikation mit Lysinresten Sulfinamide bilden. Es wurde das S100A8 und die hypochlorige Säure im Verhältnis 1:5 eingesetzt und nach einer HPLC-Auftrennung massenspektrometrisch untersucht.

Daneben stellten Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2000) mithilfe von Geschwindigkeitskonstanten ein Computermodell auf, welches die Reaktivität der Aminosäurereste mit steigender HOCl-Konzentration in verschiedenen Proteinen, wie HSA, kalkulierte. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden hierfür durch Reaktionen von freien Aminosäuren bzw. Derivaten mit HOCl bestimmt. Für Cystein wurde dabei die Geschwindigkeitskonstante indirekt über den Verbrauch von HOCl bestimmt (Winterbourn, C. C. 1985). Sie errechneten, dass die Aminosäurereste von HSA in der Reihenfolge wie in Abb. 4.1.B) dargestellt mit hypochloriger Säure reagieren.

A)



HSA: Cys > Tyr > His > Met > Phe > Arg

B)



HSA: Met > Cys >> Cystin ~ His ~ α -Amino > Trp

> Lys >> Tyr ~ Arg ~ Amidbindung (Aminosäurerückgrat) >> Gln ~ Asn

Abb. 4.1: Übersicht über die Reaktivität von Aminosäuren bei einer steigenden Konzentration HOCl. **A)** Dargestellt sind die Daten dieser Arbeit. Es wurde das HSA mit einem 1- bis 1000-fachen HOCl-Überschuss modifiziert. **B)** Dargestellt sind die Daten von Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2000). Es wurde eine Proteinmodifikation mit einem 0,16- bis 170-fachen molaren HOCl-Überschuss kalkuliert.

Nach diesem Modell reagiert Methionin noch vor Cystein mit HOCl. Die Aminosäurenanalyse aus dieser Arbeit zeigt dahingegen deutlich, dass die hypochlorige Säure im HSA zuerst die Aminosäure Cystein und erst nach einer Modifizierung von Tyrosin und Histidin das Methionin angreift.

In dem Modell von Pattison, D. I. und Davies, M. J. ist ein Grossteil der Cysteine in einem molaren HSA:HOCl-Verhältnis von 1:4 verbraucht. Die Cystine ab einem Verhältnis von 1:70. Die Aminosäurenanalyse aus dieser Arbeit ergab, dass in einem HSA:HOCl-Verhältnis von 1:5 noch ~70% Cystein- bzw. Cystinreste detektierbar sind. Es wurden keine Cystein- bzw. Cystinreste in der Aminosäurenanalyse ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:50 gemessen. Zusätzlich wurde mit einem kolorimetrischer Test (Kapitel 3.4.4) in dieser Arbeit gezeigt, dass die freien Thiolgruppen ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0,4 nicht mehr messbar sind.

Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit, mit denen des errechneten Modells von Pattison, D. I. und Davies, M. J. vergleichbar: Die Cysteine oxidieren bereits ab einem Protein:HOCl-Verhältnis von 1:0,4. Es können sich Cystine bilden bzw. die vorhandenen werden mit einem 50-fachen HOCl-Überschuss modifiziert. Bei dieser

Reaktion können Sulfenylchloride, Sulfensäuren, Sulfinsäuren und Sulfonsäuren (Cysteinsäuren) entstehen. Mit Amingruppen können weiterhin Cysteine zu Sulfenamiden, Sulfinamiden und Sulfonamiden oxidieren. Dabei könnte neben einer Veränderung der Tertiärstruktur durch Ab- und Aufbau von Disulfidbrücken und intra- bzw. intermolekularen Quervernetzungen die negative Ladung durch Bildung von Säuren zunehmen. Diese Veränderungen würden sich auf die Gesamtladung bzw. die Struktur der Serumalbumine deutlich auswirken, da z.B. HSA 36 Cysteinreste besitzt und somit 5% der vorhandenen Aminosäuren ausmacht.

Histidin

Verglichen mit dem Cystein gibt es wenige Untersuchungen über eine Modifizierung von Histidin mit hypochloriger Säure:

Bei einer HOCl-Modifikation von Histidin entstehen in erster Linie kurzlebige Chloramine. Diese werden zum Einen durch eine Chlorierung der α -Aminogruppe und zum Anderen des Imidazolringes gebildet (Pattison, D. I. und Davies, M. J., 2001). Die Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Reaktionen besitzen den gleichen Wert ($1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Nachgewiesen wurden die Histidin-Chloramine mittels massenspektrometrischer Untersuchungen nach einer Reaktion von hypochloriger Säure und Aminen im Verhältnis 1:5 (Pattison, D. I. und Davies, M. J., 2006). Die Instabilität des Chloramins der Aminosäure Histidin wurde durch einen kolorimetrischen Test nach einer HOCl-Oxidierung im Histidin:HOCl-Verhältnis von 1:0,5 gezeigt (Pattison, D. I. und Davies, M. J., 2006).

Das Chloramin kann sein Chlor auf benachbarte funktionelle Gruppen transferieren (Lewisch, S. A. und Levine, R. L., 1995; Hawkins, C. L. *et al.*, 2003). Durch die Übertragung auf einen Lysinrest wird ein stabileres Chloramin gebildet und Histidin regeneriert (Hawkins, C. L. *et al.*, 2003). Ferner kann ein Chlortransfer via Homolyse der N-Cl-Bindung mit darauf folgendem Chlorangriff auf die Tyrosinseitenkette stattfinden (Domingan *et al.*, 1995).

Da sich der Lysingehalt der Serumalbumine laut der Aminosäurenanalyse dieser Arbeit nicht signifikant veränderte, kann eine Übertragung des Chloratoms auf die Lysinreste ausgeschlossen werden. Dahingegen ist ein Transfer des Chloratoms auf die Tyrosinseitenkette denkbar, da sich der Tyrosingehalt mit zunehmenden HOCl-Überschuss verändert (Vergleiche auch Abschnitt Tyrosin).

Allerdings kann das Chloramin auch zu einem Carbonylprodukt (2-Oxo-Histidin) weiter reagieren (Lewisch, S. A. und Levine, R. L., 1995; Hawkins, C. L. *et al.*, 2003).

Für diese Reaktion zum 2-Oxohistidin spricht, dass im kolorimetrischen Test (Kapitel 3.4.5.1) ein Anstieg des Carbonylgruppengehalts der HOCl-modifizierten Proteine gemessen wurde.

Allerdings zeigten Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2006), dass der Angriff der hypochlorigen Säure auf Histidin und die Bildung von Chloramin bzw. 2-Oxohistidin strukturabhängig ist: So besitzt das Histamin ähnlich dem Histidin einen Imidazolring und eine relativ unreaktive Aminogruppe. Nach einer HOCl-Behandlung beträgt die Ausbeute des Imidazol-Chloramins 95%. Wird die Aminosäure Histidin verwendet, beträgt die Ausbeute 50% und mit dem Peptid Gly-His und Gly-Gly-His < 20% Imidazol-Chloramin. Es wurde von Pattison, D. I. und Davies, M. J., (2006) gezeigt, dass bei dem Peptid Gly-Gly-His die α -Aminogruppe verglichen mit dem Imidazolring schnell zum Chloramin reagiert. Somit ist denkbar, dass die Umwandlung des Histidins zum 2-Oxohistidin einen Teil der gemessenen Carbonylgruppen ausmacht, aber auch andere zu Verfügung stehende freie Aminogruppen für eine Umwandlung zum Aldehyd verwendet werden.

Mit Imidazolessigsäure-Chloramin (IAACl), einem Histidin-Chloraminderivat, wurde gezeigt, was durch eine sekundäre Oxidation einem Aminosäurerückgrat bzw. einer Amidbindung passieren kann. Die Inkubation von IAACl mit einem zyklischen Dipeptid, dem Cyclo-(Gly)₂, zeigte, dass Chloramide entstehen (Pattison, D. I. und Davies, M. J., 2001, photometrische Messungen). Mithilfe des oben beschriebenen computergestützten Modells errechneten Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2001) daneben auch einen HOCl-Angriff auf das Aminosäurerückgrat des humanen Serumalbumins und somit einen Angriff auf die Proteinintegrität ab einem 67-fachen HOCl-Überschuss.

Eine sekundäre Oxidation von Amidbindungen durch Histidin-Chloramin ist deshalb auch in den HOCl-modifizierten Serumalbuminen vorstellbar. Dafür spricht, dass im Silbergel aus dem Kapitel 3.4.1 mit zunehmender HOCl-Konzentration eine Proteindegradierung der Serumalbumine beobachtet wurde. Allerdings beginnt diese bereits mit einem 5-fachen HOCl-Überschuss und nicht, wie von Pattison, D. I. und Davies, M. J. vorgeschlagen, mit einen 67-fachen HOCl-Überschuss.

Gegen einen signifikanten Abbau der Amidbindungen spricht der in dieser Arbeit durchgeführte Proteinase K-Verdau von mHSA 1:1000 (Kapitel 3.4.2). Das Enzym hydrolysiert die Peptidbindungen an der Carboxylseite der Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit zunehmender Enzymkonzentration vorhandene Amidbindungen hydrolysiert wurden (siehe Silbergel, Kapitel 3.4.2).

Die im Silbergel beobachtete Fragmentierung wird deshalb nicht alleine durch einen Abbau der Amidbindungen zustande gekommen sein. So könnte die Bildung von Radikalen, wie sie bereits bei den Cysteinen beschrieben wurde, zu einer Fragmentierung des Proteins führen.

Tatsächlich wurde auch eine Radikalbildung am Imidazol durch die hypochlorige Säure mittels Elektrosinresonanz (ESR)-Spektroskopie gemessen (Hawkins, C. L. und Davies, M. J., 1998). Die Entstehung von Radikalen wurde bei einem Histidin:HOCl-Verhältnis von 1:0,1 untersucht. Somit könnte die Bildung von Histidin-Radikalen zu einer Fragmentierung des Serumalbumins beitragen.

Welche Auswirkung die hypochlorige Säure auf die Histidinreste von HSA haben könnte, wurde mittels der Geschwindigkeitskonstante des Histidinderivats 4-Imidazolessigsäure simuliert (Pattison, D. I. und Davies, M. J., 2001). Es wurde berechnet, dass nach einer Modifikation der Methionine und Cystein, die Cystine und Histidine fast gleichzeitig angegriffen werden (Abb.4.1.B). Somit sollte nach diesem Modell eine Veränderung des Histidingehalts im HSA bei einem HOCl-Überschuss von 1:70 stattfinden. Diese Berechnung stimmt mit den Ergebnissen der Aminosäureanalyse überein. Das mHSA 1:100 wies als erstes Serumalbumin eine komplette Veränderung des Histidinanteils auf (Abb.3.23.E).

Phenylalanin

Die Daten dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass nach einer Veränderung des Cystein-, Tyrosin- und Histidingehalts der Angriff durch HOCl auf das Phenylalanin stattfindet (Abb.3.23-25.C). Dabei wurde eine Modifikation des Phenylalaninrestes in Serumalbuminen ab einem 100-fachen HOCl-Überschuss gemessen. Folglich korreliert eine Veränderung des Phenylalaningehalts in Serumalbuminen mit einer Zunahme der inhibitorischen Eigenschaft.

Es stellte sich die Frage, welche Hauptprodukte durch eine HOCl-Behandlung entstehen.

Hawkins, C. L. und Davies, M. J., 1998 zeigten mithilfe von ESR-Studien, dass nach einer HOCl-Behandlung im Phenylalanin:HOCl-Verhältnis von 1:0,1 Radikale gebildet werden. Dabei kommt es innerhalb der Aminosäure zur Abspaltung der aromatischen Gruppe und zur Bildung eines Benzyl-Radikals, welches weiterreagieren kann.

Die Fragmente, die durch die HOCl-Behandlung der Serumalbumine entstanden sind, und im Silbergel (Kapitel 3.4.1) gezeigt wurden, könnten somit ab einem 100-fachen HOCl-Überschuss auch durch Phenylalanin-Radikale entstanden sein.

Weiterhin wurde nach einer Modifikation der Aminosäure Phenylalanin im Aminosäure:HOCl-Verhältnis von 1:2 und pH 3,5 Phenylacetonitril (95%; $C_6H_5-CH_2=CN$) mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie nachgewiesen (Pereira, W. E. 1973). Allerdings wiesen Pereira, W. E. *et al.* (1973) darauf hin, dass die hohe Ausbeute an Nitrilen durch den niedrigen pH-Wert verursacht sein könnte. Da in dieser Arbeit die Proteine bei einem pH-Wert von 7,4 modifiziert wurden, ist es wahrscheinlich, dass ein wesentlich geringerer Anteil an Nitrilen vorliegt.

Das von Pereira, W. E. *et al.* (1973) zusätzlich nachgewiesene Phenylacetaldehyd (5%; $C_6H_5-CH_2CHO$) könnte für die Veränderung des Phenylalaningehalts (Abb.3.23-25.C) und für den hohen Carbonylgruppengehalt (Kapitel 3.4.5.1) mitverantwortlich sein.

Von Bergt, C. und Mitarbeitern (2000) wurden Untersuchungen bezüglich einer Modifikation von Phenylalaninresten in Proteinen durchgeführt. Sie modifizierten das Apolipoprotein A-I (Apo A-I, 27 kDa) und zeigten, dass der Phenylalaninrest auch chloriert werden kann (Bergt, C. *et al.*, 2000). Das Apo A-I stellt das Hauptziel in HDL (*high-density lipoprotein*)-Partikeln während der Proteinoxidation *in vivo* dar (Malle, E. *et al.*, 2006). Im intakten Zustand transportiert das HDL überschüssiges Cholesterin von den Arterienwänden zur Leber und schützt so vor Gefäßkrankheiten. Für den Nachweis wurde Apo A-I hydrolysiert und die Phenylalanin-enthaltenden Peptide (u.a. LLDNWDSVTSTFESK) mit einem 4-fachen HOCl-Überschuss modifiziert. Eine Aminosäureanalyse zeigte einen kompletten Verlust des Phenylalaninrestes und eine massenspektrometrische Untersuchung die Bildung von 4-Chloro- bzw. 2- oder 3-Chloro-Phenylalanin (Bergt, C. *et al.*, 2000).

Somit stellt das Chloro-Phenylalanin vermutlich neben den Phenylalanin-Radikalen das Hauptprodukt nach einer HOCl-Modifikation von Phenylalaninresten in Proteinen dar.

Pattison, D. I. und Davies, M. J. (2001) versuchten die Veränderungen des Phenylalaningehalts im HSA vorherzusagen. Hierfür sollte bei der Umsetzung eines Phenylalaninderivats mit HOCl eine Geschwindigkeitskonstante gemessen werden, mit deren Hilfe die Veränderung im HSA rechnergestützt simuliert werden könnte. Für die kinetische Untersuchung wurde das Phenylalaninderivat 3-Phenylpropionsäure verwendet, welchem eine Aminogruppe fehlt. Am Photometer konnte keine Abnahme der hypochlorigen Säure während einer 15-stündigen Inkubation mit dem Derivat beobachtet werden (3-Phenylpropionsäure:HOCl-Verhältnis = 1:0,5). Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse dieser Arbeit zeigten hingegen, dass eine Modifizierung des Phenylalanins stattfindet. Somit war entweder die von Pattison, D. I. und Davies, M. J. eingesetzte HOCl-Konzentration zu niedrig oder die 3-Phenylpropionsäure für eine Modifizierung nicht geeignet.

Tyrosin

Die Berechnung von Pattison, D. I. und Davies, M. (2001) bezüglich einer Tyrosinmodifizierung durch HOCl in HSA ließen den Schluss zu, dass sich ab einem HSA:HOCl-Verhältnis von $> 1:100$ der Anteil der Tyrosinreste verändert. Die Daten dieser Arbeit zeigten hingegen deutlich, dass der Tyrosinanteil im HSA, BSA und MSA bereits ab einem Verhältnis $> 1:5$ durch die hypochlorige Säure modifiziert wird und ab einem Verhältnis $> 1:100$ keine unveränderten Tyrosinreste mehr detektiert wurden (Aminosäurenanalyse, Abb.3.23-25.D). Pattison, D. I. und Davies, M. bestimmten für ihr Modell die Geschwindigkeitskonstante eines Tyrosinderivats (3-[4-Hydroxyphenyl]-propionsäure), welches zu 3-Cl-(3-[4-Hydroxyphenyl]propionsäure) umgewandelt wurde. Es wird deutlich, dass die HOCl-Modifizierung von Aminosäuren bzw. ihren Derivaten und die daraus gemessene Geschwindigkeitskonstante nicht unbedingt auf die Modifizierung von Aminosäureresten in einem komplexen Protein wie dem HSA übertragen werden kann.

Welche Modifikationen könnten nun zu einer Abnahme des Tyrosingehalts in HSA, BSA und MSA führen ?

Die Oxidation von Tyrosin wird häufig im Zusammenhang mit einer HOCl-Modifizierung durch die Myeloperoxidase beschrieben (Domigan, N. M. *et al.*, 1995; Hawkins, C. L. *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang stellt das Tyrosin eines der am besten charakterisierten HOCl-modifizierten Aminosäuren dar, welches als 3-

Chlorotyrosin ein spezifischer Marker für MPO-katalysierte Reaktionen darstellt (Podrez, E. A. *et al.*, 2000).

Erstmalig wurde 3-Chlorotyrosin neben 3,5-Dichlorotyrosin als Produkt der Aminosäure Tyrosin nach einer HOCl-Modifizierung (1:1) durch Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS) nachgewiesen (Pereira, W. E. *et al.*, 1973; Fu, S. *et al.*, 2000).

Neben dem Phenolring stellt auch die α -Aminogruppe eine Angriffstelle dar. Dabei bildet sich zum Einen bei einem niedrigen pH-Wert ein Nitril (R-CN) (Pereira, W. E. *et al.*, 1973) und zum Anderen ein amphipatisches p-Hydroxyphenylacetaldehyd (pHA) (Pereira, W. E. *et al.*, 1973; Fu, S. *et al.*, 2000). Das pHA wiederum reagiert mit HOCl zum 3-Chloro-4-Hydroxyphenylacetaldehyd und 3,5-Dichloro-4-Hydroxyphenylacetaldehyd. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte nach einer Inkubation der Aminosäure Tyrosin mit hypochloriger Säure im Verhältnis 1:0,5 mittels HPLC (Fu, S. *et al.*, 2000).

Außerdem wurde herausgefunden, dass die Aminosäure Tyrosin, welche mit dem MPO-H₂O₂-Cl₂-System inkubiert wurde, zum Tyrosinradikal umgewandelt wird (Jacob, J. S. *et al.*, 1996; Giulivi, C. *et al.*, 2003). Dieses reagiert weiter zu Dityrosinen und Tirtyrosinen. Daneben werden durch die Tyrosylradikale Isodityrosin und Pulcherosin gebildet. Die Oxidationsprodukte wurden für diesen Versuch durch eine HPLC getrennt und anschließend mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Spektroskopie und MS analysiert.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Veränderung des Tyrosinanteils in Serumalbuminen kann somit durch eine Chlorierung des Phenolringes zustande kommen. Da mit einem größeren HOCl-Überschuss als in den beschriebenen Versuchen gearbeitet wurde, kann auch eine Reaktion zum Dichlorotyrosin stattfinden. Daneben ist eine Radikalbildung mit einem anschließenden Angriff auf weitere Tyrosin- bzw. Aminosäurerestereste denkbar. Die Modifizierung der α -Aminogruppe zum p-Hydroxyphenylacetaldehyd kann dahingegen erst nach einer Hydrolyse der Amidbindung stattfinden. Eine Zunahme des Gehalts an Carbonylgruppen spricht für eine Umwandlung der α -Aminogruppe zum p-Hydroxyphenylacetaldehyde.

Das p-Hydroxyphenylacetaldehyde in aufgereinigter Form reagiert wiederum mit N ^{α} -Acetyllysin unter Schiff'scher Basenbildung zum N ^{ϵ} -(2-[p-Hydroxyphenyl]-ethyl)lysin (pHA-Lysin), welches durch ¹H NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert wurde (Hazen, S. L., 1997). Das N ^{α} -Acetyllysin stellt

ein Analogon des Lysinrestes in Peptiden oder Proteinen dar. Der Lysinrest kann für intra- bzw. intermolekulare Vernetzungen verantwortlich sein (Hazen, S. L., 1997).

Somit besteht auch für Serumalbumine die Möglichkeit einer Quervernetzung über Tyrosinreste. Dagegen spricht, dass sich der Gehalt an Lysinresten nicht signifikant verändert (Aminosäurenanalyse, Kapitel 3.4.5.3). Da sich hingegen der Anteil der Arginine nach einer HOCl-Behandlung verändert, wäre eine Reaktion mit der Guanidin-Gruppe denkbar. Allerdings würde diese Quervernetzung nur einen geringen Anteil ausmachen, da der Anteil der Tyrosine stärker abnimmt, als der Anteil der Arginine bei gleicher HOCl-Konzentration.

Nachgewiesen wurde die Chlorierung von Tyrosinresten auch in Peptiden. So wurde eine Zunahme des 3-Chlorotyrosins in den folgenden Peptiden in der Reihe: KPVGKKRRPVKVYP<RYLGYL<TYS<GGYR gemessen (Domigan, N. M. *et al.*, 1995). Die Untersuchungen erfolgten durch Aminosäureanalysen und MS, nachdem die Peptide im molaren Verhältnis von 1:1 mit HOCl modifiziert worden sind. Weiterhin wurde von Domigan, N. M. und Mitarbeitern gezeigt, dass die Chlorgruppe im Peptid GGYR am Tyrosinrest und nicht am Argininrest bindet. Hierfür wurde das Peptid zum Einen mit dem Enzym Thermolysin, welches die Glycin-Tyrosin-Bindung schneidet, und zum Anderen mit Chymotrypsin A4, welches den C-terminalen Argininrest entfernt, verdaut und massenspektrometrisch untersucht.

Dahingegen wurde innerhalb dieser Arbeit (Kapitel 3.4.5.2) eine Veränderung des Arginingehalts in den Serumalbuminen ab einem Protein:HOCl-Verhältnis >1:200 gemessen. Somit könnte der HOCl-Gehalt bei Domigan, N. M. und Mitarbeitern zu niedrig für eine Argininmodifizierung gewesen sein.

Außerdem wurde neben der direkten Ringchlorierung, eine Chlorierung über Chloramine aus der Nachbarschaft des Tyrosinrestes genannt (Domigan, N. M. *et al.*, 1995; Bergt, C. *et al.*, 2004; Vergleiche Abschnitt Histidin). Massenspektrometrische Untersuchungen mit synthetisch hergestellten Peptiden die einer HOCl-Modifikation unterlagen führten zu dem Ergebnis, dass wenn ein Tyr-X-X-Lys-Motif vorliegt (X = nichtreaktive Aminosäure), zuerst ein Chloratom auf ein Lysinrest übergeht und in einem zweiten Schritt Chlorotyrosin gebildet wird (Bergt, C. *et al.*, 2004). Auch in humanem Serumalbumin liegt das Tyr-X-X-Lys-Motif vor: ⁵¹⁹ETYVPKEFN. Die beiden nichtreaktiven Aminosäurereste werden durch das Valin und Prolin dargestellt. Beide Aminosäuren bleiben bis zu einem 1000-fachen HOCl-Überschuss unverändert (Aminosäurenanalyse, Kapitel 3.4.5.3). Somit könnte, wie von Bergt, C. und

Mitarbeitern gezeigt, der Lysinrest durch Abgabe des Chloratoms an den Tyrosinrest regeneriert werden.

Aber auch innerhalb von Proteinen wurde eine Chlorierung der Tyrosinreste beobachtet. Für diese Chlorierung, so wird vermutet, ist die Myeloperoxidase verantwortlich, die *in vivo* HOCl bildet.

So wurde in den LDL (*low density lipoprotein*)-Partikeln, welche das Apolipoprotein B-100 tragen, das Chlorotyrosin mittels GC/MC nachgewiesen (Hazen, S. L und Heinecke, J. W., 1997). Dabei wurde festgestellt, dass in den LDL-Partikeln der atherosklerotischen Intima ein 30-fach höherer 3-Chlorotyrosingehalt vorkommt, als in den freien LDL-Partikeln des Blutes. Das 3-Chlorotyrosin ist somit ein Indikator für eine oxidative Veränderung, welche zur Atherosklerosis führen kann (Hazen, S. L. und Heinecke, J. W., 1997).

Weiterhin wurde 3-Chlorotyrosin in HDL-Partikeln aus Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten nachgewiesen (Shao, B. *et al.*, 2006) und im Gehirngewebe von Alzheimerpatienten (Green, P. S. *et al.*, 2004). Bei letzteren wurde im Vergleich zur Kontrolle eine 3-fach höhere 3-Chlorotyrosin-Konzentration gemessen. Aber auch Dichlorotyrosin wurde detektiert. Daneben wurde 3-Chlorotyrosin in einem Parkinson-Mausmodell nachgewiesen (Choi, D. K., *et al.*, 2005).

Letztendlich zeigte Kettle, A. J., (1995) mittels HPLC, dass im HSA mit hypochloriger Säure 3-Chlorotyrosin gebildet wird. Hinzukommt, dass die gebildeten Chlorotyrosine sehr stabil sind (Hazen, S. L. und Heinecke, J. W., 1997).

Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass in den in dieser Arbeit hergestellten HOCl-modifizierten Serumalbuminen durch eine Modifikation von Tyrosin das stabile 3-Chlorotyrosin gebildet wird. Allerdings ist eine weitere Oxidierung des 3-Chlorotyrosins denkbar, da für die Entstehung eines antiviralen Effekts weit größere HOCl-Konzentrationen eingesetzt werden, als z.B. in dem oben beschriebenen Versuch von Kettle, A. J. (1995).

Gegen die Bildung von 3-Chlorotyrosin spricht, dass Salavej, P. und Mitarbeiter (2006) nach massenspektrometrischer Untersuchung von HOCl-modifiziertem HSA 1:25 keine durch Chlor verursachte Massenzunahme nachweisen konnten. Sie trypsinierten für die MS das modifizierte HSA und untersuchten die jeweiligen Fragmente.

Auch konnte mit der massenspektrometrischen Untersuchung dieser Arbeit (nicht gezeigt) sowie jener von Kirst, M. (2004) durchgeführten keine Aussage

bezüglich einer Zunahme der Masse durch Chloratome im mHSA 1:1 bis 1:50 getroffen werden.

Das nun der antivirale Effekt durch die sich verändernde Struktur des HSA entsteht, steht außer Frage. Auch, dass eine signifikante Modifikation des Tyrosinrestes in mHSA, mBSA und mMSA stattfindet. Es wurde deshalb ein Peptid modifiziert und auf seine antivirale Aktivität hin untersucht, welches einen signifikanten Anteil an Tyrosinresten besaß. Des Weiteren wurden synthetisch hergestellte HSA-Teilstrukturen mit einem großen Anteil reaktiver bzw. nichtreaktiver Aminosäurereste mit hypochloriger Säure behandelt.

4.5 Untersuchung von HOCl-modifizierten Peptiden

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit HSA-Teilstrukturen mit einem großen Anteil reaktiver bzw. nichtreaktiver Aminosäurereste synthetisch hergestellt und mit hypochloriger Säure modifiziert. Der Versuch zeigte, dass selbst Peptide mit nichtreaktiven Aminosäureresten bei einem Peptid:HOCl-Verhältnis von 1:1000 und 1:100 stark oxidiert werden. Ein experimenteller Nachweis verbliebener Peptidstrukturen war nicht möglich (vgl. Kapitel 3.4.6.2). Es ist denkbar, dass die Oxidation des Peptids mit einem hohen Anteil nichtreaktiver Aminosäuren über α -Aminogruppen und Amidbindungen stattfand. Die Peptide waren mit einem Mw von ~ 3 kDa für eine HOCl-Modifikation bei diesen Konzentrationen und einer anschließenden Aufreinigung nicht geeignet.

Für ein weiteres Experiment, mit dem die Bedeutung des Tyrosinrestes untersucht werden sollte, wurde ein 23 kDa-Polymer (Poly[Glu,Lys,Tyr]) verwendet (Kapitel 3.4.6.1). Das Poly(Glu,Lys,Tyr) besaß, mit einem Aminosäureverhältnis von 6:3:1, einen 90%igen Anteil nichtreaktiver (Glu und Lys) und einen 10%igen Anteil reaktiver Aminosäurereste (Tyrosin). Die Aufreinigung des mit einem 1000-fachen HOCl-Überschuss modifizierten Poly(Glu,Lys,Tyr) verlief erfolgreich. Anschließend wurde mithilfe eines HIV-1_{NL4-3wt}-Infektionstests gezeigt, dass sich ein antiviraler Effekt herstellen lässt ($IC_{50} > 80 \mu\text{g/ml}$).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass Tyrosin für den antiviralen Effekt mitverantwortlich sein kann. Außerdem wurde gezeigt, dass mit einem HOCl-modifizierten Peptid ein antiviraler Effekt *in vitro* induziert werden kann, auch wenn

das Peptid ein niedrigeres Molekulargewicht und eine geringere Komplexität als Albumin besitzt.

Daneben konnte gezeigt werden, dass trotz hohen Lysinanteils im Peptid (30%) der antivirale Effekt nach einer HOCl-Behandlung im Vergleich zu den höhermolekularen Proteinen nicht verstärkt wurde. Das humane Serumalbumin besitzt einen Lysinanteil von nur 10% und hat einen wesentlich größeren antiviralen Effekt (z.B. mBSA 1:1000; IC_{50} -Wert $> 3 \mu\text{g/ml}$; Kapitel 3.1.2).

Der Lysinrest wird in der Literatur oft als der Aminosäurerest in Proteinen genannt, welcher durch HOCl umgewandelt wird. Erste Vermutungen bezüglich der antiviralen Aktivität richteten sich somit auf eine HOCl-Modifizierung des Lysins. Diese Modifizierung konnte durch die Aminosäurenanalyse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Außerdem wurde durch die HOCl-Modifizierung von Poly(Glu,Lys,Tyr) gezeigt, dass ein großer Lysingehalt nicht zu einer erhöhten antiviralen Aktivität führt und somit nicht für den Effekt verantwortlich ist.

Ein Vergleich des stöchiometrischen Verhältnis von funktionellen Gruppen innerhalb von HSA (609 Aminosäuren/Protein) und Poly(Glu,Lys,Tyr) (209 Aminosäuren/Protein) zeigt, dass bei einer Modifizierung im molaren Protein:HOCl-Verhältnis von 1:1000 das Poly(Glu,Lys,Tyr) stärker durch HOCl angegriffen wird. Da Versuche mit einer steigenden Konzentration hypochloriger Säure (Kapitel 3.1.4) eine Zunahme der antiviralen Aktivität aufwiesen, war davon auszugehen, dass Poly(Glu,Lys,Tyr) 1:1000 einen mindestens so hohen IC_{50} -Wert im HIV-1_{NL4-3wt}-Infektionstest zeigte wie z.B. mBSA 1:1000.

Das mit dem HOCl-modifizierten Poly(Glu,Lys,Tyr) eine geringere antivirale Aktivität erreicht wurde, als mit dem HOCl-modifizierten Serumalbumin kann mehrere Ursachen haben.

So könnte der Tyrosinanteil mit 10% im Poly(Glu,Lys,Tyr) zu gering sein. Allerdings besitzen die Serumalbumine einen Tyrosingehalt von nur $\sim 3\%$. Somit ist denkbar, dass neben den Tyrosinresten andere reaktive Aminosäurereste für den antiviralen Effekt im HSA verantwortlich sind. Hierfür würden die bereits oben diskutierten Aminosäurereste Cystein, Histidin und Phenylalanin in Frage kommen. Betrachtet man die genannten reaktiven Aminosäurereste im Serumalbumin, so zeigt sich, dass diese einen Anteil von $\sim 17\%$ ausmachen. Somit steht im HSA, BSA und MSA ein größerer Anteil funktioneller Gruppen für eine Modifizierung zur Verfügung.

Daneben könnte auch die geringere Anzahl der modifizierbaren Amidbindungen eine Ursache für die größere IC_{50} des Poly(Glu,Lys,Tyr) sein. So korreliert die antivirale Aktivität mit der Anzahl der Amidbindungen.

Diese Ergebnisse könnten Anstoß für weitere Experimente geben, bei denen eine HOCl-Modifizierung von Peptiden stattfindet, die z.B. einen höheren Tyrosingehalt oder zusätzlich einen Cystein-, Histidin- oder Phenylalaninanteil besitzen.

Ferner könnten Peptide die aus Glycin- bzw. Alaninresten bestehen nach einer HOCl-Modifizierung Aufschluss über die Rolle der modifizierbaren Peptidbindungen geben.

Außerdem sollte der Fokus auf die chemische Struktur des Inhibitors gelegt werden. Es konnte innerhalb dieser Arbeit mittels Proteinase K gezeigt werden, dass nach einer HOCl-Modifizierung von HSA verbliebene intakte Amidbindungen verdaut werden konnten. Eine massenspektrometrische Untersuchung mit enzymverdaulichem HSA, sowie Kernspinresonanz-Spektroskopie könnte einen weiteren Einblick in die Modifizierung von Serumalbuminen durch die hypochlorige Säure geben.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig HOCl-modifiziertes HSA, BSA und MSA (mHSA, mBSA und mMSA) im technischen Maßstab mithilfe des Hohlfasersystems hergestellt. Mit diesem System kann bei einer potentiell therapeutischen Anwendung der Inhibitor in noch größeren Mengen produziert werden. Die relativen IC_{50} -Werte der so hergestellten HOCl-modifizierten Serumalbumine wurden mithilfe eines HIV_{NL4-3wt}-Infektionstest und dem Programm GraphPad Prism (Fa. GraphPad Software) bestimmt (mHSA 1:1000 > 5 µg/ml, mBSA 1:1000 > 3 µg/ml und mMSA 1:1000 > 20 µg/ml). Dass die antivirale Aktivität dieser Proteine nicht durch einen zelltoxischen Effekt verursacht wird, wurde durch einen Zellvitalitätstest gezeigt. Die Vitalität von HeLaP4-Zellen blieb bis zu einer Konzentration von 400 µg/ml mHSA und mBSA 1:1000 bzw. > 200 µg/ml mMSA 1:1000 erhalten.

Zusätzlich wurde eine alternative Lagerung des Inhibitors etabliert, bei welcher die Proteine getrocknet wurden.

Für *Surface Plasmon Resonance*-(SPR)-Bindungsstudien, die zeigten, dass der Inhibitor an das HIV-Oberflächenprotein gp120 bindet, wurde mHSA 1:1000 erstmalig biotinyliert. Der biotinylierte Inhibitor wurde im Gegensatz zur vorherigen Methode direkt auf einem Biosensor immobilisiert, wodurch es zu einer stabileren Messung und zu einem verbesserten Wert der Bindungskonstante ($K_D > 10^{-9}$ M) kam.

Zusätzlich wurde mit den Daten dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass die antivirale Aktivität des Inhibitors mit einer Veränderung der Aminosäurereste einhergeht. Es wurden kolorimetrische Tests durchgeführt, durch die eine HOCl-induzierte Abnahme des Aminogruppen (NH_2)- und Thiolgruppengehalts (-SH), sowie eine Zunahme des Carbonylgruppengehalts (-CO) in Proteinen gemessen wurde. Eine Abnahme des NH_2 -Gehalts führt zu einer Abnahme der positiven Gesamtladung. Durch die HOCl-Oxidation von -CO und -SH wiederum können negativ geladene Carboxyl- und Sulfonylgruppen entstehen.

Eine Aminosäurenanalyse in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Borstel von mHSA, mBSA und mMSA 1:1 bis 1:1000 zeigte außerdem, dass der Anteil der Aminosäuren in der Reihenfolge Cys > Tyr > His > Met > Phe > Arg durch HOCl modifiziert wird. Durch die Modifizierung von Poly(Glu,Lys,Tyr) wurde weiterhin die Rolle des Tyrosins bei der Bildung des antiviralen Effekts deutlich, da der Tyrosinrest im Poly(Glu,Lys,Tyr) der einzige reaktive Aminosäurerest ist.

6 Literatur

Aldovini, A., and Walker, B. D. (1990) Techniques in HIV research. M Stockton Press
1. Auflage S. 77

Andrews, P. C., and Krinsky, N. I. (1981) The reductive cleavage of myeloperoxidase
in half, producing enzymatically active hemi-myeloperoxidase. J. Biol. Chem. 256 S.
4211-4218

Balzarini, J., Holy, A., Jindrich J., Naesens, L., Snoeck, R., Schols, D., and De Clercq,
E. (1993) Differential Antiherpesvirus and Antiretrovirus Effects of the (S) and (R)
Enantiomers of Acyclic Nucleoside Phosphonates: Potent and Selective *In vitro* and *In*
Vivo Antiretrovirus Activities of (R)-9-(2-Phosphonomethoxypropyl)-2,6-
Diaminopurine. Antimicrob. Agents Chemother. 37(2) S. 332-338

Barré-Sinoussi, F., Herman, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, T.,
Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezin-Brun, F., Routioux, C., Rosenbaum, W., and
Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient with risk
of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220 S. 868-871

Bainton, D. F., Ullyot, J. L., and Farquhar, M. G. (1971) The development of
neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow. J. Exp. Med. 134 S.
907-934

Berger, E. A. Doms, R. W. Fenyo, E. M., Korber, B. T., Litman, D. R. Moore, J. P.,
Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R. A. (1998) A new
classification for HIV-1. Nature 391 (6664) S.240

Bergt, C., Oettl, K., Keller, W., Andreae, F., Leis, H. J., Malle, E., and Sattler, W.
(2000) Reagent of myeloperoxidase-generated hypochlorite affects discrete regions in
lipid-free and lipid-associated human apolipoprotein A-I. Biochem. J. 346 S. 345-354

Binley, J. M., Ngo-Abdalla, S., Moore, P., Bobardt, M., Chatterji, U., Gallay, P.,
Burton, D. R., Wilson, I. A., Elder, J. H., and de Parseval, A. (2006) Inhibition of HIV

Env binding to cellular receptors by monoclonal antibody 2G12 as probed by Fc-tagged gp120. *Retrovirology* 3(39) S. 1-15

Blair, W. S., Lin, P.-F., Meanwell, N. A., and Wallace, O. B. (2000) HIV-1 entry an expanding portal for drug discovery. *DDT* 5 S. 183-193

Borregaard, N., Jensen, H. S., and Bjerrum, O. W. (1987) Prevention of tissue damage: inhibition of myeloperoxidase mediated inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by N-acetyl cysteine, glutathione, and methionine. *Agents Actions*. 22(3-4) S. 255-260.

Cann A. J., Churcher, M. J., Boyed, M., O'Brien, W., Zhao, J. Q., Zack, J., and Chen, I. S. (1992) The region of the envelope gene of human immuno-deficiency virus type I responsible for determination of cell tropism. *J. Virol.* 66 S. 305-309

Capozzi, G., and Modena, G. (1974) *The Chemistry of the Thiol Groups* (Patai, S.) Part 2 John Wiley & Sons, London S. 785-839

Carr, A. C., McCall, M. R., and Frei, B. (2000) Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive nitrogen Species. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 S. 1716-1723

Carr, A. C., van den Berg, J. J. M., and Winterbourn C. C. (1996) Chlorination of cholesterol in cell membranes by HOCl. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, S. 63-69

Clark S. J., Jefferies W. A., Barclay, A. N., Gagnon, J., Williams, A. F. (1987) Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84(6) S. 1649-1653

Chang, D. C., and Kim, P. S. (1998) HIV Entry and Its Inhibition *Cell* 93 S.681-684

Choi, D. K., Pennathur, S., Perier, C., Tieu, K., Teismann, P., Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Vonsattel, J. P., Heinecke, J. W., and Przedborski, S. (2005) Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J. Neurosci.* 25(28) S. 6594

Costantino, H. R., Langer, R., Klibanov, A. M. (1995) Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: effect of moisture and stabilization by excipients. *Biotechnology (NY)* 13(5) S. 493-496.

Cormier, E. G., and Dragic, T. (2002) The Crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.* 76 S. 8953-8957

Davies, M. J., and Hawkins, C. L. (2000) Hypochlorite induced oxidation of thiols: formation of thiyl radicals and the role of sulfenyl chlorides as intermediates. *Free Radic. Res.* 33, S. 719-729

Dagleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 312(5996) S.763-767.

Deng, H., Liu, W., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C. Schall, T. J. Littman, D. R., and Landau, N. R. (1996) Identification of major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, S. 661-666

Domigan, N. M., Charton, T. S., Duncan, M. W., Winterbourn, and C. C. Kettle, A. J. (1995) Chlorination of Tyrosyl residues in peptides by MPO and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 270, S. 16542-16548

Drozd, R., Naskalski, J. W., and Sznajd, J. (1988) Oxidation of amino acids and peptides in reaction of MPO, chloride and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 957, S. 47-52

Ellmann, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, S. 70-77

Este, J. A. , and Telenti, A. (2007) HIV entry inhibitors. *The Lancet* 370 S. 81-88

Fantini, J., Lock, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L., and Gonzalez-Scarano, F. (1993) Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 HIV is associated with cell surface expression of galactosyl ceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 S. 2700-2704

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-coupled receptor. *Science* 272, S. 872-877

Foot, C. S., Goyne, T. E., and Lehrer, R. I. (1983) Assessment of chlorination by human neutrophils *Nature*. 301(5902) S. 715-716

Fu, S., Wang, H., Davies, M. J., and Dean, R. T. (2000) Reaction of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues gives dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine. *J. Biol. Chem.* 275 S. 10851-10857

Fu, X., Müller, D., and Heinicke, J. W. (2002) Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides and sulfonamides by hypochlorous acid: a potential pathway for oxidative cross-linking of low-density-lipoprotein by myeloperoxidase. *Biochemistry* 41 S. 1293-1301

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224 S. 500-503

Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S., Puri, A., Durell, S., and Blumenthal, R. (2003) The HIV Env-mediated fusion reaction. *1614(1)* S. 36-50

Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C., and Montelaro, R. C. (1989) A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5 S. 431-440

- Gallay, P. (2004) Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect.* 6(6) S. 617-622
- Gisham, M. B., Jefferson, M. M., Melton, D. F., and Thomas, E. L. (1984) Chlorination of endogenous mites by isolated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 259 S. 10404-10413
- Grinsztejn, B., Nguyen B. Y., Katlama C., Gatell J. M., Lazzarin, A., Vittecoq, D., Gonzalez, C. J., Chen, J., Harvey, C. M., Isaacs, R. D. (2007) Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet* 369(9569) S. 1261-1269
- Green, P. S., Mendez, A. J., Jacob, J. S., Crowley, J. R., Growdon, W., Hyman, B. T., and Heinecke, J. W. (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 90 S. 724-733
- Gröne, H.-J., Gröne, E. F., and Malle E. (2002) Immunohistochemical Detection of Hypochlorite-Modified Proteins in Glomeruli of Human Membranous Glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 82 (1) S. 5-14
- Habeeb, A. F. S. A. (1966) Determination of Free Amino Groups in Proteins by Trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 14 S. 328-336
- Harrison, J. E., and Schultz, J. (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 251(5) S. 1371-1374.
- Hauser, H. (2005) Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich des gp120 für die Infektiosität der HIV-1-Subtypen A und C. Dissertation
- Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (1998) Hypochlorite-induced damage in proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.* 332 S. 617-625

Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (1998) Reactions of HOCl with amino acids and peptides: EPR evidence for rapid rearrangement and fragmentation reactions of nitrogen-centred radicals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* S. 1937-1945

Hawkins, C. L., Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2002) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 25, S. 259-274

Hazell, L. J., van der Berg, J. J., and Stocker, R. (1994) *Biochem. J.* 302, S. 297-304

Hazen, S. L., d'Avignon, A., Anderson, M. M., Hsu, F. F., and Heinecke, J. W. (1997) Human Neutrophils Employ the MPO-H₂O₂-Cl₂ System to Oxidize α -Amino Acids to a Family of Reactive Aldehyds. *The Journal of Biological Chemistry* 273 S. 4997-5005

Hazen, S. L., Gaut, J. P., Hsu, F. F., Crowley, J. R., d'Avignon, A., and Heinecke, J. W. (1997) p-Hydroxyphenylacetaldehyd, the Major Product of L-tyrosine Oxidation by the Myeloperoxidase-H₂O₂-Chloride System of Phagocytes, Covalently Modifies ϵ -Amino groups of Protein Lysine Residues. *J. Biol. Chem.* 272(27) S.16990-16998

Hazen, S. L., and Heinecke, J. W. (1997) 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* 99(9) S. 2075-2081

Hazen, S. L., Hsu, F. F., and Heinecke, J. W. (1996) p-Hydroxyphenylacetaldehyde is the major product of L-tyrosine oxidation by activated human phagocytes. A chloride-dependent mechanism for the conversion of free amino acids into reactive aldehydes by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 271(4) S. 1861-1867

Herken, S., and Schunk, J. (1948) Untersuchung an Eiweißkörpern mit Natriumhypochlorit. Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin

Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K., and Cullen, B. R. (1991) Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of the cell tropism in HIV-1. *Science* 253, S. 71-74

Jacob, J. S., Cistola, D. P., Hsu, F. F., Muzaffar, S., Mueller, D. M., Hazen, S. L., Heinecke, J. W. (1996) Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system to synthesize dityrosine, trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosyl radical-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 16; 271(33) S. 19950-19956

Jansen, R. W., Schols, D., Pauwels, R., de Clercq, E., and Meijer, D. K. (1993) Novel, negatively charged, human serum albumins display potent and selective *in vitro* anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Mol. Pharmacol.* 44 S. 1003-1007

Javaherian, K., and McDanal, C. (1995) Random copolymers containing specific ratios of negatively charged and aromatic amino acids bind V3 disulfide loop and neutralize diverse HIV type 1 isolates. *AIDS Res. hum. Retroviruses* 11(10) S. 1163-8

Johnson, V. A., and Byington, R. E. (1990) Quantitative assays for virus infectivity. In *Techniques in HIV Research*. Aldovini, A., and Walker, B.D. eds. (Stockton Press, New York) S. 71-76.

Johnston, R. B., Keele, B. B., Misra, H. P., Lehmyer, J. E., Webb, L. S., Baehner, R. L., and Rajagopalan, K. V. (1975) The Role of Superoxide Anion Generation in Phagocytic Bactericidal Activity. *The Journal of Clinical Investigation* 55 S.1357-1372

Johnson, W. E., Jenniver, M., Sauvron, and Desrosiers, R. C. (2001) Conserved, N-Linked Carbohydrates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Are Largely Dispensable for Viral Replication. *J. Virol.* 75(33) S. 11426-11436

Kalyaanaraman; B. (1995) Thiyl radicals in biological systems: Signifikant or Trivial ? *Biol. Chem. Soc. Symp.* 61, S. 55-63

Kehrel, B. *et al.* (2001) Patentschrift DE10148624

Kettle, A. J. (1996) Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Lett.* 379 S. 103-106

Kilby, J. M., and Eron, J. J. (2003) Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N. Engl. J. Med.* 348(22) S. 2228-2238

Kirst, M. (2005) Herstellung und Charakterisierung eines anti-HIV-Inhibitors basierend auf modifiziertem Serum Albumin. Dissertation

Kimpton, J., and Emerman, M. (1992) Detection of Replication-Competent and Pseudotyped Human Immunodeficiency with a Sensitive Cell Line on the Basis of Activation of an Integrated β -Galactosidase Gene. *J. Virol.* 66 S. 2232-2239

Kinkade, J. M., Pember, S. O., Barnes, K. C., Shapira, R., Spitznagel, J. K., and Martin, L. A. (1983) Differential distribution of distinct forms of MPO in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 S. 296-303

Klebanoff, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leucocyte Biology* 77 S. 598-625

Koseki, T., Kitabatake, N., and Doi, E. (1990) Freezing denaturation of ovalbumin at acid pH. *Journal of Biochemistry* 107 S. 389-394.

Kwong, P. D., Wyatt, R., Quintin, J., Sattentau, Q. J., Sodroski, J., Wayne, A., and Henrickson, W. A. (2000) Oligomeric Modeling and Electrostatic Analysis of the gp120 Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency. *Virus. J. Virol.* 74(4) S. 1961-1972

Kwong, D. P., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Henrickson, W. A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393 S. 648-659

Labrosse, B., Brelot, A., Heveker, N., Sol, N., Schols, D., De Clerq, E., and Alizon, M. (1998) Determinants for sensitivity of HIV coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J. Virol.* 72 S.6381-6388

Lammler, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 S. 680-685

Layne, E. (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymol.* 3 S. 447-454

Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L. R., Harris, J., Thomas, J. N., and Gregory, T. J. (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265 S. 10373-10382

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E. (1990) Carbonyl Assay for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 233, S. 346-357

Lewis, S. A., and Levine, R. L. (1995) Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Anal. Biochem.* 231 S. 440-446

Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225 S.840-842

Lin, J. J., Meyer, J. D., Carpenter, J. F., Manning M. C. (2000) Stability of human serum albumin during bioprocessing: denaturation and aggregation during processing of albumin paste. *Pharm Res.* 17(4) S. 391-396

Ling, H., Usami, O., Xiao, P., Gu, H. X., Hattori, T. (2004) The N-terminal of the V3 loop in HIV type 1 gp120 is responsible for its conformation-dependent interaction with cell surface molecules. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20(2) S. 213-218

Maddon, P. J., Littman, D. R., Godfrey, M., Maddon, D. E., Chess, L., and Axel, R. (1985) The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell.* 42(1) S. 93-104.

Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R. (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47 S. 333-348.

Malle, E., Marsche, G., Panzenboeck, U., and Sattler, W. (2006) MPO-mediated oxidation of high density lipoproteins: Fingerprints of newly recognizes potential proatherogenic lipoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysica* 445 S. 245-255

Marquez, L. A., and Dunford, H. B. (1995) Kinetics of Oxidation of Tyrosine and Dityrosine by Myeloperoxidase Compounds I and II. *J. Biol. Chem.* 270(51) S. 30434-30440

Markaryan, A., Zaborina, O., Punj, V., and Chakrabarty, A. M. (2000) Adenylate Kinase as a Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183(11) S. 3345–3352

Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U. (2003) *Molekulare Virologie* Spektrum Verlag

Morris, J. C. (1966) The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°C. *J. Phys. Chem.* 70 S. 3798-3805

Moulard, M., Lortat-Jacob, H., Mondor, I., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olsen, W., Kwong, P. D., and Sattentau, Q. J. (2000) Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* 74(4) S. 1948-1960

Naskalski, J. W. (1994) Oxidative modification of protein structures under the action of MPO and the hydrogen peroxide and chloride system. *Ann. Biol. Clin.* 52 S. 451-456

Nichols, B. A., and Bainton, D. F. (1973) Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations. *Lab. Invest.* 29 S. 27-40

Nielsen, M. H., Pedersen, F. S., and Kjems, J. (2005) Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication. *Retrovirology* 2 S. 10

Opdenakker, G., Rudd, P. M., Ponting, C. P., and Dwek, R. A. (1993) Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.* 7 S. 1330

Pacifici, R. E., and Davies, K. J. A (1990) Protein Degradation as an Index of Oxidative Stress. *Methods in Enzymology* 186 S.485-502

Pareira, W. E., Hoyano, Y., Summons, R. E., Bacon, V. A., and Duffield, A. M. (1973) Chlorination studies II the reaction of aqueous hypochlorous acid with α -Amino acids and dipeptides. *Biochem. Biophys. Acta* 313 S. 170-180

Podrez E. A., Abu-Soud, H. M., and Hazen, S. L. (2000) Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (12) S. 1717-1725

Poignard P., Saphire, E. O., Parren, P. W., Burton, D. R. (2001) gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu. Rev. Immunol.* 19 S. 253-274

Prutz, W. A. (1996) HOCl interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 332 S. 110-120

Reichel, S., Arnhold, J., Schiller, J., Petković, M., and Arnold, K. (2000) *Innovationskolleg Chemisches Signal und Biologische Antwort.* Leipzig

Sanfourche, Gardent (1924) *Bull. Soc. Chim.* 35 S. 1089

Saphire, A. C. S., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P. A. (2001) Syndecans Serve as Attachment Receptors for Human Immunodeficiency Virus Type 1 on Macrophages. *J. Virol.* 75 S. 9187-9200

Sattentau Q. J., Dalgleish, A. G., Weiss, R. A., Beverley, P. C. (1986) Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science* 28;234(4780) S.1120-1123.

Sattentau, Q. J., Moore, J. P., Vignaux, F., Traincard, F., and Poignard, P. (1993) Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* 67(12) S. 7383-7393.

Schreiber, M., Petersen, H., Wachsmuth, C., Müller, H., Hufert, F. T., and Schmitz, H. (1994) Antibodies of Symptomatic Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals Are Directed to the V3 Domain of Noninfectious and Not of Infectious Virions Present in Autologous Serum. *J. Virol.* 68 S. 3908-3916

Schuller-Levis, G. B., and Park, E. (2004) Taurine and its chloramine: Modulators of Immunity. *Neurochemical Research* 29 S. 117-126

Shacter, E. (2000) Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples. *Drug Metabolism Reviews* 32 S. 307-326

Shao, B., Oda, M. N., Vaisar, T., Oram, J. F., Heinecke, J. W. (2006) Pathways for oxidation of high-density lipoprotein in human cardiovascular disease. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8(3) S. 198-205

Simmons, G., Wilkinson, D., Reeves, J. D., Dittmar, M. T., Beddows, S., Weber, J., Carnegir, G., Desselberger, U., Gray, P. W., Weiss, R. A., and Clapham, P. R. (1996) Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dultropic and most can use either Lestr or CCR5 as Coreceptor for virus entry. *J. Virol.* 70 S. 8355-8360

Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway, G. P., Martin D. E. (2007) Phase I/II Study Of The Safety, Virologic Effect, And Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Of Single Dose 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (Bevirimat) in HIV-Infection. *Antimicrob Agents Chemother.*

Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, K., Parks, E. S., Paarks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., Wong-Staal, F. (1986) Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45 S. 637-648

Temesgen, Z., and Feinberg, J. E. (2006) Drug evaluation: bevirimat HIV Gag protein and viral maturation inhibitor. *Curr Opin Investig Drugs*. 7(8) S. 759-765

Temesgen, Z., Warnke, D., and Kasten, M. J. (2006) Current status of antiretroviral therapy. *Expert. Opin. Pharmacother* 7 (12) S. 1541-1454

Thomas, E. L. (1979) MPO, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal against *E. coli*. *Infect. Immun.* 23 S. 522-531

Thorsden, I., Polzer, S., and Schreiber, M. (2002) Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1. *BMC Infectious Diseases* 2(1) S.31-46

Tszynski, G. P., and Murphy, A. (1990) Spectrophotometric Quantitation of Anchorage-Dependent Cell Numbers Using the Bicinchoninic Acid Protein Assay Reagent. *Anal. Biochem.* 184 S 189-191

Van Damme, L., and Balzarini, J. (2005) Intravaginal and intrarectal microbicides to prevent HIV infection. *JAMC* 172 (4) S. 461-464

Veronese, F. D., de Vico, A. L., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Gallo, R. C., and Sarngadharan, M. G. (1985) Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229 S. 1402-1405

Vossmann, M. (2004) Neutralisation von Varianten des Humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1), West-Nil Virus und Hantaan Virus mit modifiziertem humanem Serumalbumin (HSA). Dissertation

Wang, J., Yan, Y., Garrett, T. P. J., Liu, J., Rodgers, D. W., Garlick, R. L., Tarr, G. E. Husain, Y., Reinherz, E. L., and Harrison, S. C. (1990) Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* 348 S.411-418

Wei, X., Decker, J. M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R. B., Kilby, J. M., Saag, M. S., Wu, X., Shaw, G. M., and Kappes, J. C. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6) S.1896-905

Weinstock, K., and Ballou, C. E. (1986) Cell-cell recognition in yeast. Molecular nature of the sexual Agglutinin from *Saccharomyces Kluyveri* 17-cell. *J. Biol. Chem.* 261(34) S. 16174-16179

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387(6631) S.426-430

Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel J. J., and Wiley, D. C. (1999) Structural basis for membran fusion by envelope viruses. *Molecular Membrane Biology* 16 S. 3-9

Weizman, S. A., and Gordon, L. I. (1990) Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76 S. 655-663

Wiechelmann K. J., Braun R. D., and Fitzpatrick J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 75 S. 231-237

Wilchek, M., Bayer, E. A. (1988) The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem.* 171(1) S. 1-32

Winterbourn, C. C. (1985) Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chlorite, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochim. Biophys. Acta* 840 S. 204-210

Winterbourn, C. C., and Brennan, S. O. (1997) Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.* 326 S. 87-92

Winterbourn, C. C., and Kettle, A. J. (2000) Biomarkers of MPO-derived hypochlorous acid. *Free radical Biol. Med.* 29 S.403-409

Winterbourn, C. C., van den Berg, J. J. M., Roitman, E., and Kuypers, F. A. (1992) Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with HOCl. *Arch. Biochem. Biophys.* 296 S. 547-555

Wright, N. C. (1936) The action of hypochlorites on amino acids and proteins. The effect of acidity and alkalinity. *Biochem J.* 30 S. 1661-1667

Wu, H., Myszka, D. G., Tendiani, S. W., Brouillettei, C. G., Sweet, R. W., Chaiken, I. M., and Hendricksen, W. A. (1996) Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding. *Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 S. 15030–15035

Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J., and Sodroski, J. (1995) Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J. Virol.* 69 S. 5723-5733

Zhang, L., Huang, Y., He, T., Cao, Y., and Ho, D. D. (1996) HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* 383 S. 768

Zhang, Ch., Reiter, C., Eiserich, J. P., Boersma, B., Parks, D. A., Beckman, J. S., Barnes, S., Kirk, M., Baldus, S., Darley-USmar, V. M., and White, R. (2001) L-Arginine Chlorination products Inhibit Endothelial Nitric Oxide Production. *J. Biol. Chem.* 276, S. 27159-27165

Zgliczynski, J. M., Stelmaszynska, T., Domanski, J., and Ostrowsky, W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235 S. 419-424

Zolla-Pazner, S. (2004) Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* (3) S. 199-210

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Abacavir
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APV	Amprenavir
AS	Aminosäure
ATV	Atazanavir
AZT	Azidothymidin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
β-Gal	β-Galaktosidase
CCR	Chemokinezeptor für CC-Chemokine
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	<i>Complementarity-determining Region</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CO	Carbonyl
CXCR	Chemokinezeptor für CXC-Chemokine
Da	Dalton
ddC	Zalcitabin
ddH ₂ O	Deionisiertes Wasser
ddI	Didanosin
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphate
d4T	Stavudin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Egel Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktionseinheiten
EDC	Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFV	Evavirenz
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant Assay</i>
Env	<i>envelope</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FDA	<i>Food and drug Administration</i>
FI	Fusionsinhibitor
FKS	Fötale Kälberserum
FPLC	<i>fast liquid performance chromatography</i>
FTC	Emtricitabin
FPV	Fosamprenavir
FZ	Forschungszentrum
gag	<i>group specific antigen</i>
gp	Glykoprotein
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HABA	2-[4'-Hydroxyazobenzol]-carboxylsäure

HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
HEPES	[4-(2-Hydroxy-piperazino-)]ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HOCI	hypochlorige Säure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSA	humanes Serumalbumin
HP	<i>hapted repeat</i>
IDV	Indinavir
IC	<i>Inhibition Concentration</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M	Molar
m β -Gal	modifizierte β -Galaktosidase
mBSA	modifiziertes bovines Serumalbumin
mHSA	modifiziertes humanes Serumalbumin
mMSA	modifiziertes murines Serumalbumin
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , die Multiplizität der Infektion (Zahl der Viren in einem <i>Well</i> geteilt durch die Zahl der Zellen in demselben Well)
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSA	murines Serumalbumin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) diphenyl-tetrazolium-bromid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NFV	Nelfinavir
NNRTI	Nicht-nukleosidischer reverse Transkriptase-Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer reverse Transkriptase-Inhibitor
NtRTI	Nukleotidischer reverse Transkriptase-Inhibitor
NVP	Nevirapin
OP	optische Dichte
PA-457	Bevirimat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEO	Polyethylenoxid
pH	pondus Hydrogenii
PI	Polymeraseinhibitor
PITC	Phenylisothiocyanat
pol	Polymerase
ROS	Sauerstoffverbindungen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RTV	Ritonavir
RU	<i>Response Unit</i>
SCH-417,690	Vicriviroc
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SQV	Saquinavir
STD	sexuell übertragbare Krankheit
ssDNA	einzelsträngige DNA

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCID	<i>Tissue Culture Infectious Dose</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
3TC	Lamivudin
TDF	Tenovir
TG	Tris Glycin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UK-427,857	Maraviroc
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-β-D-Galaktosid

7.2 Abkürzungen für die Aminosäuren

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

7.3 Veröffentlichungen

van Yperen, M. and Schreiber, M. (2007) *Investigation of HOCl-modified proteins which exhibit a high activity towards HIV-1 gp120 in vitro by inhibition of virus attachment*. Posterbeitrag Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Frankfurt am Main

van Yperen, M. and Schreiber, M. (2006) *HOCl-modified serum albumins attach to HIV-1 gp120 and inhibit virus cell interaction*. Posterbeitrag GfV-Tagung, München.

Publikation in Vorbereitung (*Submitted*)

Svenja Polzer, Melanie van Yperen, Martin Kirst, Heiner Schaal, and Michael Schreiber *Neutralization of HIV-1 by HOCl-modified serum albumins. (Retrovirology)*

7.4 Danksagungen

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Michael Schreiber für die Vergabe des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Außerdem für den großzügigen Etat, die Möglichkeit selbstständig arbeiten zu können und zuletzt für die Durchsicht dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Schmitz bedanke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und für die interessanten Diskussionen während meiner Vorträge.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Adam für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Ich bedanke mich außerdem bei Rainer Bartels aus dem Forschungszentrum Borstel für die Aminosäurenanalyse meiner Proben. Desweiteren bei Herrn Prof. Holst für seine Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Beate Kümmerer, Diana Ludolphs und Linda Brunotte für die Durchsicht dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich für die schöne Zeit bei meinen Arbeitskollegen bedanken. Besonders aber bei Meike Petersen und Anna Zmorzynska.

Ich möchte mich ebenfalls bei Wolfgang Miram, Dagmar Utz und Margrit Jürgens bedanken. Durch Euren positiven Einfluss ist diese Arbeit zu Papier gebracht worden.

Für die großartige Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Margrit van Yperen, Ralf van Yperen, Yasmin van Yperen, Elfriede Petersen, und Wolfgang Brüggemann.

Lieber Tudor, Dir gilt ganz besonderer Dank. Aus der gemeinsam verbrachten Zeit konnte ich immer wieder neue Energie schöpfen.