

**Modellierung der Interaktion
des humanen Korezeptor CCR5
mit der V3-Loop des Glycoproteins
gp120 aus dem HIV-1**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Department Chemie

vorgelegt von
Winrich Joachim Scherres
aus Hamburg

Hamburg, 2009



Universität Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Vill

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von November 2004 bis April 2007 am Institut für Organische Chemie des Departments Chemie der Universität Hamburg, Direktor: Prof. Dr. Joachim Thiem, durchgeführt.

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

Felix qui potuit rerum cognoscere causas.

Publius Vergilius Maro (70 v.Chr.-19 v.Chr.)

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
7TM	Sieben- α -Helix-Transmembranprotein
<i>AIDS</i>	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CCR5	Chemokinrezeptor 5
CCR _x	CC-Typ Chemokinrezeptor; x = Kennzahl
CXCR _x	CXC-Typ Chemokinrezeptor; x = Kennzahl
cDNA	komplementäre DNA
D	Domäne
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
ds	<i>double stranded</i>
EC	<i>extracellular</i>
ECL	<i>extracellular loop</i>
E	Energie
Endo-H	<i>Endoglycosidase H</i>
GlcNAc	<i>N-Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
gp	Glycoprotein
gp120	Glykoprotein 120
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
ID	<i>identification</i>
ICL	<i>intracellular loop</i>
kbp	kilo Basenpaare
kDa	kilo Dalton
MD	Moleküldynamik
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mol2	Dateiformat für Moleküle
<i>NMR</i>	<i>nuclear magnetic resonance</i>

PDB	<i>Brookhaven Protein Data Bank</i>
PE	<i>potential energy</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkriptase
TM	Transmembran
TrEMBL	<i>Translated European Molecular Biology Laboratory</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
ss	<i>single stranded</i>
STD	<i>saturation transfer difference</i>
vdW	van-der-Waals
WHO	<i>world health organization</i>

Aminosäuren

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	<i>AIDS</i>	10
1.2	Beschreibung des Erregers (HIV)	11
1.3	HIV-Lebenszyklus	13
1.4	Krankheitsverlauf	15
1.5	HIV <i>entry</i>	16
1.6	Das virale Glycoprotein gp120	17
1.7	CD4-Rezeptor	19
1.8	Die Korezeptoren CCR5 und CXCR4	20
1.9	Therapieansätze zur HIV-Bekämpfung	24
1.10	Inhibition der Protease und reversen Transkriptase	24
1.11	<i>Entry</i> -Inhibitoren	24
1.12	Chemokine	25
2	Methoden	26
2.1	<i>Molecular modelling</i>	26
2.2	Kraftfeldmethoden	29
2.3	Energieminimierung	31
2.4	MD-Simulation	32
2.5	Protein-Ligand-Docking	35
3	Problemstellung	36
4	Ergebnisse und Diskussion	37
4.1	Einfluss sulfatierter Tyrosine auf den HIV <i>entry</i>	38
4.2	Dockingstudie mit DOCK 4.0	49
4.3	<i>In silico</i> Alanin- <i>scan</i>	59
4.4	Abgleich mit experimentellen Ergebnissen	68
4.5	Vergleich mit Literatur-Ergebnissen	73
4.6	Abstandsmessungen CCR5/V3	79
4.7	Dockingstudien mit den Chemokinen MIP- α , MIP- β und Rantes	79
4.8	CCR5 Einbettung in eine Lipiddoppelschicht	85
4.9	Einpassung in den Gesamtkomplex gp120/CD4	87
4.10	Ausblick	93
5	Zusammenfassung	94

6	Summary	96
7	Experimenteller Teil.....	99
7.1	Verwendete Hard- und Software.....	99
7.2	DOCK 4.0 suite: MS	100
7.3	DOCK 4.0 suite: INSPH	101
7.4	DOCK 4.0 suite: SPHGEN	101
7.5	DOCK 4.0 suite: SHOWSHERE	102
7.6	DOCK 4.0 suite: SHOWBOX.....	103
7.7	DOCK 4.0 suite: GRID	104
7.8	DOCK 4.0 suite: DMS	106
7.9	DOCK 4.0 suite: SPHGEN	107
7.10	DOCK 4.0 suite: SHOWSPHERE	107
7.11	DOCK 4.0 suite: DOCK.....	108
7.12	SYBYL 7.0: Minimize-Parameter.....	113
7.13	SYBYL 7.0: MD-Simulation Parameter	114
7.14	Distancemapper:.....	115
8	Literaturverzeichnis.....	116
9	Curriculum Vitae.....	129

1 Einleitung

1.1 AIDS

Das *acquired immune deficiency syndrome* (erworbenes Immunschwäche-Syndrom, *AIDS*) ist eine Folge der Infektion mit dem *human immunodeficiency virus* (humanes Immunschwäche-Virus, *HIV*), welches eine schrittweise Zerstörung des Immunsystems bewirkt.¹ Aufgrund genetischer Vergleiche mit HIV-2 wird vermutet, dass sich das HIV vom SIV herleitet und vor etwa 50 Jahren in Zentralafrika von Affen auf den Menschen übergegangen ist.²

Das erworbene Immunschwäche-Syndrom wurde in den frühen 80er Jahren erstmals beschrieben und hat sich inzwischen zu einer globalen Epidemie entwickelt. Das HI-Virus, wurde von Luc Montagnier entdeckt. Die Übertragung erfolgt über Körperflüssigkeiten.¹

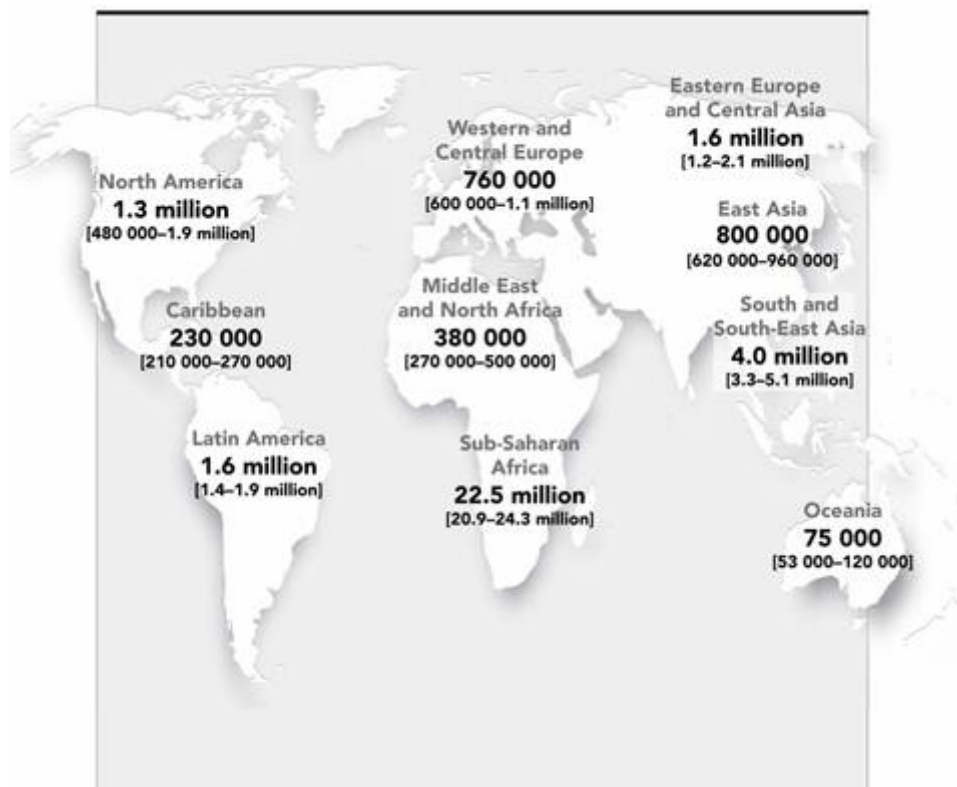


Abbildung 1: Globale Schätzung der Ausbreitung von HIV Ende 2007.³

Die Übertragung von Körperflüssigkeiten kann durch ungeschützte Sexualkontakte, durch gemeinsam benutzte Injektionsnadeln, durch kontaminierte Blutprodukte oder prä-, peri- oder postnatal von der infizierten Mutter auf ihr Kind erfolgen. Weltweit sind heute mehr als 33 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. Allein im Jahr 2007 starben 2.1 Millionen Menschen an diesem Syndrom.³

Im Allgemeinen führt die HIV-Infektion nach mehreren symptomfreien Jahren zum Ausbruch von *AIDS*.

AIDS ist eine tödliche Krankheit, gegen die es keinen wirksamen Impfstoff gibt. Die Kombinationstherapie für bereits Infizierte, bekannt unter dem Namen HAART (*highly active antiretroviral therapy*), kann den Verlauf der Krankheit hinauszögern, aber nicht heilen. Daher muss die Suche nach neuen Wirkstoffen und Therapieansätzen fortgesetzt werden.³

1.2 Beschreibung des Erregers (HIV)

Man unterscheidet drei verschiedene Virus-Stämme, das HIV-1, HIV-2 und SIV, wobei die beiden ersteren den Menschen und der letztere Affen infizieren. Der überwiegende Teil der humanen HIV-Infektionen ist auf das HIV-1 zurückzuführen, dessen Genom sich zu 40 % von dem des HIV-2 unterscheidet. Eine weitere Unterteilung des HIV-1 lässt sich in die so genannten M (*major*)-, O (*outlier*)-, und N (*new*)-Gruppen vornehmen, wovon die O- und N-Gruppe nur in einigen Teilen Afrikas vorkommt, die M-Gruppe allerdings für das Auftreten von *AIDS* als Pandemie verantwortlich ist.⁴⁻⁷ Die Sequenzvariation innerhalb eines Subtyps selbst liegt im Allgemeinen zwischen 5 und 20 %, die Subtypen untereinander divergieren zwischen 25 und 35 %.⁸

Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren, die durch das Vorhandensein eines speziellen viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (RT), gekennzeichnet ist.⁹

Das HIV bildet etwa 100 nm große Viruspartikel.¹¹ Im Inneren des Virus befindet sich ein Capsid, welches aus ungefähr 2000 Molekülen des Capsidproteins p24 gebildet wird. Das Capsid enthält das virale Genom, das in Form zweier Kopien einzelsträngiger positiv-Strang RNA (ssRNA) vorliegt, die durch direkte Assoziation mit dem Nucleocapsidprotein p7 stabilisiert werden. Wie bei allen Retroviren wird die Erbinformation durch die im Capsid integrierte viruseigene Reverse Transkriptase zu Beginn des Replikationszyklus in DNA transkribiert. Die Reverse Transkriptase arbeitet dabei etwa zehnmal ungenauer als vergleichbare Enzyme dieser Art und verursacht eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate des

viralen Erbguts.¹³ Auf diese Weise werden permanent neue Varianten des Erregers exprimiert, wodurch die Entwicklung geeigneter Impfstoffe oder anti-HIV-Therapeutika erheblich erschwert wird.^{14,15} Im Capsid der Viruspartikel befinden sich zusätzlich die Enzyme Integrase und Protease. Das Capsid wird von einer Proteinhülle bestehend aus ca. 2000 Matrixproteinen p17 umgeben.

Die äußere Hülle des Virions besteht aus einer Lipiddoppelschichtmembran, die von der Wirtszelle stammt und daher diverse wirtseigene Strukturen wie MHC-Proteine, Zelladhäsionsproteine und Glycolipide enthält (HLAs). Außerdem enthält sie etwa 72 Trimere des integralen Proteins gp41.¹⁵ An jedes gp41 ist ein peripheres gp120 nicht kovalent gebunden.¹⁶ Das gp120 ist ein Glycoprotein mit einer Molmasse von 120 kDa. Vorläuferprotein für die Glycoproteine gp41 und gp120 ist das gp160, welches bei der Virusreifung durch eine viruseigene Protease gespalten wird.¹⁷ Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des Virions.

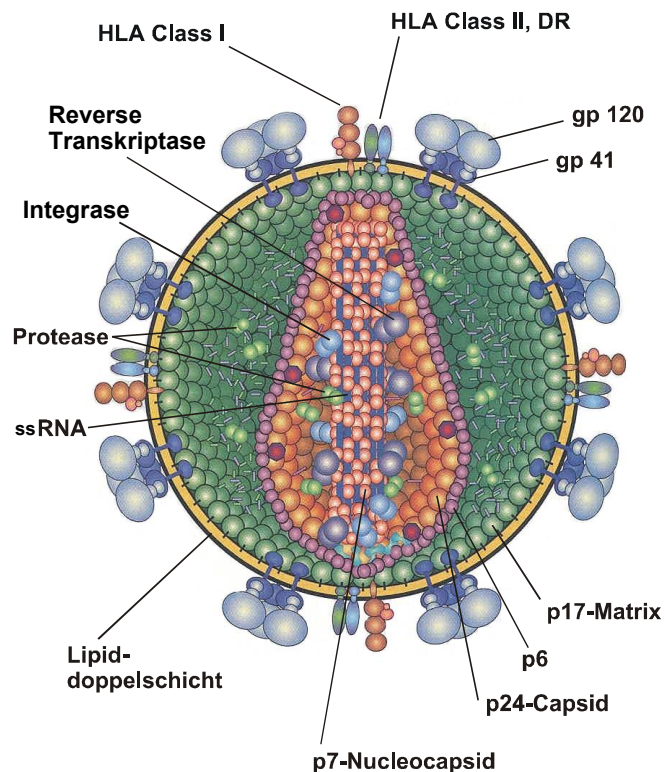


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HIV. Durchmesser ~ 100 nm.¹⁰

1.3 HIV-Lebenszyklus

Das HIV greift menschliche T-Zellen und Makrophagen an. Ist das Virus in die Blutbahn gelangt, findet eine Infektion der Wirtszelle durch Wechselwirkung der viralen Hüllproteine mit den Rezeptoren der Wirtszelle statt. Die Abbildung 3 zeigt das Eindringen eines HI-Virions in einen T-Lymphozyten.

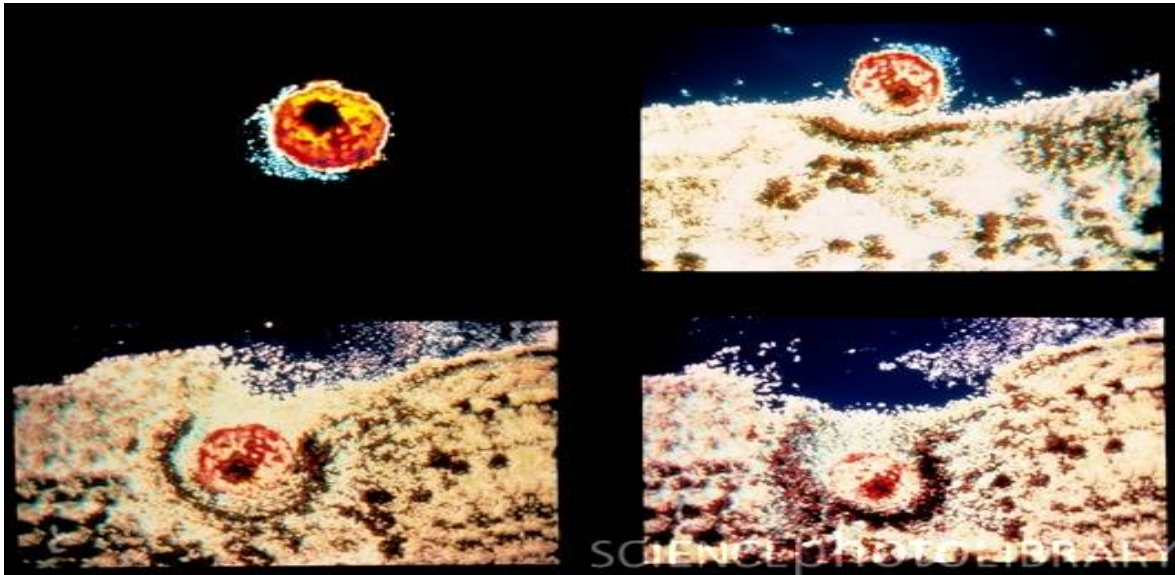


Abbildung 3: Per Transmissionselektronenmikroskopie aufgenommen zeigt die Abbildung ein HI-Viron beim Eindringen in einen T-Lymphozyten.³⁶

Die Infektion führt zur Fusion der Membranen von Virus und Wirtszelle und damit zur Insertion des Capsids (Abbildung 4 [A, B und C]). Anschließend wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase die virale ssRNA zur dsDNA umgeschrieben (Abbildung 4 [D]) und durch die Integrase, die bei der Fusion ebenfalls in das Cytoplasma gelangt ist, in das Wirtsgenom an eine unspezifische Stelle integriert (Abbildung 4 [E]) und dort schließlich exprimiert (Abbildung 4 [F]).¹⁹

Mit Hilfe der wirtszelleigenen Proteinsynthese erfolgt anschließend die Transkription zur mRNA und die Translation in neue virale Proteine. Diese Proteine sind Vorläuferproteine, die durch die viruseigene Protease zu funktionellen Proteinen gespalten werden (Abbildung 4 [G]). Im Anschluss lagern sich die Virusproteine mit neuer viraler RNA zusammen und knospen als reife Virionen von ihrer Wirtszelle ab (Abbildung 4 [H]). Dabei umhüllen sie sich mit der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle, in die die viralen Hüllproteine schon integriert sind.

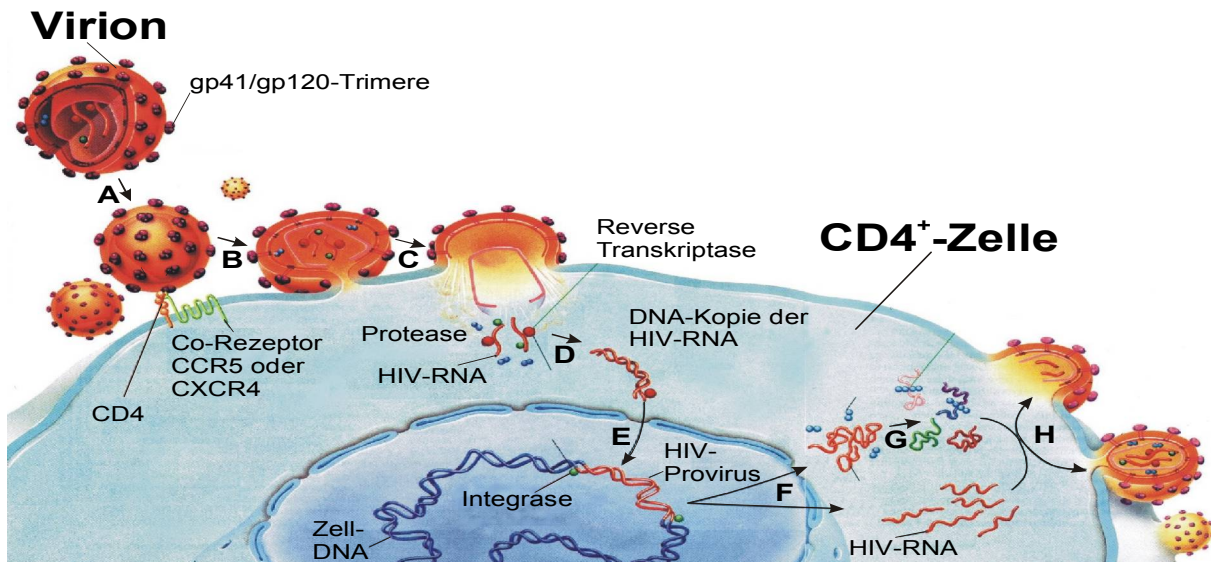


Abbildung 4: Schematische Darstellung des HIV-Infektionszyklus. Nach dem Binden des Virions an die Wirtszelle erfolgt eine Zellfusion (A, B und C). Anschließend wird das freigesetzte Genom durch die viruseigene RT in cDNA umgeschrieben (D), in den Kern transportiert und dort in das Genom der Zelle integriert (E). Die Wirtszelle transkribiert diese DNA in mRNA, welche zu viralen Proteinen translatiert wird (F und G). Aus den neu entstandenen Hüllproteinen und viraler RNA entstehen in einem Abschnürungsprozess neue Virionen (H).¹⁹

Die Virusmembran stammt daher von der Wirtszelle und enthält dadurch diverse wirtseigene Strukturen (HLA's). Dies erschwert die Erkennung des Virus durch das Immunsystem des infizierten Menschen.²⁰ HI-Virionen haben eine Halbwertszeit im Blut von weniger als 6 Stunden. Die infizierten $CD4^+$ -Lymphozyten haben eine Halbwertszeit von weniger als 2 Tagen, wobei täglich mindestens 10^{10} Virionen produziert werden. Die hohe Mutationsrate ist darauf zurückzuführen, dass HIV-1 über keine Exonucleasefunktion verfügt.²¹

Das HIV-Genom kann anstatt neue Viren zu produzieren auch in eine Ruhephase fallen. Das Virus kann dadurch mehrere Jahre ohne Replikation überdauern und ist in dieser Zeit weder vom Immunsystem noch von Chemotherapeutika zu erreichen.

Die Wirtszelle wird bei der Replikation des HI-Virus auf mehrere Arten geschädigt. Die Membran der Wirtszelle wird durch den Einbau viraler Glycoproteine und durch die Knospung von Viruspartikeln permeabel, welches schließlich zur osmotischen Lyse der Zelle führt. Durch die Präsentation der viralen Glycoproteine können an der Wirtszelle viele weitere CD4-Rezeptor tragende Zellen zu vielkernigen Zellverbänden gebunden werden. Außerdem kann sich lösliches gp120 an CD4-Rezeptoren binden und zum Auslösen der Komplementkaskade und damit zu ihrer Zerstörung führen. Weiterhin wird die eigentliche Funktion der T-Helferzellen beeinträchtigt, indem durch gp120 blockierte CD4-Rezeptoren

nicht mehr mit Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexen wechselwirken können. Durch all diese Vorgänge wird die Zahl der funktionstüchtigen T-Helferzellen im Organismus stark reduziert und dadurch das Immunsystem geschwächt.¹⁹

1.4 Krankheitsverlauf

Der zeitliche Ablauf einer HIV-Infektion (Abbildung 5) sieht folgendermaßen aus:

Die etwa vier Wochen dauernde Anfangsphase ist geprägt durch eine kurze akute Phase mit hohem Virustiter der Infektion, die bei manchen Patienten mit grippeähnlichen Symptomen einhergeht.

In der anschließenden asymptomatischen Phase der Infektion, die einen Zeitraum von mehreren Jahren andauern kann, sind äußere Anzeichen, die auf eine Infektion durch HIV hindeuten, nicht zu erkennen. Aber auch hier findet eine ständige Interaktion zwischen Infektion, Produktion von Viren und deren Bekämpfung durch das Immunsystem statt, was zu einer allmählichen Verringerung der CD4⁺-Zellen führt. Unterschreitet die Anzahl der CD4⁺-Zellen den Wert von 500/μL, so spricht man von der symptomatischen Phase mit opportunistischen Infektionen. Sinkt die Zahl der CD4⁺-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der Viruslast weiter rapide ab (weniger als 200/μL), so spricht man von *AIDS*.²² Unbehandelt versterben innerhalb von 10 Jahren etwa zwei Drittel der Patienten an den Folgen der HIV-Infektion.²³

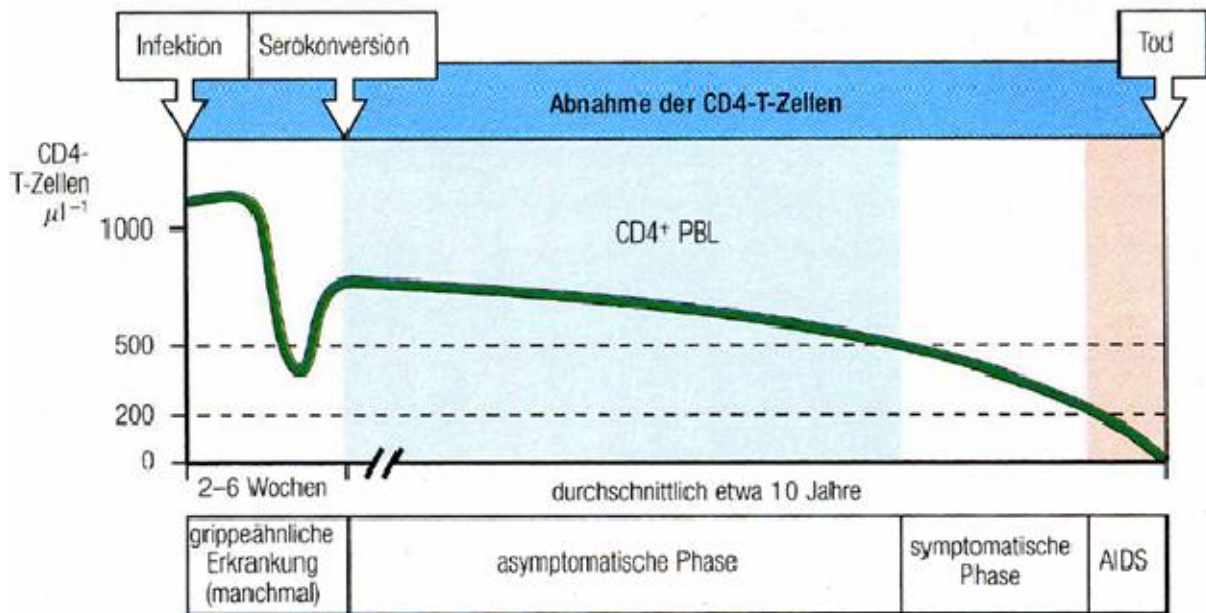
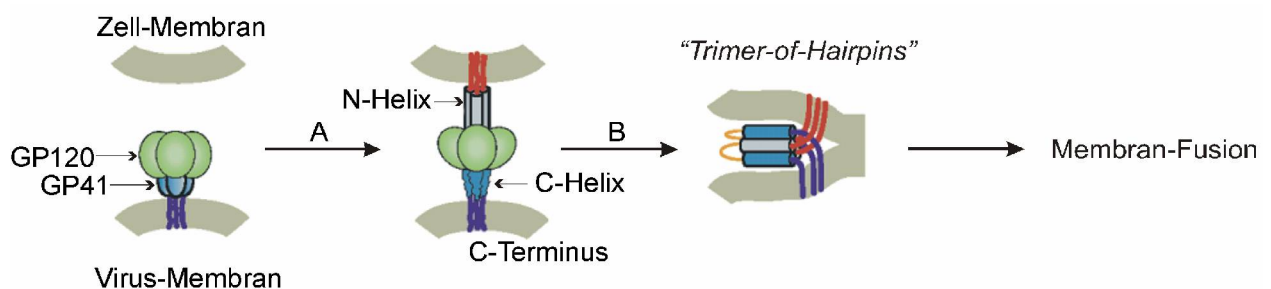


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf einer HIV-Infektion. Aufgetragen ist die Konzentration der CD4^+ -T-Zellen gegen den Zeitraum der Infektion und den einhergehenden Symptomen. Am Beginn der Infektion erfolgt ein starker Abfall der Konzentration der CD4^+ -T-Zellen; dabei kommt es zu grippeähnlichen Begleiterscheinungen. Durch die Bildung von Antikörpern (Serokonversion) erholt sich der Bestand an CD4^+ -T-Zellen. Während der mehrere Jahre andauernde Phase mit einer relativ konstanter CD4^+ -T-Zell Konzentration, in der kaum Symptome der Infektion auftreten (asymptomatische Phase), kommt es anschließend zum Abfall der CD4^+ -T-Zell Konzentration und damit einhergehend dem Auftreten von Symptomen (symptomatische Phase). Mit einem weiterem Absinken der CD4^+ -T-Zell Konzentration und dem Auftreten von bestimmten Erkrankungen ist das *AIDS*-Stadium erreicht.²

1.5 HIV entry

Es ist anzunehmen, dass der Mechanismus für den HIV *entry* in folgenden Schritten abläuft: Das Glycoprotein gp120 des HIV-1 bindet mit einem diskontinuierlichen Epitop, bestehend aus Aminosäuren von sechs konstanten und variablen Domänen, an den CD4-Rezeptor auf der Wirtszelle.²⁴ Daraus resultiert eine Änderung der Konformation des gp120, so dass es zusätzlich den Korezeptor CCR5 oder CXCR4 binden kann. Diese Wechselwirkung erfolgt über die V3-Region des gp120,^{25,26} wobei ein trimolekularer Komplex gebildet wird.²⁷ Aufgrund dieser Bindungen kommt es zu einer Destabilisierung des gp120-CD4-Komplexes mit der Konsequenz einer Konformationsänderung des gp41.

Aufgrund der Konformationsänderung wird die N-terminale hydrophobe Fusionsdomäne des Transmembranproteins präsentiert. Dieses Fusionspeptid am N-Terminus des gp41 kann anschließend in die Membran der Zielzelle insertieren und es erfolgt die Fusion von Virus- und Zellmembran (Abbildung 6). Jedes der drei gp41 besitzt zwei helikale Bereiche (N-Helix und C-Helix). Drei N-Helices bilden eine *Coiled-Coil*-Struktur, um die sich die drei C-Helices antiparallel gruppieren und ein Bündel bilden. Dieser postulierte Übergangszustand „*Trimer-of-Hairpins*“ bringt die Membranen zusammen und führt so zur Membranfusion. Durch die Membranfusion gelangen die Virusproteine und RNA-Kopien in das Zellinnere und das Virus kann sich replizieren.^{28,30}



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

Abbildung 6: Postulierter Mechanismus der Membranfusion.³¹

1.6 Das virale Glycoprotein gp120

Das gp120 besitzt eine Masse von 120 kDa, von der etwa 50 % auf den Kohlenhydratanteil entfallen. Es besitzt 24 bis 26 potentielle *N*-Typ Glycosylierungsstellen.³²

Die Struktur konnte in fünf relativ konstante Regionen (C1-C5) und fünf hypervariable Bereiche (V1-V5) identifiziert werden. Die ersten vier variablen Bereiche bilden exponierte Loops, wobei die V3-Loop maßgeblich an der gp120-Korezeptor-Wechselwirkung beteiligt ist.⁵² In der V3-Loop spielt besonders die kurze hoch konservierte Sequenz GPGRAPH (HIV-1, Subtyp B) eine bedeutende Rolle. Dieses Motiv wird als prinzipiell neutralisierende Domäne (PND) bezeichnet, da gegen diesen Sequenzbereich Antikörper gebildet werden, die entsprechende HIV-Stämme zu neutralisieren vermögen.^{33,34} Die Infektion kann dadurch allerdings nicht langfristig inhibiert werden.

1998 konnten Kwong *et al.*²⁴ eine Röntgenstruktur eines Konstruktes von verkürztem gp120 mit einem Fragment von CD4 und einem Fragment eines CD4-induzierten Antikörpers kokristallisieren.²⁴ In der Röntgenstruktur waren N- und C-Terminus des gp120 um 52 bzw. 19 Aminosäuren verkürzt, die variablen Bereiche V1, V2 sowie V3 fehlten gänzlich und die *N*-Glycane waren enzymatisch mit Endo-H bis auf den ersten GlcNAc-Rest entfernt worden. In dieser, dem Kokristall zugeordneten Struktur, bildet das modifizierte gp120 eine innere und eine äußere Domäne, die durch ein viersträngiges β -Faltblatt (*bridging sheet*) miteinander verbunden sind. Es zeigte sich, dass das Bindungsepitop des verkürzten gp120 zum CD4 in sechs Peptidabschnitte überwiegend in den konstanten Regionen diskontinuierlich über die Sequenz des gp120 verteilt ist.²⁴ In den folgenden Jahren wurden weitere Röntgenstrukturen veröffentlicht; dazu zählt die Struktur von Huang *et al.*⁹³

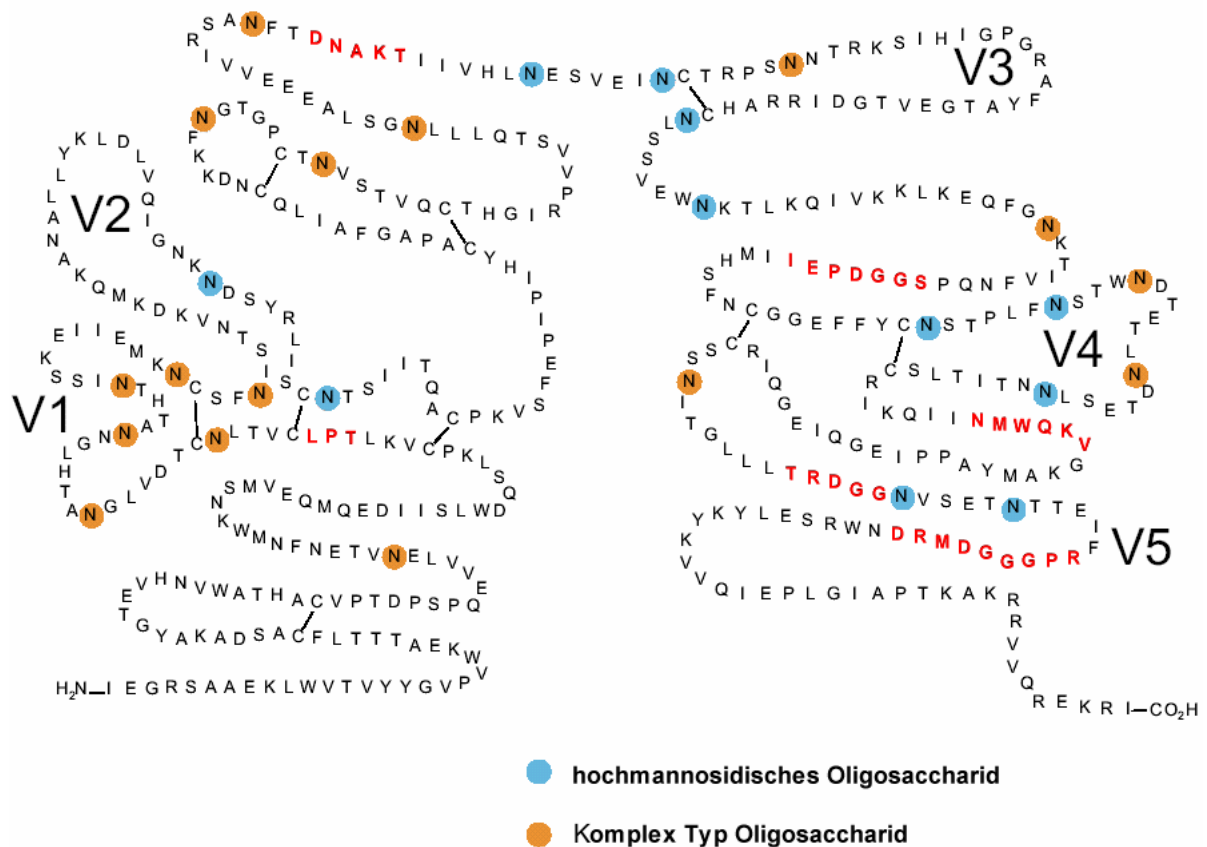


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines HIV-1 gp120 mit potentiellen Glycosylierungsstellen. Die Peptidsequenzen des gp120-*core*, die in der Röntgenstrukturanalyse von Kwong *et al.*²⁴ direkten Kontakt zu CD4 haben, sind rot dargestellt.^{24,32}

1.7 CD4-Rezeptor

Der humane CD4-Rezeptor auf T-Helferzellen ist das primäre Ziel des HIV. CD4 ist ein humanes Glycoprotein, das auf verschiedenen Zellen des Immunsystems zu finden ist, wie T-Helferzellen, Macrophagen, Monocyten, inflammatorischen T-Zellen und Thymocyten.³⁷ Der natürliche Bindungspartner des CD4 sind die MHC Klasse II-Proteine. Der extrazelluläre Anteil des CD4 ist in immunglobulinartigen Domänen unterteilt. Aus Röntgenstrukturdaten konnte ermittelt werden, dass für die Bindung des HIV²⁴, wie auch der Klasse-II-MHC-Proteine³⁸, die Domäne D1 essentiell ist.

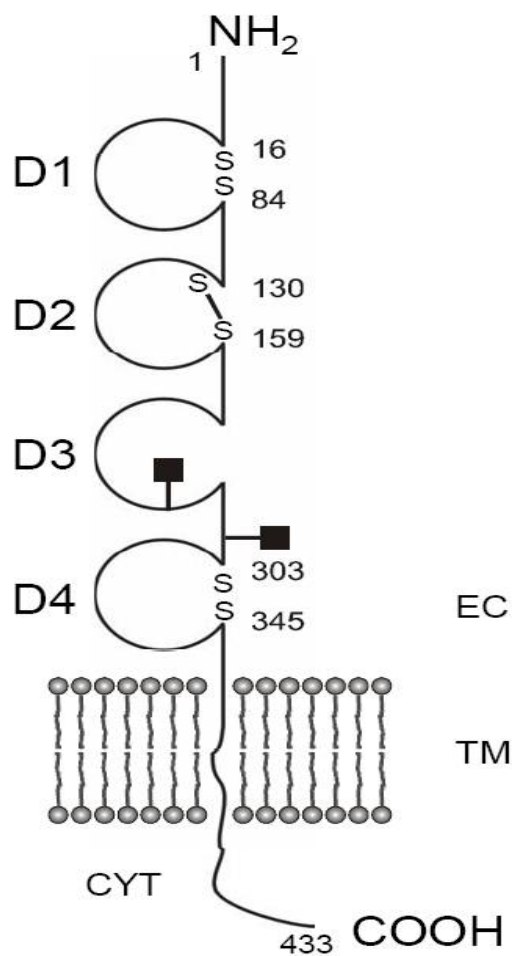


Abbildung 8: Schematischer Aufbau vom humanen CD4. D1 bis D4 sind die vier immunglobulinartigen Domänen, SS Disulfidbrücken, gefüllte Quadrate die Glycosylierungsstellen, TM die transmembrane-, EC die extrazelluläre- und CYT die cytoplasmatische-Region.³⁷

1.8 Die Korezeptoren CCR5 und CXCR4

HIV benötigt zur Infektion der Wirtszelle neben CD4 einen Korezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren. Diese Korezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR's).³⁹ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen mit über 1000 identifizierten Mitgliedern die größte Klasse an membrangebundenen Rezeptoren im Säuger genom dar. Sie besitzen ein Sieben-Helix-Transmembran-Motiv mit drei Loops (ECL 1-3) und einem N-terminalen Ende auf der extrazellulären Seite. Die natürliche Aufgabe der Chemokinrezeptoren liegt in der Erkennung von Chemokinen. Bei CCR5 sind das die CC-Chemokine CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) und CCL5 (RANTES). Der natürliche Ligand des CXCR4 ist das CXC-Chemokin SDF-1. Die natürliche Chemokin-Bindung führt über G-Proteine zur Stimulierung des Immunsystems und macht sich durch Antikörperproduktion bemerkbar.⁴⁰⁻⁴³ Außerdem führen Chemokine Leukozyten mittels Chemotaxis (*chemoattractant cytokines*) zu Entzündungsstellen.⁴⁴

Die verschiedenen Stämme des HIV können unterschiedliche Korezeptoren nutzen, wobei aus der Vielzahl von Chemokinrezeptoren für die HIV-Infektion *in vivo* vorwiegend die CCR5- und CXCR4-Rezeptoren von Bedeutung sind.⁴⁵

Die Korezeptoren CXCR4 und CCR5 bestimmen den Tropismus des Virus. So sind die HIV-1 in der asymptomatischen Phase der Infektion CCR5-spezifisch, befallen also vorwiegend Makrophagen (M-tropisch, R5). Während die Viren, die beim Ausbruch von *AIDS* vorliegen, vorwiegend T-Helferzellen mit CXCR4-Rezeptoren befallen (T-tropisch, X4).⁴⁵⁻⁴⁹

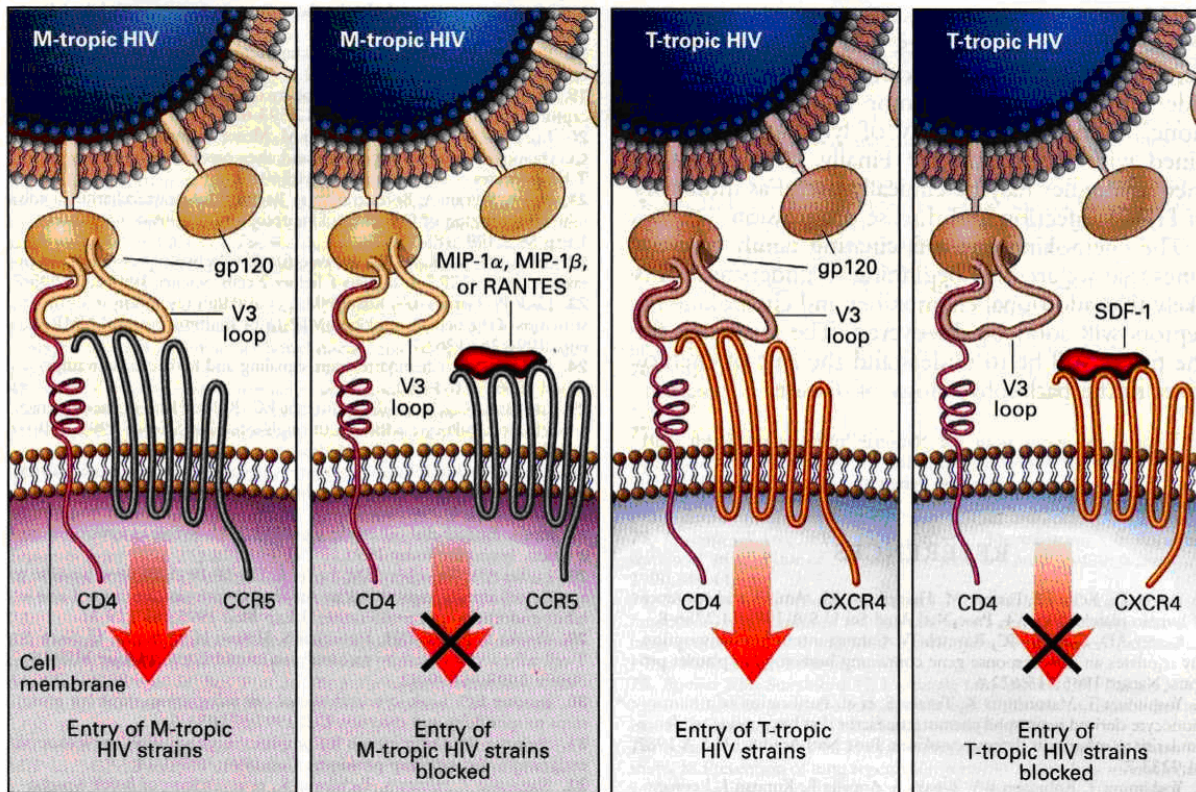


Abbildung 9: Die Darstellung gibt den unterschiedlichen Tropismus im Rahmen einer HIV-Infektion wieder. Am Anfang werden vorwiegend Makrophagen (M-tropisch, R5) befallen. Während die Viren, die beim Ausbruch von *AIDS* vorliegen, vorwiegend T-Helferzellen mit CXCR4-Rezeptoren befallen (T-tropisch, X4).¹⁹ Die Abbildung gibt auch wieder, dass die natürlichen Liganden MIP- α , MIP- β und Rantes bei Makrophagen bzw. SDF-1 bei T-Zellen bis zur Internalisierung als Inhibitoren auftreten können.⁷³

Die Relevanz des CCR5 als wichtigster Korezeptor für R5-HIV-1 Stämme zeigte sich anhand von Untersuchungen an Menschen, die dem Virus mehrfach ausgesetzt waren, ohne jedoch infiziert zu werden.^{71,72} Es wurde in einem der CCR5-Allele eine 32-Basenpaar-Deletion festgestellt (Δ 32-Deletion), wodurch diese Menschen einen verkürzten Korezeptor exprimieren, der nicht auf der Zelloberfläche präsentiert wird.^{50,51}

Die Abbildung 10 zeigt schematisch den Aufbau des humanen CCR5, der aus sieben transmembranständigen Helices (TM1-7), drei extrazellulären Loops (ECL1-3), drei intrazellulären Loops (ICL1-3) sowie dem extrazellulären N-Terminus und dem cytosolischen C-Terminus aufgebaut ist.⁵² Wie Substitutionsstudien ergeben haben, scheint der negativ geladene sulfotyrosin haltige N-Terminale Bereich des CCR5 für die Interaktion mit dem

HI-Virus von essentieller Bedeutung zu sein, da die Rezeptoraktivität durch Mutationen bzw. Substitutionen in dieser Region empfindlich gestört wurde.^{50,53}

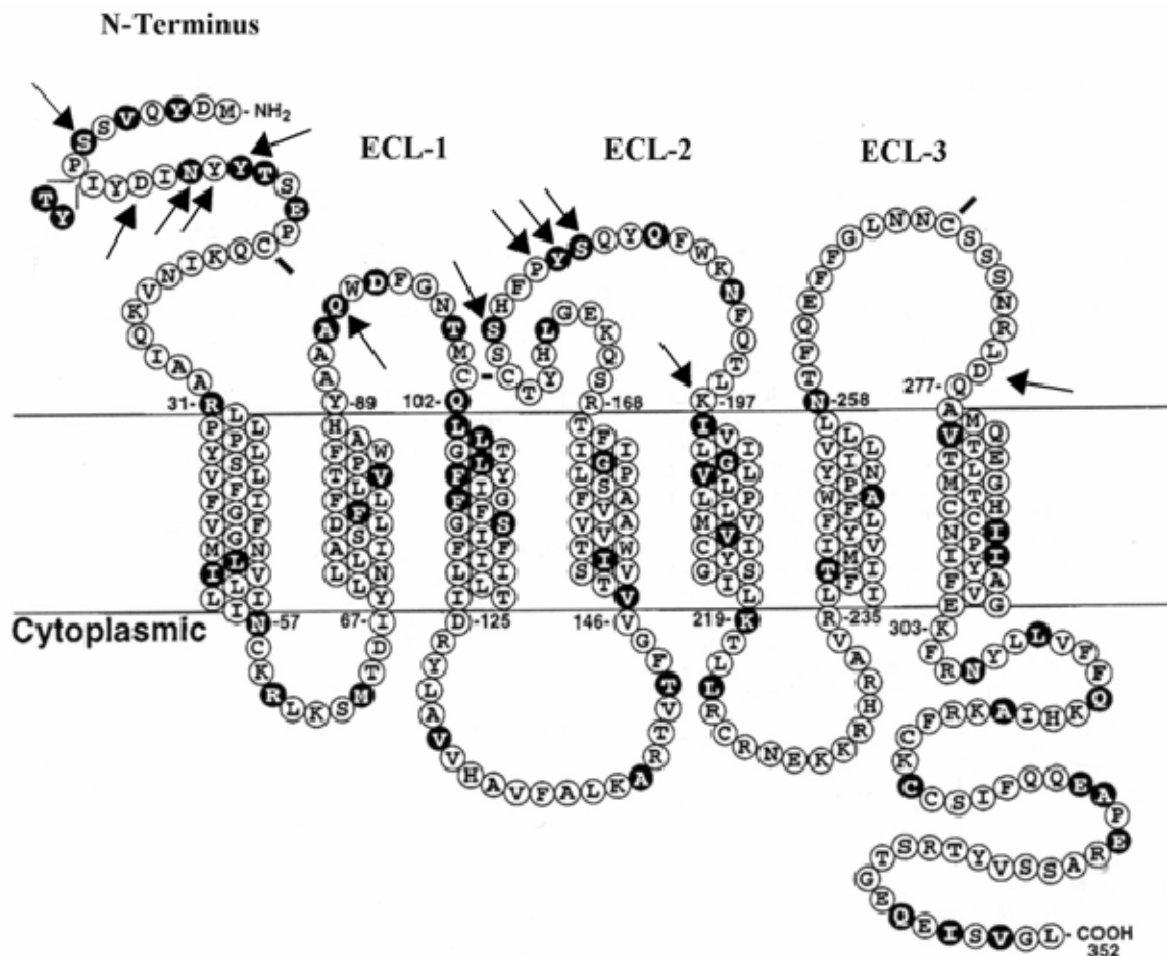


Abbildung 10: Schematische Darstellung der CCR5-Struktur. Schwarz hinterlegte AS kennzeichnen Unterschiede zum murinen CCR5. Pfeile markieren für die Korezeptor-Virus-Bindung essentielle Aminosäuren. Die TY-Reste zwischen Position 8 und 9 kennzeichnen Aminosäuren, die nur im murinen CCR5 vorhanden sind.⁵²

Ebenso sind verschiedene Aminosäuren der extrazellulären Domänen wahrscheinlich für die Bindung an das virale gp120 relevant, wobei im Besonderen der zweiten extrazellulären Loop (ECL2) große Bedeutung zugeschrieben wird. Dabei wird vermutet, dass einige dieser essentiellen Aminosäuren für die Ausbildung der bindungsaktiven Konformation des CCR5 verantwortlich sind, während andere das Bindungsepitop bilden. Die Unterdrückung der Sulfatierung der Tyrosinreste des N-terminalen Bereiches zeigte nachweislich auch einen

Einfluss auf die gp120/CCR5-Interaktion, wobei die natürliche Funktion der Sulfatierung nicht geklärt ist.⁵⁴

Während von GPCRs lange angenommen wurde, dass sie als monomere Strukturen auf der Zelloberfläche exprimiert werden, deuten neue Untersuchungen auf eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Rezeptoren hin.⁵² Der erste GPCR, für den eine Dimerisierung überzeugend nachgewiesen wurde, ist der Gamma-Aminobuttersäure Rezeptor B (GABA(B)). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor aus zwei unterschiedlichen GPCRs zusammengesetzt ist, wobei beide Rezeptoren GbR1 und GbR2 alleine nicht funktionsfähig sind. GbR1 wird durch ein C-terminales Retentionsmotiv im endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten, während GbR2 zwar auf der Zelloberfläche exprimiert wird, aber inaktiv ist. Durch die Dimerisierung der Rezeptoren wird das GbR1-Retentionsmotiv maskiert, und beide Rezeptoren werden als funktionelles Heterodimer auf der Zelloberfläche präsentiert.^{63,64,65} Den eindrucksvollsten Hinweis auf das physiologische Vorkommen von Dimerisierung liefert die konstitutive, das heißt die nicht Ligand-induzierte, Dimerisierung von Rhodopsin und Opsin in nativen Membranen von murinen Photorezeptoren.⁶⁶

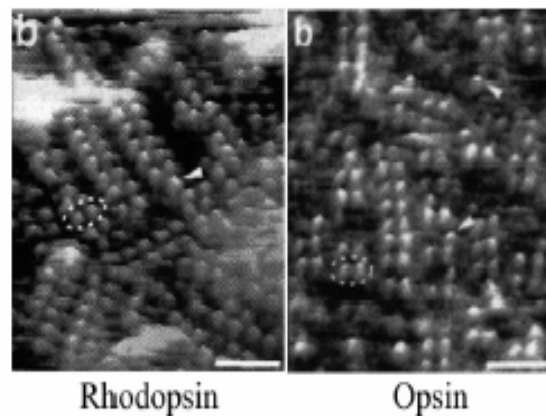


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt deutlich die zweireihige Anordnung der Rhodopsin- und Opsin-Rezeptoren, was darauf hindeutet, dass Rezeptordimerisierung nicht nur unter artifiziellen Bedingungen der Überexpression dieser Proteine auftritt.⁶⁶

1.9 Therapieansätze zur HIV-Bekämpfung

Die erfolgreiche Bekämpfung der HIV-Infektion ist durch die hohe Mutationsrate des Virus äußerst schwierig. Es gibt noch kein Medikament, das das Virus komplett aus dem Körper verdrängt bzw. eine Infektion verhindert. *Targets* für die Wirkstoffentwicklung können verschiedene Stadien des HIV-Lebenszyklus sein.³⁵

1.10 Inhibition der Protease und reversen Transkriptase

Die heute verfügbare hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART/ *highly active antiretroviral therapy*) ermöglicht es, dass Infizierte über viele Jahre symptomfrei leben können und erhöht deren Lebenserwartung.⁵⁵

Heutzutage werden überwiegend Medikamente der Gruppe der Protease Inhibitoren und der Reverse Transkriptase Inhibitoren in Kombinationstherapie eingesetzt, die eine Resistenzentwicklung gegen antivirale Therapeutika relativ gut unterdrücken.^{56,57} Die Protease Inhibitoren (PIs) binden an das aktive Zentrum der HIV-Protease. Wird die Protease gehemmt und unterbleibt dadurch die proteolytische Aufspaltung bzw. Reifung des viralen Vorläuferproteins, so entstehen nicht infektiöse Viruspartikel. Die Reverse Transkriptase Inhibitoren blockieren die katalytisch aktive Bindungsstelle, wodurch es zum Abbruch der DNA-Synthese kommt.

Eine vollständige Bekämpfung der Infektion kann durch die HAART-Therapie jedoch nicht erreicht werden. Hinzu kommen hohe Kosten für die Therapie und eine Vielzahl an Nebenwirkungen.

1.11 Entry-Inhibitoren

Die Bindung des HIV an die humane Zelle bietet ebenfalls gute Ansatzpunkte für die Wirkstoffentwicklung. Dabei bieten sich grundsätzlich drei Ziele auf der Wirtszelle an: Die Inhibition der Bindung an CD4, an die CCR5/CXCR4-Korezeptoren und die Blockierung der Fusion der Membranen. Eine antagonistische Blockierung von CXCR4 scheint nicht ohne Risiko zu sein, da eine Entfernung des CXCR4-Gens bei Mäusen zu tödlichen Entwicklungsstörungen des Fötus führte.⁵⁸ Die Blockierung des CCR5-Rezeptors ist weniger bedenklich, da bei der $\Delta 32$ -Deletion bislang keine negativen Effekte bekannt sind.⁵⁹

Das gp120 bietet einen weiteren Angriffspunkt, um die Bindung zwischen dem Virus und der menschlichen Zelle zu verhindern. Allerdings birgt dies Schwierigkeiten aufgrund der hohen Variabilität des HI-Virus.⁷¹

Inhibitoren für den CCR5-Rezeptor sind in der prä-klinischen Phase, in den klinischen Phasen I/II/III oder über der klinischen Phase hinaus. Zu den Inhibitoren mit abgeschlossener klinischer Phase gehören SCH-C, TAK-779, Efavirtide, CMPD 167 AMD3100, NSC 651016 und ALX40-4C.⁶⁰

Als Inhibitoren sind auch die natürlichen Liganden des Korezeptors, wie RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β , zu nennen.⁷² Sie zeigen antivirale Aktivität in vitro. Sie besitzen in vivo jedoch zu geringe Halbwertszeiten und werden in die Zelle internalisiert.⁷³

1.12 Chemokine

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine Untergruppe der Zytokine. Die Chemokine weisen, wie auch andere Zytokine, teils eine redundante Wirkung auf. Unter Redundanz versteht man, dass verschiedene Zytokine auf eine Zielzelle die gleiche Wirkung haben können.⁷⁵

Chemokine sind 8-14 kDa große Moleküle, die die Zellwanderung von verschiedenen Zellpopulationen steuern. Bis heute sind beim Menschen ca. 50 Chemokine identifiziert worden.

Eine konservierte Sequenz von Aminosäuren dient zur Einteilung der einzelnen Chemokine in vier Gruppen.⁶¹ Aus der Primärsequenz werden dazu vier konservierte Cysteine herangezogen, es gibt C-, CC-, CXC- und CXXXC-Chemokine. Das X repräsentiert jeweils eine zwischen den Cysteinen liegende Aminosäure.

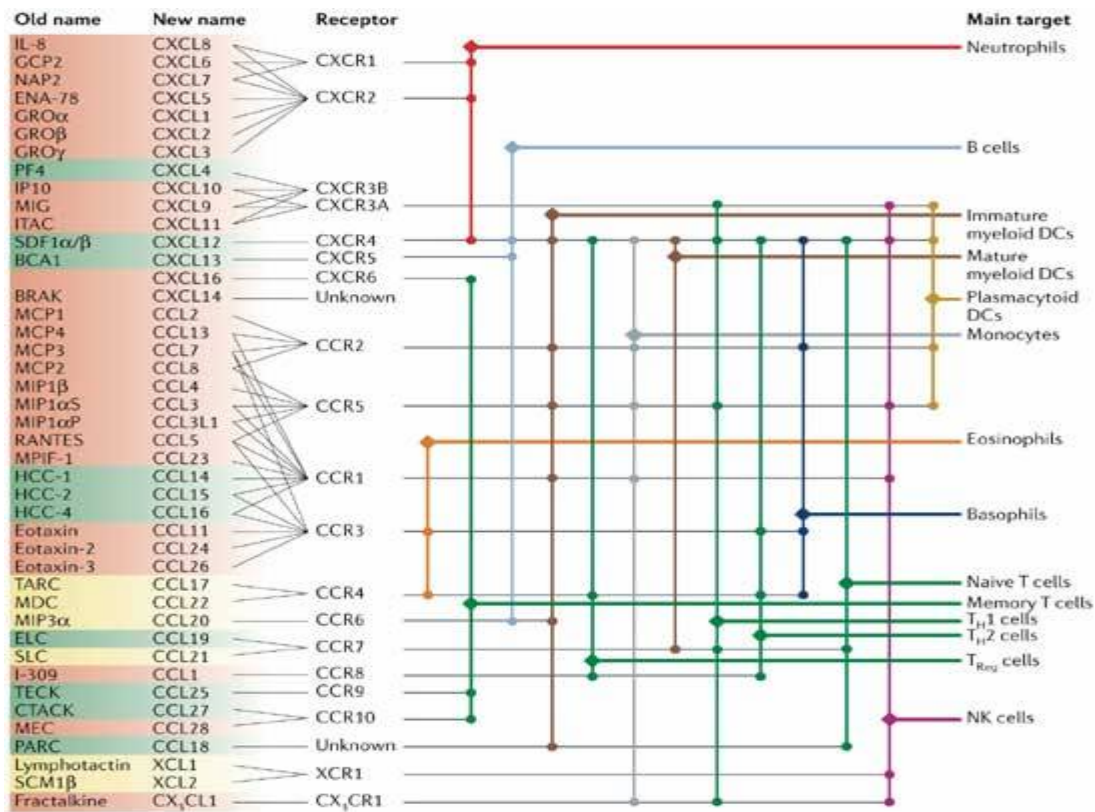


Abbildung 12: Gesamtüberblick der Chemokin-Familie.⁷⁴

2 Methoden

2.1 Molecular modelling

Die rasanten Entwicklungen in der Proteinchemie, der Genomsequenzierung und der Computertechnik verschmelzen zu einem völlig neuen Ansatz bei der Medikamentenentwicklung: dem *rational drug design* bzw. *receptor based design*. Ziel ist es, anhand der dreidimensionalen Struktur von Proteinen exakte Angriffspunkte für neue Wirkstoffe zu finden. Die Entwicklung dieser Strukturen kann mit Hilfe des *molecular modelling* durchgeführt werden.

Molecular modelling nutzt eine Vielzahl von computergestützten Anwendungen für die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von 3D-Molekülstrukturen sowie ihren physikochemischen Eigenschaften. Eine Methode des *molecular modelling* ist das *homology*

modelling. Beim *homology modelling* wird die unbekannte 3D-Struktur eines Proteins auf der Basis von verwandten Proteinen aufgebaut.^{76,77}

Das Verständnis der dreidimensionalen Struktur von Biomolekülen und ihrer Interaktionen spielt eine zentrale Rolle in der Genetik (Aufbau und Funktion der DNA, Transkription, Translation, Proteinbiosynthese, Mutationen), in der Medizin (Krankheiten, z.B. *AIDS*), in der Cytologie (Funktion von Enzymen und Aufbau von Zellstrukturen) sowie in der Physiologie (Funktion von Hormonen).⁷⁷

Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie ist eine beträchtliche Menge an Protein-Informationen verfügbar, wie die Protein-Primärsequenz. Für die Wirkstoffentwicklung ist in der Regel die Kenntnis der 3D-Konformation des Moleküls notwendig.⁸¹ Die *NMR*-Spektroskopie hat sich neben der Röntgenstrukturanalyse zur wichtigsten Methode zur Strukturbestimmung von Proteinen entwickelt. Leider können diese Methoden nicht bei allen biologisch interessanten Systemen angewendet werden.

Abbildung 13 zeigt die Protein-Datenmengen von drei verschiedenen frei zugänglichen Protein-Datenbanken: Die TrEMBL-Datenbank⁷⁸ enthält die Primärsequenzen fast sämtlicher Proteine. Sie basiert auf einer Nucleinsäuredatenbank. Die SwissProt-Datenbank⁷⁹ enthält neben den Primärsequenzen noch weitere Informationen, zu denen zum Beispiel die Funktion des jeweiligen Proteins gehört. Die PDB-Datenbank⁸⁰ enthält zusätzlich zu den Sequenzen die 3D-Strukturen der Proteine. Die Abbildung 13 zeigt deutlich die Problematik, dass der überwiegende Teil an Protein-3D-Strukturen unaufgeklärt ist.

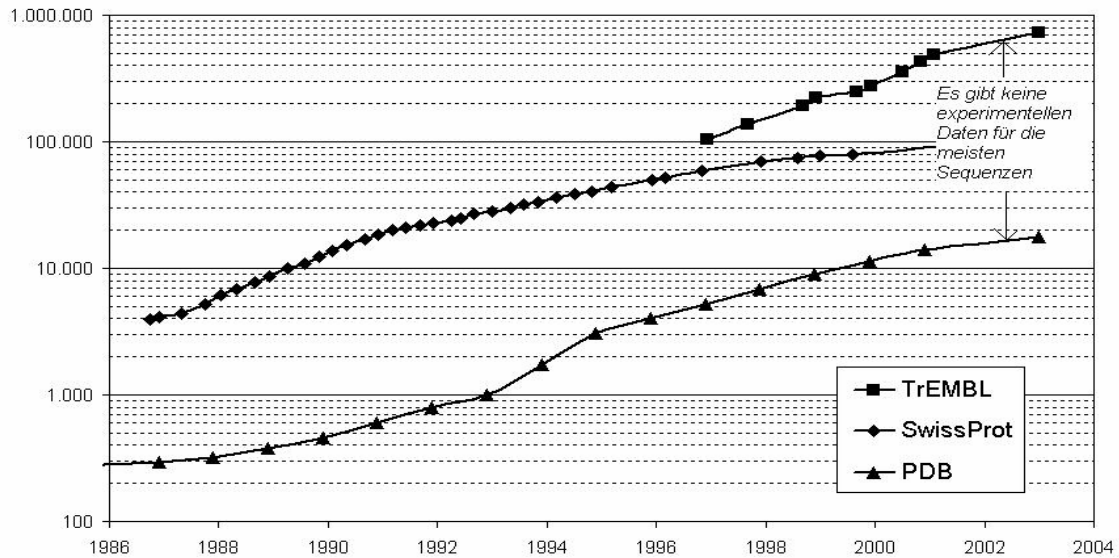


Abbildung 13: Öffentliche Protein-Datenbankbestände⁸² Die TrEMBL-Datenbank enthält die Primärsequenzen fast sämtlicher Proteine. Sie basiert auf einer Nucleinsäuredatenbank. Die SwissProt-Datenbank enthält neben den Primärsequenzen noch weitere Informationen, zu denen zum Beispiel die Funktion des jeweiligen Proteins gehört. Die PDB-Datenbank enthält zusätzlich zu den Sequenzen die 3D-Strukturen der Proteine. Die Abbildung zeigt deutlich die Problematik, dass der überwiegende Teil an Protein-3D-Strukturen unaufgeklärt ist.

Bei den PDB-Strukturen handelt es sich zum größten Teil um Proteine, von denen viele sich nur darin unterscheiden, dass sie von unterschiedlichen Spezies stammen. Ein kleiner Teil der Datenbank besteht aus Nucleinsäuren. Die Tabelle 1 zeigt eine genaue Aufschlüsselung der PDB.

		<i>Molecule Type</i>				
		<i>Proteins</i>	<i>Nucleic Acids</i>	<i>Protein/NA Complexes</i>	<i>Other</i>	<i>Total</i>
Exp. Method	<i>X-ray</i>	46197	1144	2127	17	49485
	<i>NMR</i>	6850	850	147	7	7854
	<i>Electron Microscopy</i>	165	16	59	0	240
	<i>Other</i>	110	4	4	9	127
	Total	53322	2014	2337	33	57706

Tabelle 1: Aufgelistet sind die Bestände der *Protein Data Bank* vom 19.05.2009. Aufgegliedert in die experimentellen Methoden mit denen die 3D-Strukturen entwickelt wurden und unterteilt in die Art der Naturstoffe.⁸⁰

Bei nicht realisierbarer experimenteller Strukturbestimmung besteht die Möglichkeit über das *molecular modelling* die 3D-Struktur zu entwickeln.

2.2 Kraftfeldmethoden

Eine vollständige quantenchemische Behandlung sehr großer Systeme ist für die Aufklärung komplexer Moleküle, wie bei Proteinen, ungeeignet, da der Rechenaufwand zu groß ist. Aus diesem Grund werden die quantenchemischen Berechnungen durch sogenannte Kraftfeld- oder *molecular-mechanics*-Methoden ersetzt, die weniger rechenintensiv sind. Kraftfeld-Methoden verzichten auf einen quantenchemischen Ansatz; das gesamte Problem wird mit den Gesetzen der klassischen Mechanik behandelt.⁷⁶

Die Kraftfeld-Methoden sind Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und Molekülenergien. Grundlage des Modells ist die Annahme, dass Bindungslängen und Bindungswinkel zwischen Atomen Standardwerte annehmen. Diese Standardwerte können Ergebnisse von quantenmechanischen Berechnungen sein oder werden empirisch, z.B. aus kristallographischen Daten, gewonnen. Zusätzlich enthält ein Kraftfeld weitere Terme für

nicht-kovalente Wechselwirkungen sowie einen Term für die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien und die Torsionswinkel. Optional können noch weitere Terme verwendet werden. Typische Kraftfelder im Bereich der Biopolymere sind, z.B. das CHARMM⁸³-, das AMBER⁸⁴-, das GROMOS⁸⁵- und das TRIPOS⁸⁶-Kraftfeld.⁷⁶

Jedes Kraftfeld besitzt einen bestimmten Parametersatz und zum Teil unterschiedliche Funktionen. So enthält zum Beispiel das TRIPOS-Kraftfeld Potenzialterme für Bindungslängen und -winkel, Torsionswinkel, Terme für die Verletzung der Planarität von speziellen Atomanordnungen sowie Terme für elektrostatische- und Van-der-Waals-Wechselwirkungen:⁹⁵

$$E_{\text{Kraftfeld}} = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsionswinkel}} + E_{\text{Planarität}} + E_{\text{vdWaals}} + E_{\text{Coulumb}}$$

Gleichung 1: TRIPOS-Kraftfeld Potenzialterme⁹⁵

$$E_{\text{Bindungslänge}} = \sum 0,5 k_{d,i} (d_i - d_{i,0})^2$$

Gleichung 2: Term für die Bindungslänge; d_i = Länge der i-ten Bindung (Å); $d_{i,0}$ =durchschnittliche Länge für i-te Bindung (Å); $k_{d,i}$ = Kraftkonstante (kcal/mol Å²)⁹⁵

$$E_{\text{Bindungswinkel}} = \sum 0,5 k_{i,Q} (Q_i - Q_{i,0})^2$$

Gleichung 3: Term für die Bindungswinkel; Q_i = Winkel zwischen zwei benachbarten Bindungen; $Q_{i,0}$ = Durchschnittswert für i-ten Winkel; $k_{i,Q}$ = Kraftkonstante(kcal/mol grad²)⁹⁵

$$E_{\text{Torsionswinkel}} = \sum 0.5 V_{\omega,i} [1 + S_i \cos(|n_i| \omega_i)]$$

Gleichung 4: Term für die Torsionswinkel; $V_{\omega,i}$ = Torsionsbarriere (kcal/mol); $S_i = +1$ Minimumsenergie bei gestaffelter Anordnung; $S_i = -1$ Minimumenergie bei ekliptischer Anordnung; n_i = Periodizität; ω_i = Torsionswinkel⁹⁵

$$E_{\text{Planarität}} = \sum 0.5 k_{\text{oop},i} d_i^2$$

Gleichung 5: Term für die Planarität (*out of plane*); d_i = Abstand zwischen dem Atom im Zentrum und der Fläche seines Substituenten (Å); $k_{\text{oop},i}$ = *out of plane* Bindungskonstante (kcal/mol)⁹⁵

$$E_{\text{vdWaals}} = 4\epsilon [(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6]$$

Gleichung 6: Term für die Van-der-Waals-Wechselwirkung (Lennard-Jones-Potenzial); ϵ und σ sind spezifische Lennard-Jones-Parameter für die „Potentialtiefe“ und den „Teilchenabstand“; r =Abstand⁹⁵

$$E_{\text{Coulumb}} = Q_i Q_j / r \epsilon$$

Gleichung 7: Term für das COLOUMB-Potenzial; ϵ = Dielektrizitätskonstante; Q_i, Q_j = Ladungen der Atome r = Abstand zwischen den Atomen⁹⁵

2.3 Energieminimierung

Die Energieminimierung ist eine Optimierungsmethode im Rahmen des *molecular modellings*. Optimierung bedeutet das Auffinden eines vorteilhaften Zustands eines Systems. Die vorteilhaften Zustände von Molekülen sind jene Punkte im Konfigurationsraum, welche mit einer minimalen molekularen Energie assoziiert sind. Wird das System durch ein mathematisches Modell quantifiziert, z.B. in Form von Kraftfeldern, dann lassen sich Optimierungsalgorithmen angeben, mit denen die gesuchten Punkte gefunden werden können. Da diese Punkte mit einer minimalen Energie assoziiert sind, spricht man im *molecular modelling* meist nicht von Optimierung, sondern von (Energie-)Minimierung.⁸⁷

Während der Minimierung wird die Geometrie des Moleküls schrittweise derart verändert, dass die Molekülenergie verringert wird. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis das nächstgelegene lokale (Energie-) Minimum erreicht ist.

Eine zu hohe innere Energie kann beispielsweise durch ungünstige Bindungslängen und -winkel oder durch zu geringe Abstände von Nachbaratomen bewirkt werden. Bei einer Minimierung wird die Struktur durch Einwirkung eines Kraftfeldes so modifiziert, dass sich im Idealfall korrekte Bindungswinkel, -abstände und Atomabstände ergeben. Durch ungünstige Ausrichtungen in der Ausgangsstruktur ist die Energie des Moleküls anfangs höher und nimmt im Laufe der Minimierung ab. Eine Minimierung findet das nächste lokale Minimum, aber ein Überwinden von Energiebarrieren ist nicht möglich, dadurch werden nur lokale Minima gefunden. Das globale Minimum kann in einigen Fällen durch eine MD-Simulation erreicht werden.¹¹¹

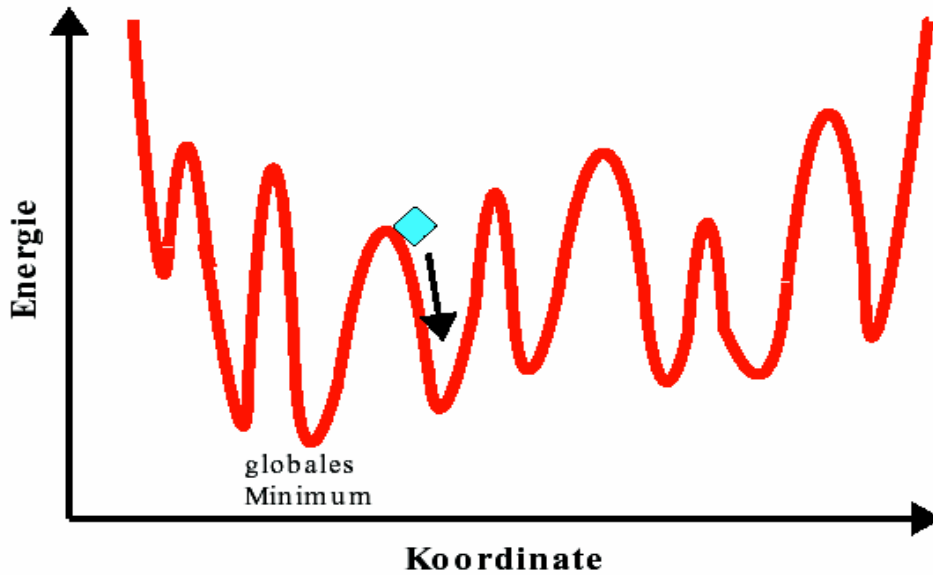


Abbildung 14: Eindimensionaler Schnitt durch die Energiehyperfläche eines biochemischen Moleküls. Die Energielandschaft zeichnet sich durch zahlreiche Minima ähnlicher Energie aus. Eine Energieminimierung ausgehend von einer bestimmten Startgeometrie (blaues Symbol) findet immer nur das nächstliegende lokale Energieminimum (Pfeil) und kann keine Energiebarrieren überwinden.¹¹¹

2.4 MD-Simulation

Die Moleküldynamik ist eine Methode zum Auffinden von Konformationen, bei der der gesamte Konformationsraum abgesucht wird.

Das Verfahren simuliert das dynamische Verhalten des Moleküls. Auf der Basis eines Kraftfeldes wird das Verhalten des Moleküls über die Zeit verfolgt. Als Grundlage dienen die Newton'schen Bewegungsgleichungen, die es erlauben, ausgehend von einem gegebenen Ausgangszustand, Ort, Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit jedes einzelnen Atoms zu einem späteren Zeitpunkt durch numerische Integration zu berechnen.⁷⁶

Während der molekulardynamischen Simulation werden die Atompositionen und deren Geschwindigkeiten als Funktion der Zeit berechnet, so dass eine so genannte „Trajektorie“ für das molekulare System erstellt wird (Animation der atomaren Bewegungen).⁷⁶

$$F_i(r_i) = m_i \left(\partial^2 r_i / \partial t^2 \right) = -\nabla_i [E(R_i)] \quad i = 1 \dots N$$

Gleichung 8: Newton'sche Bewegungsgleichung; F_i : Kraft, die auf ein Atom wirkt; r_i : Ortsvektor des i 'ten Atoms; m_i : Masse des i 'ten Atoms; t : Zeit; ∇ : Nabla-Operator; $E(R_i)$: Potenzialfunktion; Potenzial aller n Teilchen, das auf Teilchen i wirkt.⁷⁷

$E(R_i)$ ist eine Funktion aller $3N$ Koordinaten und beschreibt die potenzielle Energie des Systems. Zu jeder Struktur gehört ein relativer Energiewert. Energie und Struktur spannen einen mehrdimensionalen Raum, die so genannte Energiehyperfläche bzw. Potenzialhyperfläche, auf. Der Ausdruck Potenzialhyperfläche impliziert zwei generelle Eigenschaften: Der Term „Potenzial“ suggeriert, dass die Energie als Funktion von Positionsvariablen beschrieben werden kann. Der Term „Fläche“ impliziert seinerseits, dass die Energie als Funktion dieser Positionsvariablen kontinuierlich ist.⁷⁶

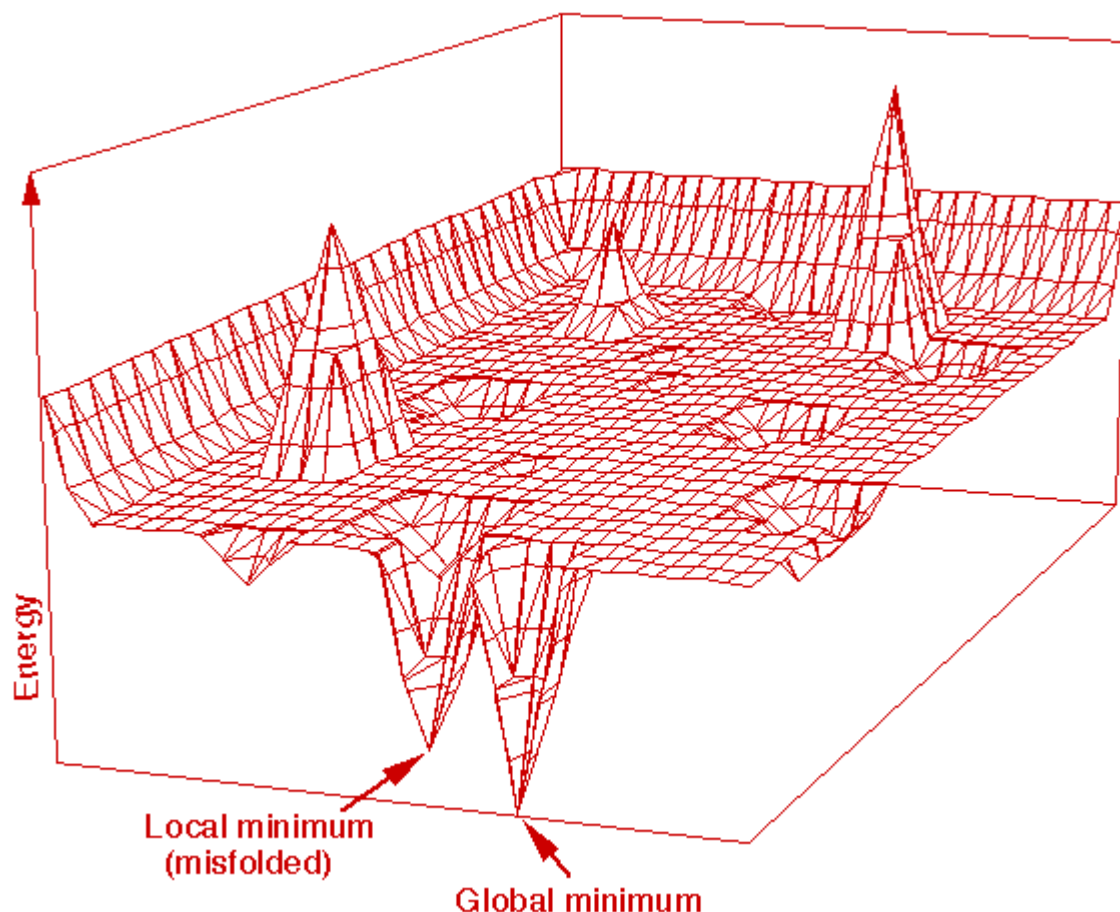


Abbildung 15: Potenzialhyperfläche; sie gibt die Orientierung der Atome im Verhältnis zur Energieänderung wieder. Die Übergänge sind kontinuierlich, was durch die Fläche zum Ausdruck kommt.¹¹²

Die einfachste Methode, um die Newton'sche Bewegungsgleichung zu lösen, ist der Verlet-Algorithmus. Dabei ersetzt man in Gleichung 8 die zweite Ableitung durch den Differenzialquotienten:⁹⁶

$$\partial^2 r / \partial t^2 = r(t + \Delta) - 2r(t) + r(t - \Delta) / \Delta^2$$

Gleichung 9: Lösungsansatz der Verlet-Methode; Δ : Zeitschritt einer Simulation⁹⁶

Da man die Position der Atome zum gegenwärtigen Zeitpunkt und zusätzlich die Kräfte kennt, kann man die Positionen für den nächsten Zeitschritt berechnen und bekommt damit die nächste Struktur:

- (1) Vorgabe der Startstruktur zum Zeitpunkt $t = 0$
- (2) Berechnung der Kräfte F_i , die auf jedes Atom i wirken
- (3) Inkrementierung: $t = t + \Delta t$
- (4) Berechnung von v_i und r_i für jedes Atom i und damit Berechnung der Struktur zum Zeitpunkt $t + \Delta t$
- (5) Start der nächsten Berechnung wieder bei (2)

Der gewählte Zeitschritt liegt im Femtosekunden-Bereich. Große Konformationsänderungen, z.B. α -Helix nach β -Faltblatt, können nur mit sehr hoher Rechenleistung vollzogen werden. Dies ist beispielsweise im Rahmen des *Blue-Gene*-Projektes von *IBM*, zumindest bei kleinen Molekülen, möglich.⁹⁷

Bei dem beschriebenen Verfahren der Energieminimierung wird die Energie des Moleküls in einer berechneten energieminierten Molekülgeometrie bestimmt. Dies entspräche den Eigenschaften eines Moleküls bei 0 K. Im Gegensatz dazu ist bei der MD-Berechnung den Atomen eine kinetische Energie zugeordnet. Diese erlaubt es dem System Energiebarrieren zu überwinden, um lokale Minima zu verlassen, womit sich die Möglichkeit ergibt zum globalen Minimum zu gelangen.⁷⁷

2.5 Protein-Ligand-Docking

Eine wichtige Funktion von Enzymen und Rezeptoren ist, dass sie zu spezifischer Wechselwirkung mit Liganden in der Lage sind. Der Begriff Docking beschreibt das Einpassen eines Liganden in die Bindungstasche eines Rezeptors oder Enzyms. Diese Docking-Vorgänge werden wesentlich durch verschiedene geometrische und nichtgeometrische Oberflächeneigenschaften, wie etwa Krümmung, Ladung und Hydrophobie gesteuert.⁹⁸

Mit dem computersimulierten Protein-Docking kann die Frage untersucht werden, ob und wie ein Protein mit einem Liganden einen stabilen Komplex bildet. Somit ist das Protein-Docking folgendermaßen definiert:

Seien die räumlichen Strukturen der Proteine A und B gegeben, von denen bekannt ist, dass sie einen Komplex AB bilden, dann versteht man unter dem Docking die korrekte Vorhersage der Komplexstruktur AB. Dadurch wird eine relative Positionierung der Moleküle zueinander erhalten, wobei die Position des Liganden am Rezeptor bzw. an einer Bindungstasche so variiert wird, dass die größtmögliche Bindungsenergie resultiert.

Es gibt verschiedene Ansätze für das Protein-Docking. Der einfachste Ansatz betrachtet Proteine als starre Gebilde. Man spricht vom *rigid body docking*. Dieser Ansatz geht auf das bekannte Schlüssel-Schloss-Prinzip zurück, das Emil Fischer 1894 vorschlug.¹⁰⁰ Dieses Modell besagt, dass die zu dockenden Proteine starre Körper sind, die geometrisch komplementäre Regionen besitzen. Mit der Entwicklung leistungsfähiger Computer und Programme ist es zunehmend möglich, Proteinflexibilität während des Dockings zu berücksichtigen.⁷⁷

Ein Hauptaugenmerk liegt darauf, welche Domänen für die Bindung verantwortlich sind. Von Interesse ist auch, ob es zu einer Konformationsänderung während der Komplexbildung kommt.⁹⁹ Trägt der Komplex einen Nicht-Protein-Anteil, wie z.B. bei einem glycosylierten Protein, so kann bei der Docking-Studie auch dieser Anteil mit in die Untersuchung einbezogen werden. Der Blick richtet sich hierbei auf eine direkte Wechselwirkung des Nicht-Protein-Anteils mit dem Protein und ob es bei der Entfernung, z.B. des Kohlenhydratanteils, zu einer Konformationsänderung des Proteins kommt, was ein verändertes Docking-Verhalten zur Folge haben kann.

Computergestütztes Docking kann dazu beitragen, einen Inhibitor zu finden, der eine Interaktion zwischen einem Virus und einer Wirtszelle blockiert. Eine Methodik hierfür ist es, Datenbanken mit 3D-Molekülstrukturen mittels automatischen *screening*-Programmen nach

Strukturen zu durchsuchen, welche die Bindungstasche des *target*-Proteins möglichst optimal ausfüllen. Ein solches Molekül wäre ein potenzielles Therapeutikum.¹⁰

3 Problemstellung

In der Anfangsphase der HIV-1-Infektion dominieren R5-Stämme, die zur Infektion der Zelle den Korezeptor CCR5 nutzen. Stämme, die andere Korezeptoren verwenden, treten erst im späteren Verlauf der Infektion auf. Dadurch wird CCR5 bzw. die Blockierung der gp120-CCR5-Wechselwirkung zu einem interessanten *target* für die Entwicklung von HIV-Inhibitoren.

Um eine entsprechende Substanz zu entwickeln, die CCR5 blockieren könnte, ist es zunächst erforderlich die Struktur des CCR5-Rezeptors und die Bindung der V3-Loop des gp120 aus dem HIV-1 an dem Rezeptor aufzuklären.

Ziel dieser Arbeit ist den HIV *entry* im Abschnitt der Interaktion der V3-Loop des gp120 aus dem HIV-1 mit dem humanen Korezeptor CCR5 anhand von Struktur-Modellen zu analysieren. Die Untersuchungen sollen mit Hilfe theoretischer Methoden durchgeführt werden, da die Struktur von CCR5 experimentell bis heute nicht zugänglich ist.

Die Analyse der Interaktion soll unter anderem mit Docking-Verfahren erfolgen. Dabei sollen Modelle der V3-Loop, aber auch der natürlichen Liganden, wie MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES verwendet werden, um Informationen über das Bindungsverhalten zu erhalten. Näher betrachtet werden soll dabei auch der Einfluss der sulfatierten Tyrosine aus dem N-Terminus von CCR5.

Die Ergebnisse des Dockings sollen anschließend mit Resultaten aus experimentellen Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Meyer verglichen werden. Des Weiteren soll der im Rahmen der Arbeit modellierte Teil der CCR5/V3-Wechselwirkung in den Gesamtkontext des *entry* Prozesses von HIV gestellt werden.

Durch ein *in silico* Alanin-scan soll der Einfluss von bestimmten Aminosäuren aus dem CCR5-Rezeptor untersucht werden. Die Untersuchungen sollen im Rahmen von MD-Simulationen durchgeführt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die experimentelle Strukturaufklärung des Korezeptors CCR5 und der V3-Loop aus dem gp120 gestaltet sich äußerst schwierig. Ursache hierfür sind unter anderem der Einbau des CCR5 in die Zellmembran und die große Flexibilität der V3-Loop. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Strukturmodellen gearbeitet. Die Modelle stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. B. Meyer. Das V3-Modell wurde mit Hilfe von 2D-NMR Daten entwickelt.⁸⁹ Das CCR5-Modell ist mit Hilfe des *homology modelling* Verfahrens generiert worden.⁹⁰ *Bovines Rhodopsin (chain A/PDB-Code 1f88)* diente als Protein-Template.

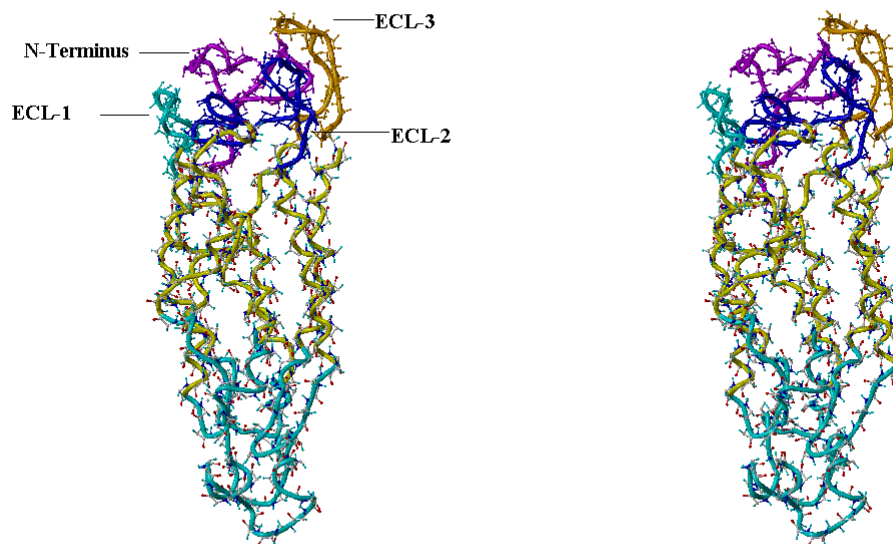


Abbildung 16: Dargestellt ist das *backbone* der CCR5-Modell-Struktur, die mit dem *homology modelling* Verfahren basierend auf der 3D-Struktur von *bovines Rhodopsin* entwickelt wurde. Cyan farbend ist der intrazelluläre Bereich, gelb der transmembran Abschnitt. Der extrazelluläre Bereich ist untergliedert in ECL-1 (cyan), ECL-2 (blau), ECL-3 (orange) und N-Terminus (violett). (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon/capped stick*)

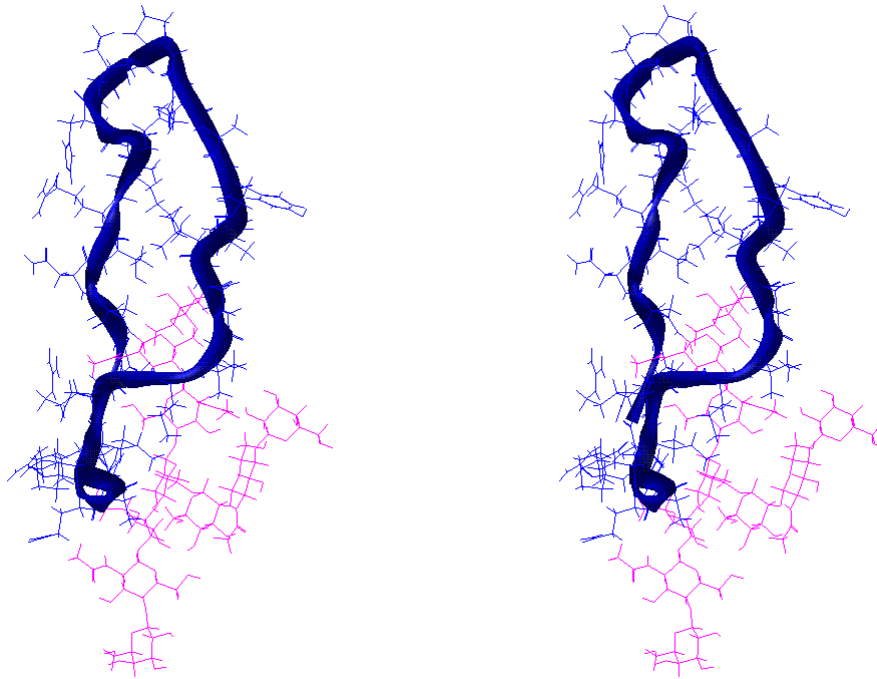


Abbildung 17: Abgebildet ist ein aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer entwickeltes V3-Loop-Modell.⁸⁹ Blau ist der Peptidanteil dargestellt; die blaue Schleife stellt das Peptidrückrad dar; magenta farbend ist der Kohlenhydratanteil. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon/line*; Ansicht: *stereo view*)

4.1 Einfluss sulfatierter Tyrosine auf den HIV entry

Die Sulfatierung der Tyrosin-Reste im N-Terminus des CCR5 bedingt die optimale Funktion des Rezeptors, sowohl in seiner natürlichen Funktion als Chemokin-Rezeptor aber auch beim HIV entry.⁵⁴

MET1=ASP2=**TYR3**=GLN4=VAL5=SER6=SER7=PRO8=ILE9=**TYR10**=ASP11=ILE12=ASN13=**TYR14**=**TYR15**=THR16=SER17=GLU18=PRO19=CYS20=GLN21=LYS22=ILE23=ASN24=VAL25=LYS26=GLN27=ILE28=ALA29=ALA30=ARG31-

Abbildung 18: Primärsequenz des N-Terminus des humanen Korezeptors CCR5. Blau hervorgehoben sind die Tyrosine im Bereich des N-Terminus, denen bei der Funktionalität des Rezeptors eine besondere Bedeutung zukommt.⁸⁰

Substitutionsstudien, in denen die in Abbildung 18 blau markierten vier Tyrosine durch Phenylalanine ersetzt wurden, zeigten, dass die Bindung zu den Chemokinen CCL3 (MIP-1 α) und CCL5 (RANTES) um den Faktor 100 abnimmt. Es ist nicht geklärt, warum nicht alle vier Tyrosine im Bereich des N-Terminus von CCR5 einen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors haben und warum sich ein Vorteil durch die Sulfatierung ergibt⁶⁷⁻⁷⁰

In der Abbildung 19 ist der extrazelluläre Bereich des CCR5-Modells zu sehen. Zu erkennen sind die drei Endgruppen der sulfatierten Tyrosine Y3, Y10 und Y14, die sich zur Oberfläche des Rezeptors hinorientiert haben. Zur besseren Wahrnehmung sind in der Abbildung 20 alle Aminosäuren, außer den drei sulfatierten Tyrosinen, des extrazellulären Bereiches von CCR5 ausgeblendet.

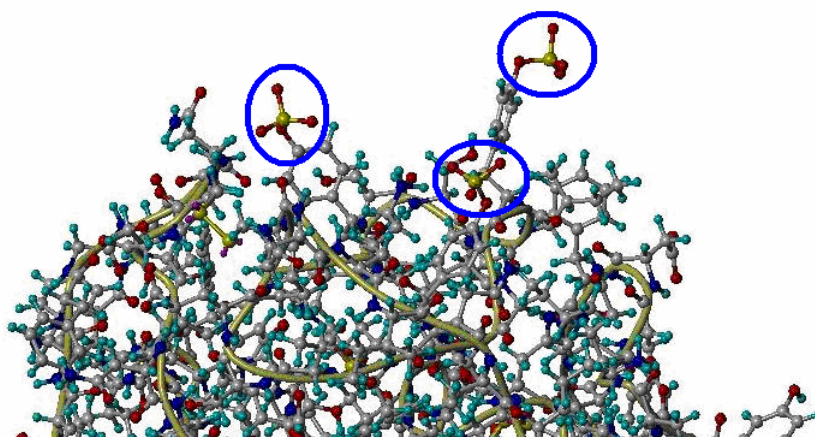


Abbildung 19: Extrazellulärer Bereich des CCR5-Modells. Einkreist sind die drei zur Oberfläche des Rezeptors gerichteten sulfatierten Tyrosine Y3, Y10 und Y14 aus dem N-Terminus von CCR5. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ball and stick*)

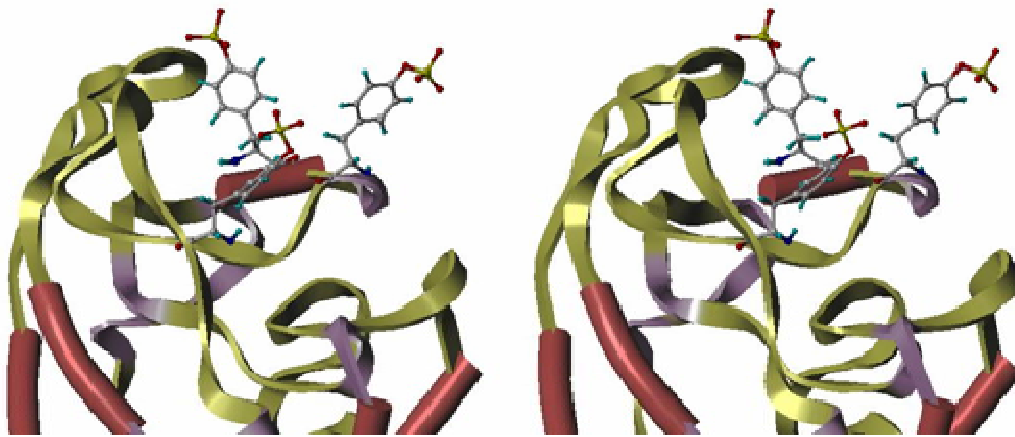


Abbildung 20: Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit im Vergleich zur Abbildung 19 sind, außer den drei sulfatierten Tyrosinen Y3, Y10 und Y14 aus dem N-Terminus von CCR5, die restlichen Aminosäuren des extrazellulären Bereiches von CCR5 ausgeblendet. (Extrazellulärer Bereich des CCR5-Modells; Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon-tube/ball and stick*)

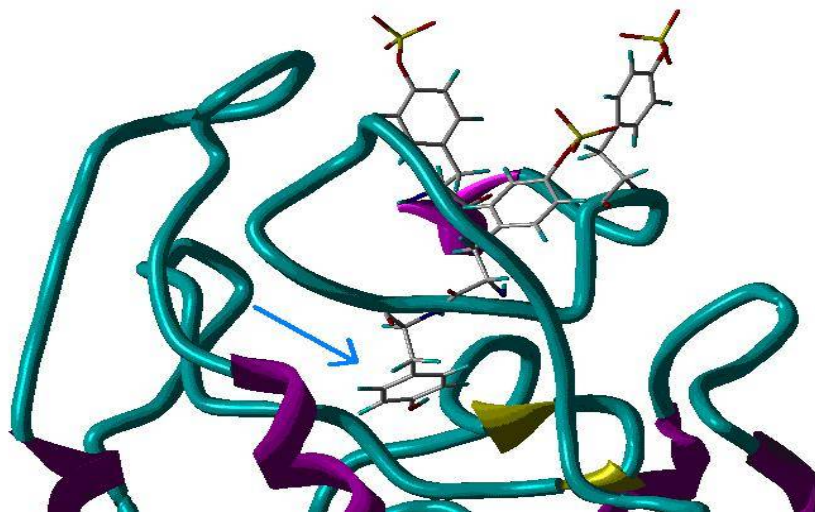


Abbildung 21: Eingebildet sind die drei zur Oberfläche des Rezeptors gerichteten sulfatierten Tyrosine Y3, Y10 und Y14 aus dem N-Terminus von CCR5. Zusätzlich, im Vergleich zur Abbildung 20, ist Y15 (blauer Pfeil), das im Gegensatz zu den Tyrosinen Y3, Y10 und Y14 in den Rezeptor hineinragt, eingebildet. Es steht damit für eine Wechselwirkung mit einem Liganden nicht zur Verfügung. (Extrazellulärer Bereich des CCR5-Modells; Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon-tube/capped stick*)

Die drei zur Oberfläche des Rezeptors gerichteten sulfatierten Tyrosine sind Y3, Y10 und Y14 aus dem N-Terminus von CCR5. Y15 ist, wie in Abbildung 21 ersichtlich, innerhalb des Rezeptors nach innen gerichtet; somit hat die Sulfatierung keinen Einfluss auf die Wechselwirkung des Rezeptors mit einem Liganden. Dieser aus dem CCR5-Modell abgeleitete Rückschluss ist deckungsgleich mit den Ergebnissen von T.Dragic *et al.*⁴²

Im Rahmen der Arbeit von T.Dragic *et al.*⁴² wurde je ein Tyrosin aus dem N-Terminus von CCR5 gegen Phenylalanin ausgetauscht und die Veränderung der Aktivität des Rezeptors gegenüber der ursprünglichen Infektion gemessen. Die Durchführung des Versuches erfolgte mit R5 tropen Viren und mit dualtropen Viren. Es zeigte sich, dass die Aktivität gegenüber dem Wildtyp bei der Substitution von den Tyrosinen an den Positionen Y3, Y10 und Y14 durch Phenylalanin deutlich abnahm. Bei dem R5 stämmigen Ansatz hingegen, der am Beginn der HIV-Infektion primär infiziert wird, gab es keinen Aktivitätsverlust durch den Austausch von Tyrosin 15 gegen Phenylalanin.

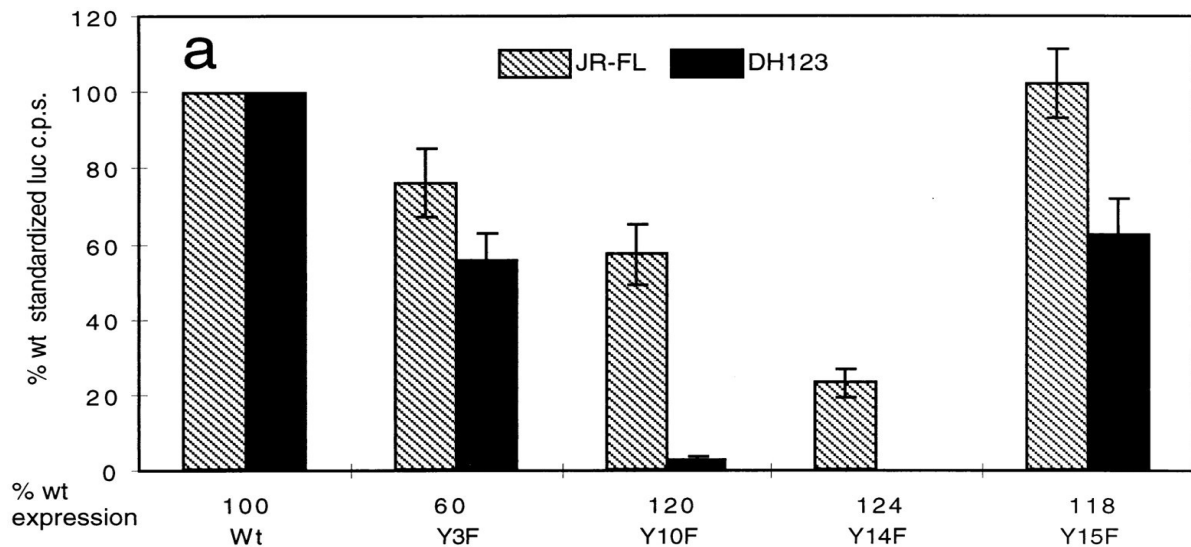


Abbildung 22: Aufgetragen sind die unterschiedlichen Aktivitäten des CCR5-Rezeptors, bei Substitution der Tyrosine im Bereich des N-Terminus gegen Phenylalanin. Die gestreiften Balken stellen die R5-Zellen dar, die im Anfangsstadium der HIV-Infektion im Vordergrund stehen. Die schwarzen Balken stellen die dualtropen Zellen dar, wodurch die CXCR4 tragende Zelltypen berücksichtigt werden, die im späteren Verlauf der Infektion infiziert werden. Wt: Wildtyp Rezeptor; alle vier Tyrosine sind vorhanden; dementsprechend liegt die Aktivität bei 100%. Y3F, Y10F und Y14F zeigen alle einen Aktivitätsverlust beim Austausch gegen Phenylalanin. Die Substitution von Y15 zeigt bei den R5-Zellen keinen Aktivitätsverlust; damit hat dieses Tyrosin wahrscheinlich keinen Einfluss auf den *entry* Prozess.⁴²

Nach dieser Erkenntnis richtete sich der Fokus im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit auf die Fragestellung, inwiefern eine Sulfatierung der Tyrosine zu einer erhöhten Aktivität des CCR5-Rezeptors führt.

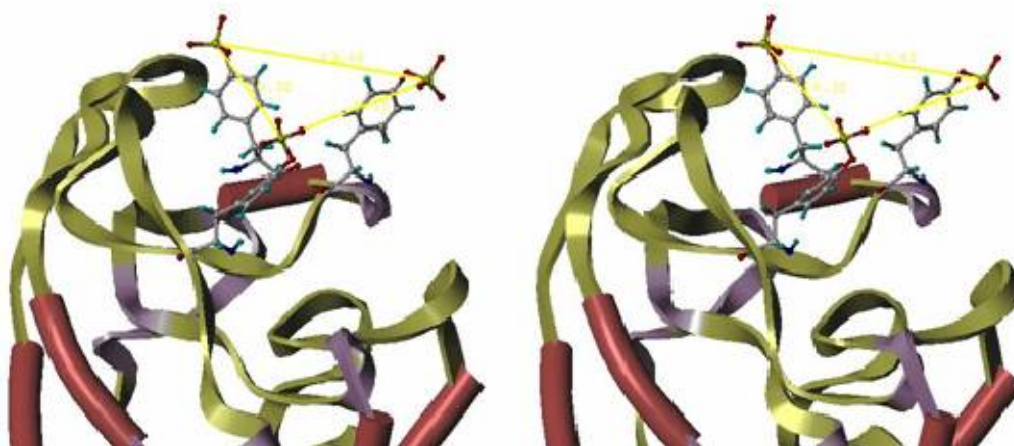


Abbildung 23: Die sulfatierten Tyrosine Y3, Y10 und Y14 bilden ein negativ geladenes Dreieck. (extrazellulärer Bereich des CCR5-Modells; Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon-tubelball and stick*; Ansicht: *stereo view*)

Die Sulfatierung der Tyrosine hat zur Folge, dass die Tyrosine negativ geladene Endgruppen tragen. Somit spannt sich am extrazellulären Bereich des CCR5-Rezeptors ein negativ geladenes Dreieck auf.

Eine starke Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und zum Beispiel einem Chemokin oder HIV-1 könnte sich ausbilden, wenn sich ein korrespondierendes positiv geladenes Dreieck im Liganden befinden würde. Dieses positiv geladene Dreieck könnte, wie in Abbildung 24 angedeutet, aus Aminosäuren mit positiven Endgruppen, wie Lysin oder Arginin, gebildet werden.

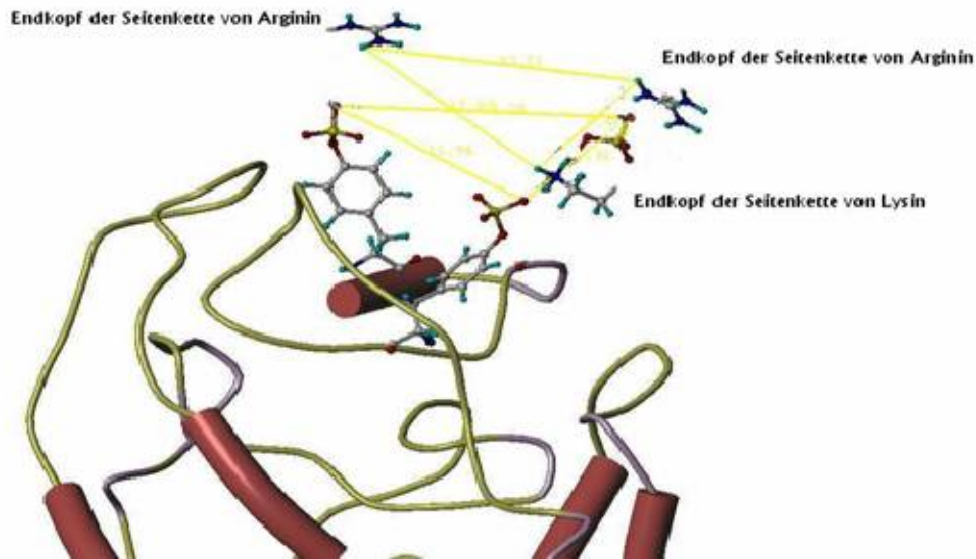


Abbildung 24: Eine ideale Wechselwirkung könnte sich ergeben, wenn dem negativen geladenen Dreieck der sulfatierten Tyrosine aus dem CCR5 ein positiv geladenes Dreieck des Liganden gegenüber stehen würde; dieses könnte aus den positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin gebildet werden. (Extrazellulärer Bereich des CCR5-Modells; Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon-tube/ball and stick*)

Beim Betrachten der Primärsequenz der V3-Loop aus dem gp120 vom HIV-1 zeigt sich, dass die Aminosäuren Arginin und Lysin ein Teil der Sequenz bilden.

CYS296=THR297=**ARG298**=PRO299=ASN300=ASN301=ASN302=THR303=**ARG304**=**LYS305**=SER306=ILE1307=HIS1308=ILE1309=GLY1310=PRO311=GLY1312=ARG313=ALA1314=PHE315=TYR316=THR317=THR318=GLY319=GLU320=ILE321=ILE322=GLY323=ASP324=ILE325=ARG326=GLN327=ALA328=HIS329=CYS330

Abbildung 25: *North American Consensus Sequence* der V3-Loop aus dem gp120.¹⁰² Blau dargestellt sind drei der positiv geladenen Aminosäuren.

Das V3-Modell (Abbildung 26) zeigt, dass die drei blau markierten Aminosäuren aus Abbildung 25 eine zur Oberfläche gerichtete Dreiecks Orientierung einnehmen.

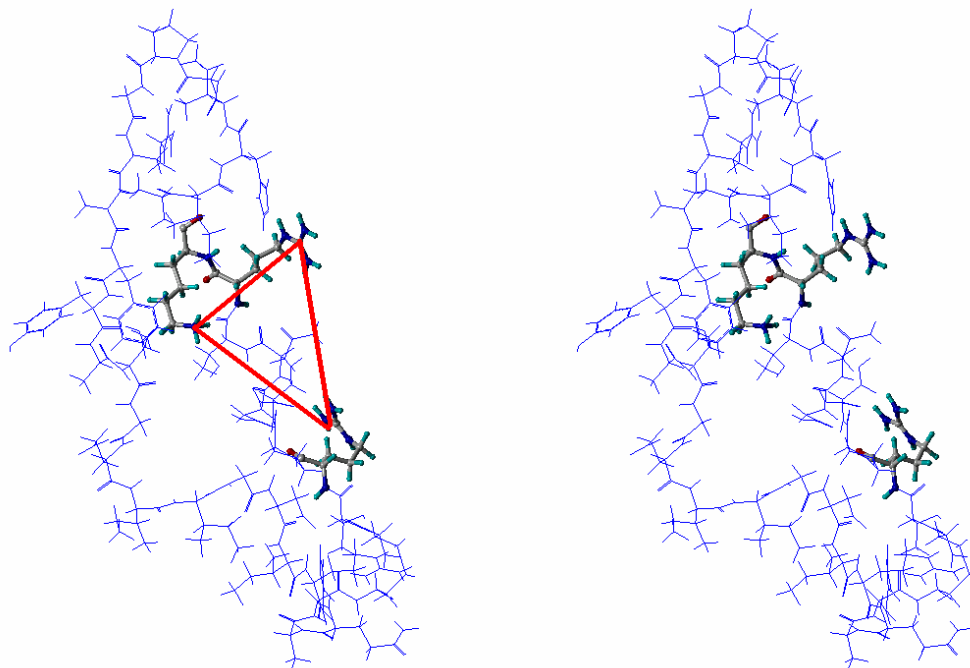


Abbildung 26: Die Aminosäuren ARG 298, ARG 304 und LYS 305 aus der V3-Loop des gp120 bilden eine Dreiecks Konformation aus. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *line/ball and stick*; Ansicht: *stereo view*)

Im Gegensatz zum negativ geladenen Dreieck aus dem extrazellulären Bereich des CCR5-Rezeptors liegt in der V3-Loop eine positiv geladene Dreiecks-Konformation vor.

Könnte sich die V3-Loop und der CCR5-Rezeptor so orientieren, dass sich die Dreiecke überlagern, würde eine starke elektrostatische Wechselwirkung resultieren. In Abbildung 27 ist das CCR5-Modell dahingehend orientiert, dass sich das negative Dreieck aus dem CCR5-Rezeptor und das positive Dreieck aus der V3-Loop direkt überlagern.

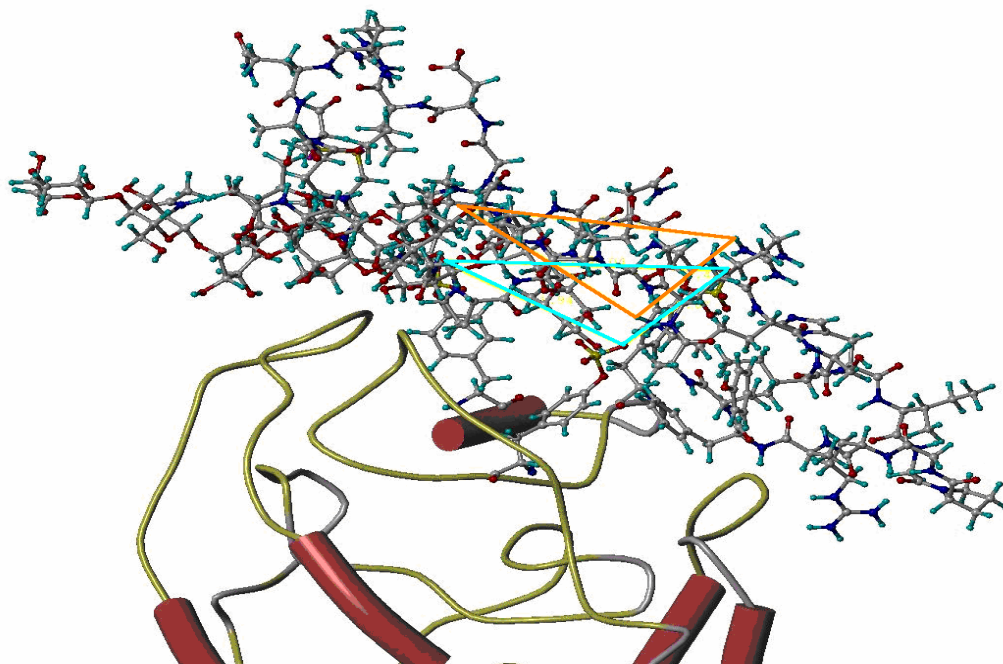


Abbildung 27: Das V3-Modell ist so zum Rezeptor orientiert, dass sich das negative Dreieck aus dem CCR5-Rezeptor (cyan) und das positive Dreieck aus der V3-Loop (orange) direkt überlagern. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ribbon-tube/ball and stick*)

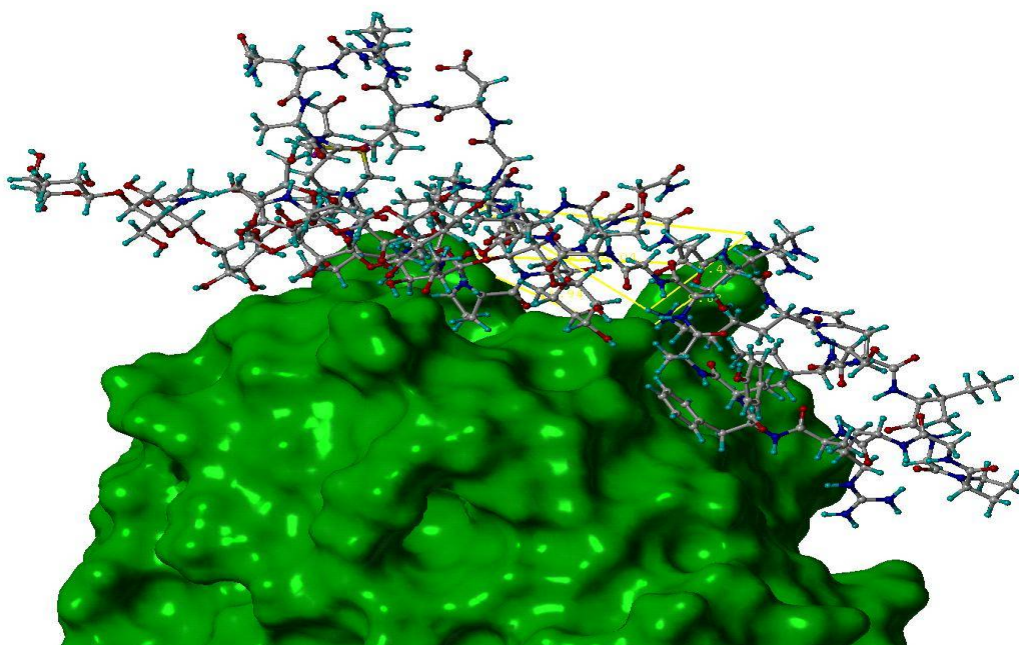


Abbildung 28: Dargestellt ist die gleiche Orientierung wie in Abbildung 27; der extrazelluläre Bereich des CCR5-Modells ist als Oberflächenstruktur dargestellt. Dadurch wird ersichtlich, wie gut sich die V3-Loop in den Rezeptor einpasst. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

Es ist gut zu erkennen, dass mit der Überlagerung der Dreiecke auch eine günstige Orientierung der V3-Loop mit dem Rezeptor einhergeht. Diese günstige Orientierung wird ebenso in Abbildung 28 deutlich, in der der extrazelluläre Bereich des Rezeptors als Oberflächen-Struktur dargestellt ist. Die V3-Loop passt sich sehr gut an die Oberfläche des Rezeptors an, wobei sich neben der Dreiecks-Wechselwirkung eine Vielzahl weiterer Wechselwirkungen ausbilden können.

Die weiteren Abbildungen 29 und 30 geben die Wechselwirkungen aus einem anderen Blickwinkel wieder.

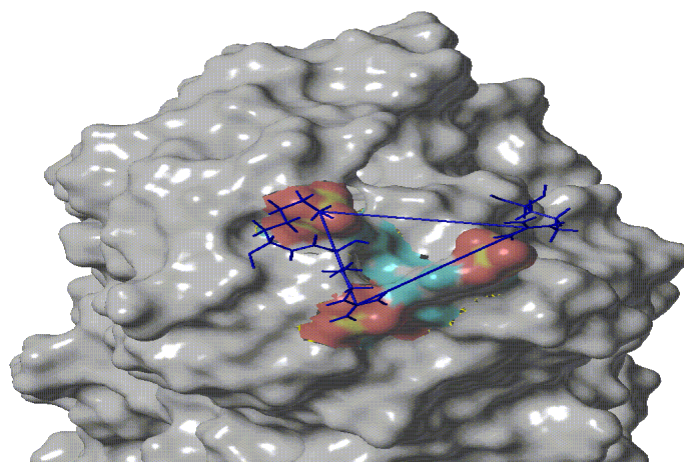


Abbildung 29: Aufsicht auf die sulfatierten Tyrosine des CCR5 (rot/gelb gefärbt) Y3, Y10 und Y14 sowie die Aminosäuren (blau) ARG 298, ARG 304 und LYS 305 aus der V3-Loop. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

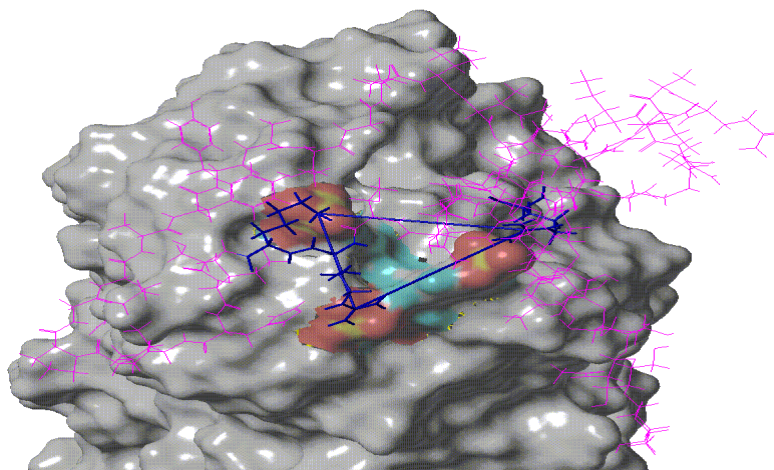


Abbildung 30: Aufsicht auf den CCR5-Rezeptor mit den sulfatierten Tyrosinen (rot/gelb gefärbt) Y3, Y10 und Y14 und die Aminosäuren (blau) ARG 298, ARG 304 sowie LYS 305 aus der V3-Loop. Im Vergleich zur Abbildung 29 ist zusätzlich der Rest der V3-Loop in magenta abgebildet. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

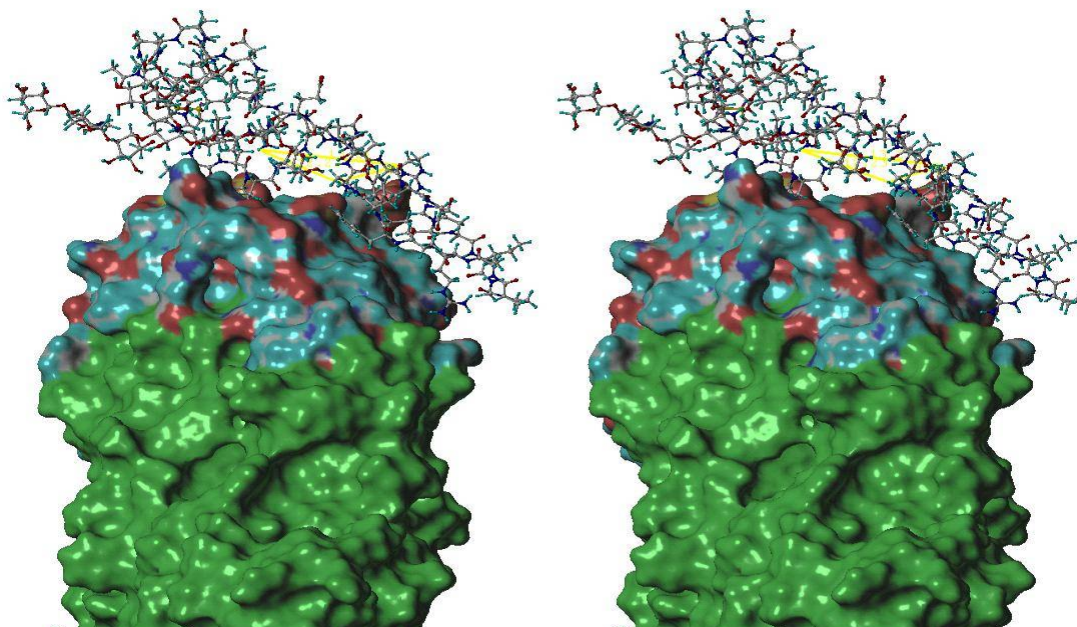


Abbildung 31: Seitliche Blickwinkel auf die angelagerte V3-Loop; die verschiedenfarbige Oberfläche markiert den extrazellulären Bereich des CCR5-Rezeptors. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

Die resultierende elektrostatische Dreiecks-Wechselwirkung könnte als Ankerpunkt für die V3-Loop bei dem Annähern dienen, um so die Loop in eine günstige Position auszurichten und anschließend eine feste Fixierung zu erhalten, damit das Virus die weiteren Schritte für den *entry* Prozess in die Zelle durchführen kann. Die deckungsgleiche Größe der Dreiecke geht ebenso aus Abbildung 32 und Tabelle 2 hervor.



Abbildung 32: Die Abbildung gibt die Seitenlängen vom negativ geladenen Dreieck im CCR5-Modell (cyan) im Vergleich zum positiv geladenen Dreieck im V3-Loop-Modell (orange) wieder. Es ist gut zu erkennen, dass die Dreiecke die gleichen Größenverhältnisse aufweisen und damit ideal wechselwirken können.

CCR5	Seitenlänge	V3	Seitenlänge
TYR 10-TYR 14	9.4 Å	LYS 305-ARG 304	9.00 Å
TYR 10-TYR 3	12.2 Å	LYS 305-ARG 298	11.8 Å
TYR 14-TYR 3	13.2 Å	ARG 304-ARG 298	11.9 Å

Tabelle 2: Die in Abbildung 32 aufgeführten Werte in tabellarischer Form geben Abstände der negativ geladenen Gruppen im CCR5-Modell und der positiv geladenen Gruppen im V3-Loop-Modell wieder.

Die günstige Überlagerung der geladenen Gruppen ist auch wichtig vor dem Hintergrund, dass schon vor der eigentlichen Bindungsreaktion die geladenen Gruppen von CCR5 und der V3-Loop durch Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen in ihrer Umgebung abgesättigt sind. Durch Bindung des Liganden an das Protein gehen diese Wechselwirkungen zwar verloren, aber es werden neue intermolekulare polare Kontakte ausgebildet. Eine aufgrund der

Wechselwirkung neu ausgebildete polare Bindung wird nur dann konstruktiv zur Bindung beitragen, wenn die Desolvatisierungsenthalpie der polaren Gruppe durch die Enthalpie der neu gebildeten intermolekularen Wechselwirkung überkompensiert wird. Demgegenüber würde sich eine polare Gruppe, die vor der Bindungsreaktion vollständig solvatisiert war, als enthalpisch ungünstig für die Bindungsreaktion erweisen, wenn sich im Komplex kein geeigneter Wechselwirkungspartner findet, der die Desolvatisierungsenergie kompensieren kann.^{103,104}

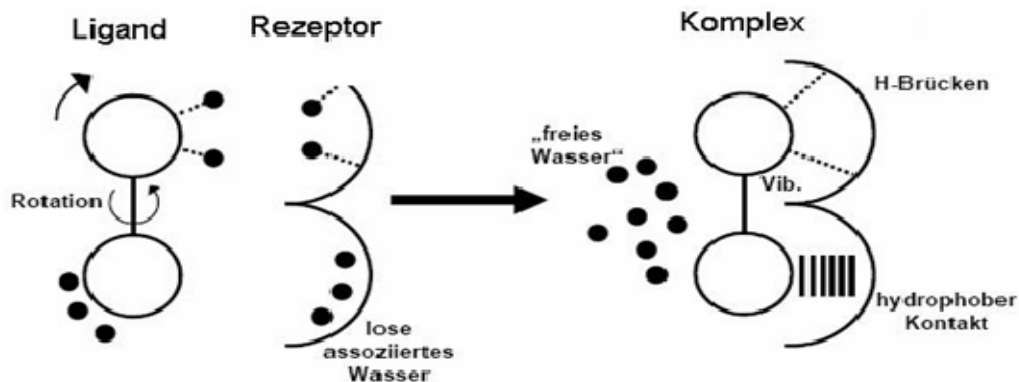


Abbildung 33: Schematische Darstellung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Ligand und Rezeptor sind solvatisiert, wobei einige Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) verknüpft; andere lose assoziiert sind. Die Bindung des Liganden führt zu neuen Wasserstoffbrücken, ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Kontakten. Wasser wird dabei freigesetzt. Die Desolvatationsenergie sollte dabei von den neuen Wechselwirkungen überkompensiert werden.^{103,104}

4.2 Dockingstudie mit DOCK 4.0

Die Positionierung der V3-Loop zum Rezeptor CCR5 in Abschnitt 4.1 erfolgte manuell. Im weiteren Abschnitt der vorliegenden Arbeit geht es um die Überprüfung, ob auch ein Docking-Programm die V3-Loop in eine ähnliche Orientierung positionieren würde und damit die vorhergehenden Ergebnisse bestätigen kann. Dieser Schritt wurde mit dem Programm DOCK 4.0¹⁰⁵ umgesetzt. Es handelt sich hierbei nicht um ein einziges Programm, sondern um ein Bündel an Programmen mit denen das Docking bewerkstelligt wird.

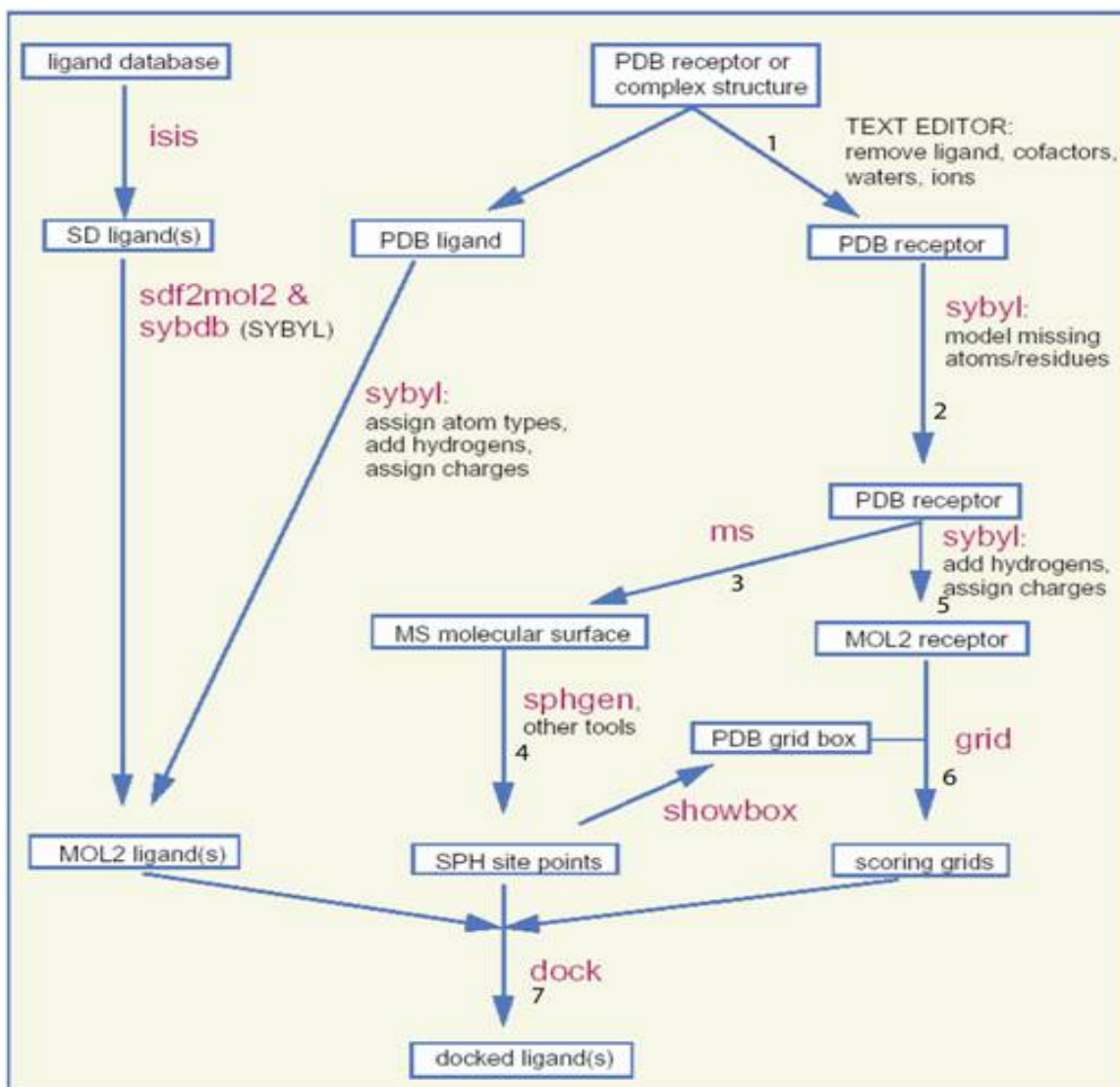


Abbildung 34: Flussdiagramm aus der Bedienungsanleitung¹⁰⁵ zu DOCK 4.0.¹⁰⁶ Dargestellt sind die Schritte, die beim Nutzen des Programms DOCK durchlaufen werden können. Die Nummerierungen beziehen sich auf die Schritte, die im Rahmen der Arbeit durchgeführt wurden.

Im Flussdiagramm der Abbildung 34 sind die einzelnen Schritte des Docking-Verfahrens aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit wie folgt durchgeführt worden:

1. Vorbereitung I:

Das PDB-File des CCR5-Rezeptors wurde aus dem CCR5-mol2-Modell erzeugt, durch Entfernen aller Wasserstoffatome und anschließendem Abspeichern im PDB-File-Format. Andere Bestandteile, wie Liganden, Co-Faktoren oder Wasser, waren nicht vorhanden und mussten dementsprechend nicht entfernt werden.

2. Vorbereitung II:

Weitere Modifikationen, wie die Ergänzung von fehlenden Atomen, mussten nicht vorgenommen werden, da die CCR5-Struktur selber modelliert wurde und es sich nicht um eine Röntgenstruktur handelt, bei der in der Regel Ergänzungen vorgenommen werden müssen.

3. Moleküloberflächen-Berechnung:

Die Moleküloberfläche wurde mit dem Programm DMS berechnet. DMS ist ein *open source* Programm, geschrieben in der Programmiersprache C. Die Oberfläche wird aus der Berechnung so genannter *surface points* generiert.

Im Verlauf der Rechnung konnten 101466 *surface points* generiert werden, aus denen die Oberfläche des CCR5-Modells zusammengesetzt wurde.

Atomtyp	Atomanzahl
S	23
O	488
N	462
C	1903
Summe	2916

Tabelle 3: Anzahl der Atome, die das Programm DMS vom CCR5-Modell genutzt hat, um das Oberflächenmodell zu erstellen. H-Atome sind, wie unter Schritt 1 beschrieben, vorher entfernt worden und tauchen daher nicht mehr auf.

Das Ergebnis der Oberflächenberechnung kann mit dem Programm CHIMERA¹⁰⁵ visualisiert werden, wie in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt.

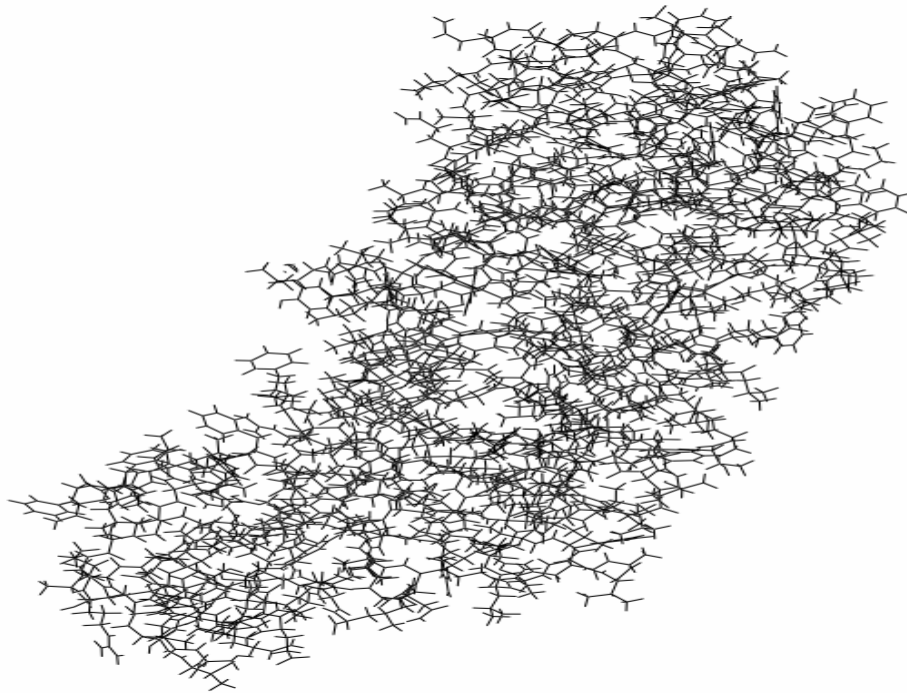


Abbildung 35: CCR5-Modell (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *capped-stick*)

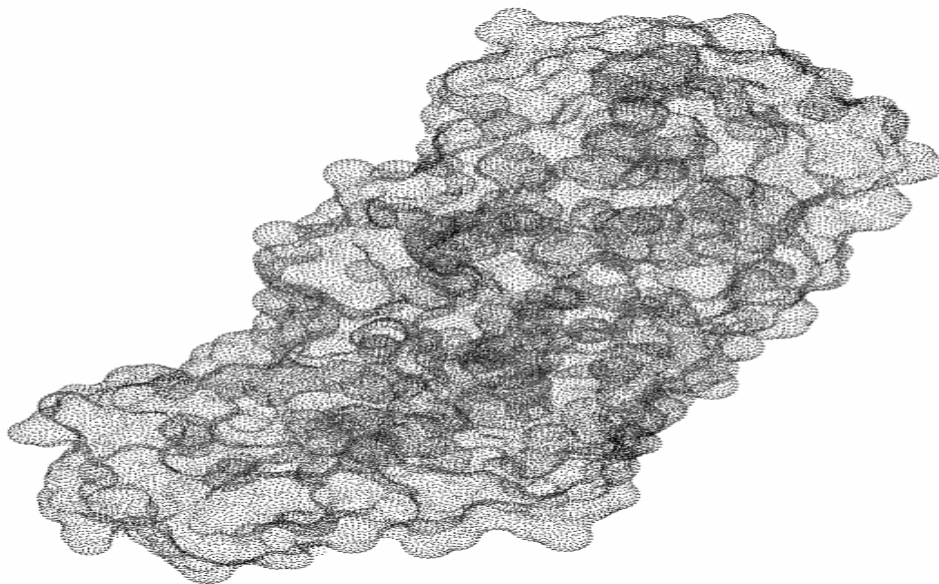


Abbildung 36: Ergebnis der Berechnung der Oberfläche des CCR5-Modells mit DMS; die Visualisierung erfolgte mit dem Programm CHIMERA.

4. Negatives Abbild der Oberfläche:

Im nächsten Schritt erfolgte die Entwicklung eines negativen Abbildes der extrazellulären Oberfläche des Rezeptors. Grundlage ist die gewonnene Oberfläche aus Schritt drei. Mit dem Programm SPHGEN¹⁰⁵ wird das negative Abbild berechnet, indem Kugeln bzw. *spheres* entwickelt werden, die die freien Räume auf der Oberflächenstruktur ausfüllen.¹⁰⁵

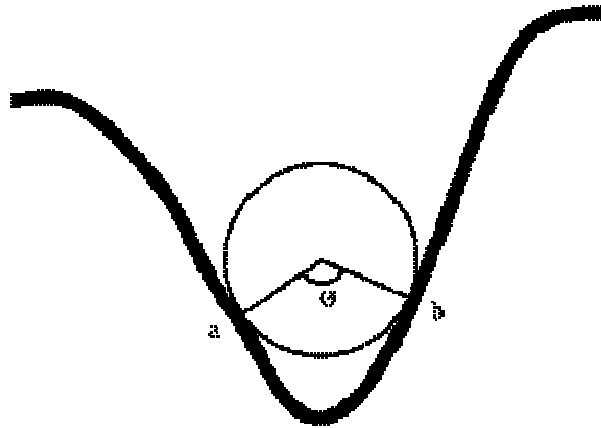


Abbildung 37: Durch Kugel bzw. *spheres* werden die Freiräume an der Oberfläche des Rezeptors abgebildet, die dem Liganden zur Verfügung stehen, um mit dem Rezeptor in Wechselwirkung zu treten. Die *spheres* müssen mindestens zwei Kontaktpunkte mit der *connolly*-Oberfläche der Tasche haben.¹⁰⁵

Das Ergebnis von SPHGEN kann mit dem Programm SHOWSPHERE¹⁰⁵ visualisiert werden. Mit Hilfe der Betrachtung kann das Ergebnis als zufriedenstellend übernommen werden oder durch Entfernen von *spheres* variiert werden, die z.B. ausserhalb des extrazellulären Bereiches liegen.

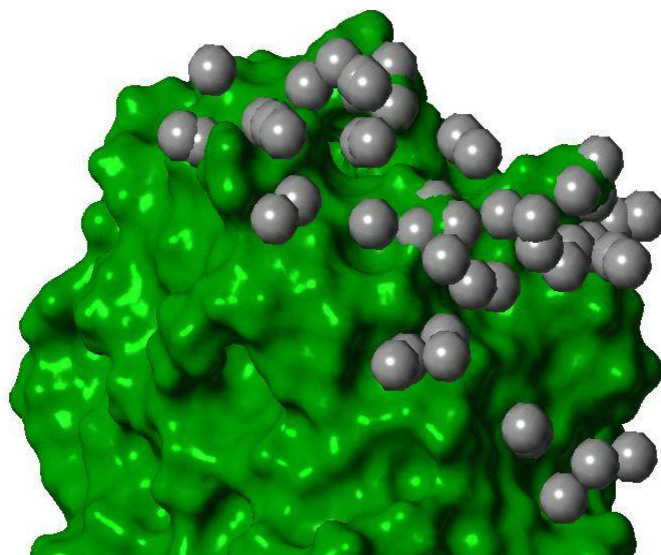


Abbildung 38: Beispiel eines von SPHGEN generierten *sphere clusters*. (Extrazellulärer Bereich des CCR5-Modells; Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque*)

Von den 18 erzeugten *sphere clusters*, die an verschiedensten Stellen der extrazellulären Oberfläche des CCR5 lokalisiert waren, wurden die *spheres* gelöscht, die weit entfernt von der Region lagen, in der die V3-Loop voraussichtlich bindet.

5. Mol2-file präparieren:

Das unter Punkt 1.) erzeugte CCR5-PDB file wird mit Wasserstoffatomen ergänzt, minimiert und als mol2-file abgespeichert.

6. GRID-Berechnung:

Um die während des Einpassens der Liganden in die Proteinbindungstasche wiederholt erfolgende Berechnung der Wechselwirkungsenergie zwischen Ligand und Protein zu beschleunigen, wurden die nur vom Protein abhängigen Anteile für alle in DOCK möglichen Bewertungsfunktionen, wie *Kontakt-score*, *Kraftfeld-score* und *chemischer-score*, für Punkte eines innerhalb der Bindetasche lokalisierten kubischen Gitters, mit dem zu DOCK dazugehörigen Programm GRID¹⁰⁵, vorherberechnet. Die Abstände der Gitterpunkte betragen

bis zu 0.3 Å. Das Programm SHOWBOX¹⁰⁵ diente zur Visualisierung des Gitters. Bei dieser Methode wird der Rezeptor durch ein Gitter repräsentiert. Für jede neue Konformation wird die Bindungsenergie berechnet und das Minimum der Energie aller Konfigurationen ermittelt. Die Genauigkeit dieser GRID-*search*-Methoden wird durch den Abstand der einzelnen Gitterpunkte bestimmt. Bei kleinem Abstand resultiert eine genauere Dockingkonfiguration, die zur Berechnung benötigte Zeit steigt dadurch aber stark an. Für jeden Gitterpunkt werden im Vorwege bereits die elektrostatischen und sterischen Einflüsse des Rezeptors auf ein Atom an diesem Punkt berechnet und abgespeichert. Für das *scoring* stehen diese Daten dann bereits zur Verfügung.

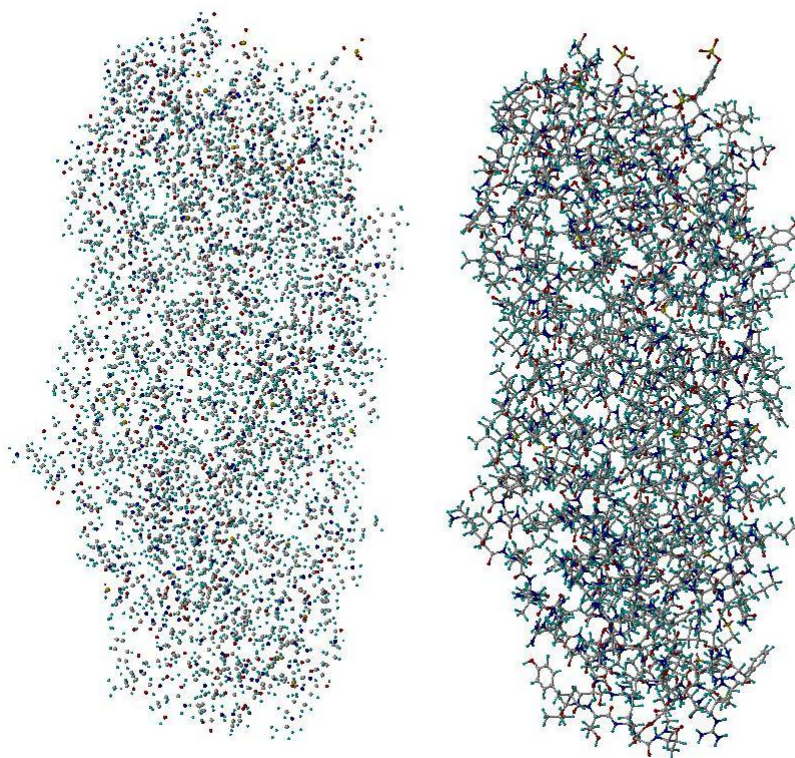


Abbildung 39: Rechts ist das CCR5-Modell; links stellen die Punkte die elektrostatischen Schwerpunkte des GRID-Programms dar, die für das CCR5-Modell berechnet wurden; visualisiert wurden die elektrostatischen Punkte mit dem Programm *SHOWBOX*. (CCR5-Modell; Abbildung aufgenommen mit SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *ball and stick*)

7. Docking:

Nach Abschluss der vorbereitenden Schritte erfolgte das eigentliche Docking. Der Ligand bzw. die V3-Loop wurde dabei flexibel gehalten, die Dielektrizitätskonstante betrug 20, womit die wässrige Umgebung berücksichtigt wurde. Bei einem Dock-Lauf wurden 500 verschiedene Versuche den Liganden in die Bindungsregion einzupassen durchlaufen, wobei bei jedem Orientierungs-Lauf 50.000 unterschiedliche Orientierungen eingenommen werden konnten und die energetisch günstigste Orientierung als Ergebnis abgespeichert wurde. Dadurch ergeben sich in der Summe 25 Millionen Orientierungen während eines Dock-Laufes. Nach jeder Orientierung erfolgte eine kurze Minimierung über 50 Schritte, um daraufhin die intermolekulare Energie zu bestimmen und auf diese basierend ein Ranking der Orientierung vorzunehmen. Sämtliche Parameter sind im experimentellen Abschnitt der Arbeit aufgelistet. In Tabelle 4 sind neben den intramolekularen Energien der günstigsten 10 Orientierungen des Dock-Laufes auch die *root-mean-square (rms)*-Werte angegeben. Der *rms* gibt wieder inwieweit die Orientierung von der Ausgangsorientierung abweicht. Bei dem durchgeführten Docking ist die Ausgangsorientierung, die im vorangegangenen Abschnitt 4.1 vorgestellte Position. Je größer der *rms*-Wert ist, desto mehr unterscheidet sich die Orientierung. In Abbildung 40 ist die intermolekulare Energie der jeweils energetisch günstigsten Orientierungen aus jedem der 500 Läufe aufgetragen. Tabelle 4 und Abbildung 40 geben wieder, dass die energetisch günstigste Orientierung einen kleinen *rms*-Wert besitzt und somit der Ausgangsorientierung sehr ähnlich ist. Die Ähnlichkeit der Orientierung zeigt auch die Abbildung 42.

Orientierung	Intramolekulare Energie[kcal/mol]/absteigend	<i>rms</i>
59	-26,03	0,64
371	-26,03	0,66
260	-25,85	0,67
423	-25,8	0,73
62	-25,77	0,74
153	-18,14	20,6

Tabelle 4: In der Tabelle sind energiesortiert die fünf günstigsten *hits* und die dazugehörigen *rms (root mean square)* Werte aufgelistet. Mit der Orientierung 153 ist in der letzten Zeile zusätzlich die ungünstigste intermolekulare Energie aufgetragen. Der *rms*-Wert ist relativ groß und zeigt damit eine deutliche Veränderung zur Ausgangsorientierung an.

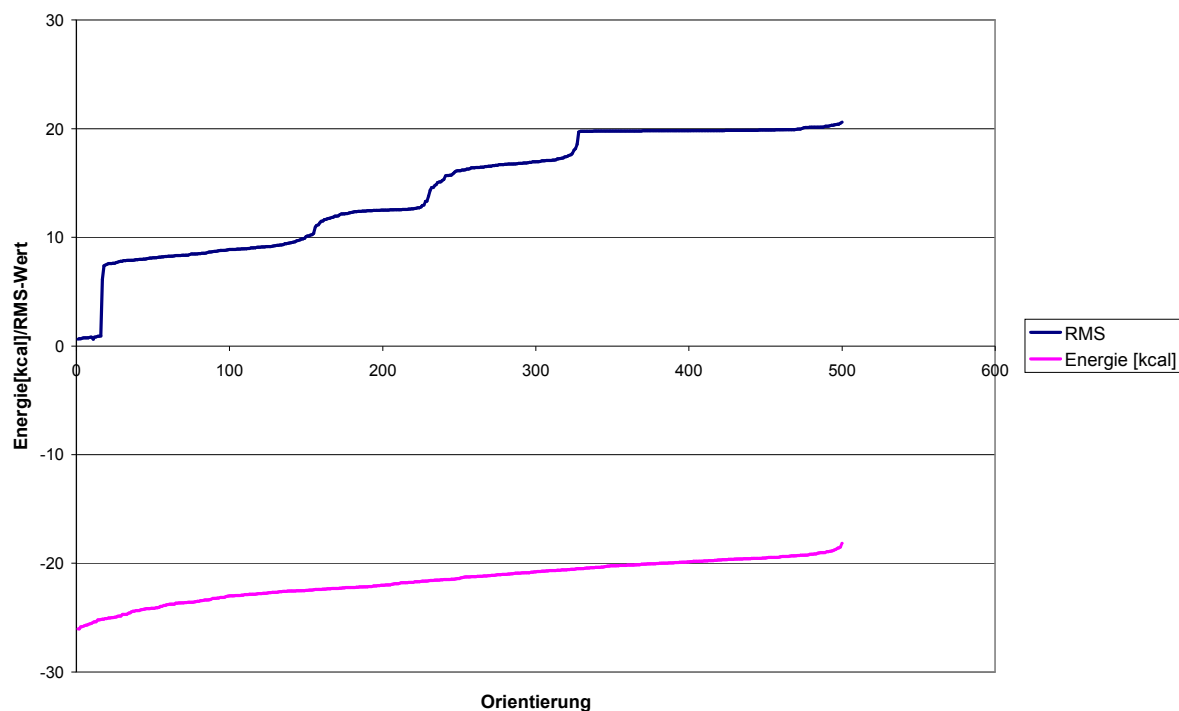


Abbildung 40: Auftragung aller *hits* aus dem Dock-Lauf, der auszugsweise in Tabelle 4 dargestellt ist. Aufgetragen ist die intermolekulare Bindungsenergie sortiert nach aufsteigenden Energiewerten und der dazugehörige *rms*-Wert in der y-Achse gegen die Orientierungen in der x-Achse. Der aufgetragene Dock-Gesamtlauf entspricht 500 Einzelläufen, bei den jeweils 50.000 verschiedene Positionen des Liganden zum Rezeptor eingenommen wurden. Es zeigt sich, dass die Orientierung am energetisch günstigsten ist, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Ausgangsorientierung hat.

Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, weicht die Orientierung mit dem größten *rms*-Wert deutlich von der Ausgangsorientierung ab. In der Abbildung 42 ist das DOCK 4.0-Ergebnis mit dem höchsten Ranking bzw. günstigster Bindungsenergie abgebildet. Es ist zu erkennen, dass DOCK 4.0 eine sehr ähnliche Orientierung zur Ausgangsorientierung als günstigstes Ergebnis zeigt; dies spiegelte sich auch bereits in dem sehr kleinen *rms*-Wert wieder. Somit können die Ergebnisse mit DOCK 4.0 die voran generierten Ergebnisse in Bezug auf die Orientierung der V3-Loop zum CCR5-Rezeptor aus Abschnitt 4.1 bestätigen.

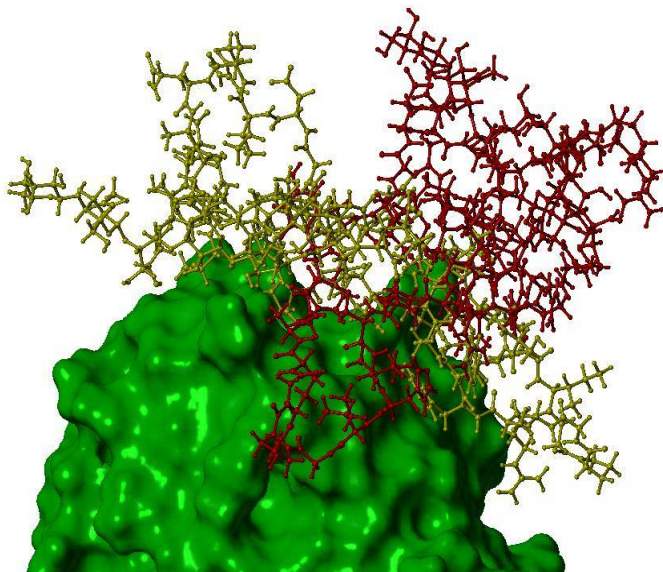


Abbildung 41: In gelb ist die verwendete Ausgangsorientierung abgebildet, die bereits im Abschnitt 4.1 präsentiert wurde. Rot ist die mit DOCK 4.0 generierte Orientierung 153 aus Tabelle 4 mit dem ungünstigsten Energiewert. Es zeigt sich eine deutliche veränderte Position der V3-Loop zum Rezeptor, wie es auch der *rms*-Wert von 20,6 wiedergibt. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

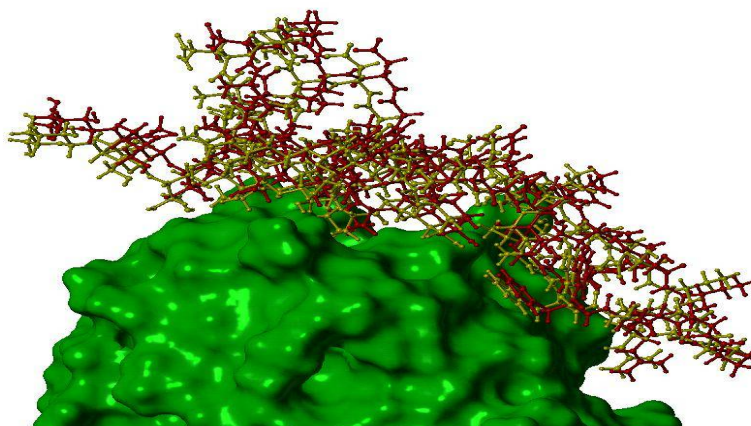


Abbildung 42: In gelb ist die verwendete Ausgangsorientierung abgebildet. Rot ist die Orientierung 59 aus Tabelle 4 mit dem günstigsten Energiewert. Es zeigt sich eine sehr ähnliche Positionierung der V3-Loop zum Rezeptor, wie es auch der *rms*-Wert von 0,64 wiedergibt. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

4.3 *In silico* Alanin-scan

Im vorliegenden Abschnitt der Arbeit wird der Einfluss der sulfatierten Tyrosine Y3, Y10, und Y14 auf die Bindung der V3-Loop mit einem *in silico* Alanin-scan und MD-Simulationen dargestellt. Hierfür wurde eine MD-Berechnung über 1 ns mit dem im Abschnitt 4.1 vorgestellten CCR5/V3-Modell durchgeführt. Anschließend wurde das Modell dahingehend modifiziert, dass die sulfatierten Tyrosine Y3, Y10 und Y14 durch Alanin ausgetauscht wurden. Wiederum folgte eine MD-Simulation über 1 ns.

Ergebnisse und Diskussion

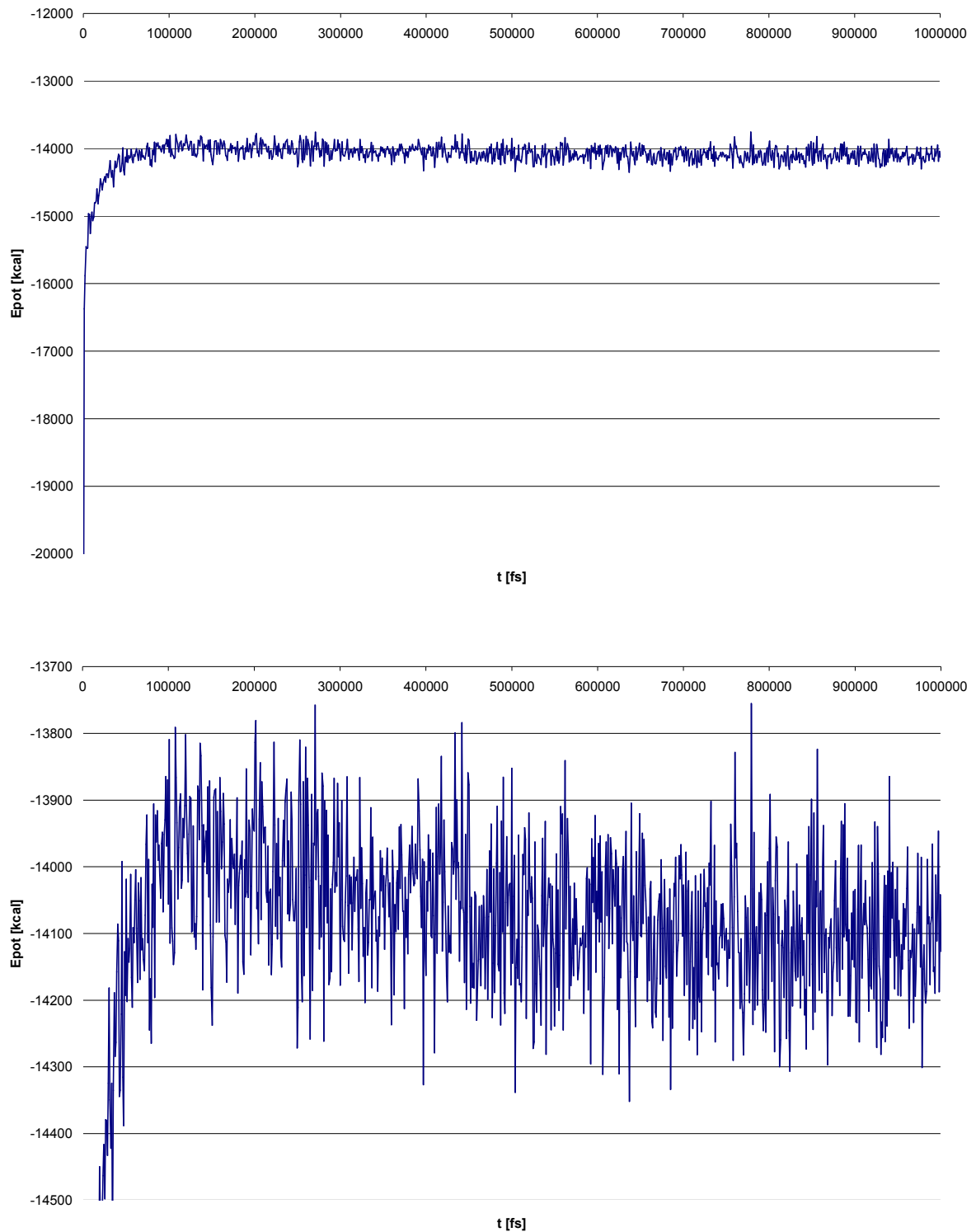


Abbildung 43: Verlauf der potenziellen Energie während der MD-Simulation des CCR5/V3-Modells mit den sulfatierten Tyrosine Y3, Y10 und Y14 aus Abschnitt 4.1. Abgebildet ist die gesamte MD-Simulation und ein Auschnitt zwischen -14500 bis -13700 kcal.

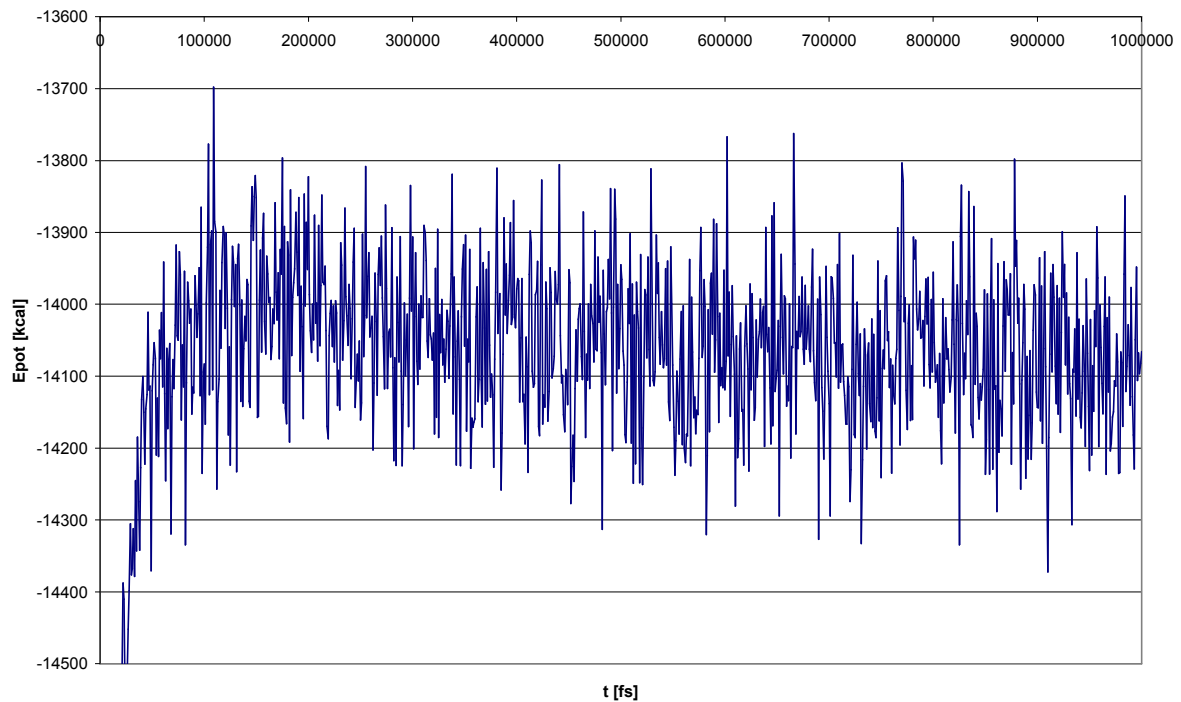
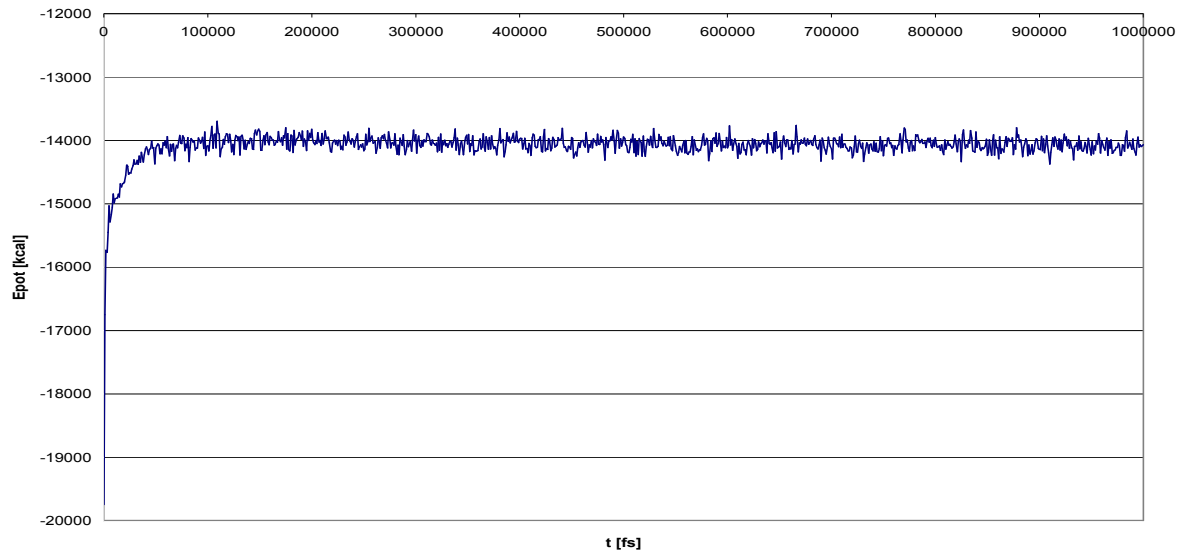


Abbildung 44: Verlauf der potenziellen Energie während der MD-Simulation des CCR5/V3 *in silico* Alanin-scan Modells bei dem die sulfatierten Tyrosine durch Alanin (A3, A10 und A14) ersetzt wurden. Abgebildet ist die gesamte MD-Simulation und ein Ausschnitt zwischen -14500 bis -13600 kcal.

Die Auswertung der MD-Simulationen war dahingehend ausgerichtet die Abstandsentwicklung zwischen dem CCR5-Rezeptor und der V3-Loop, vordergründig für den Bereich der „Dreiecks-Wechselwirkung“, zu verfolgen. Daher wurden, gemäß der Abbildung 45, die Abstände berechnet und in Abbildung 46 und 47 aufgetragen.

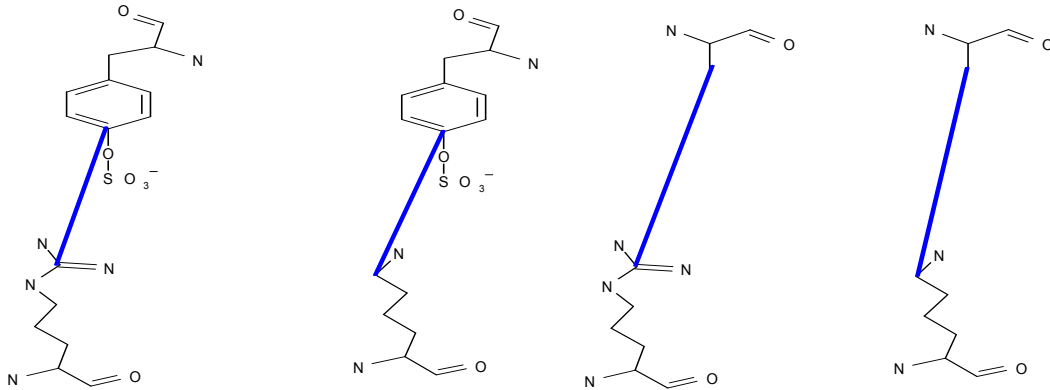
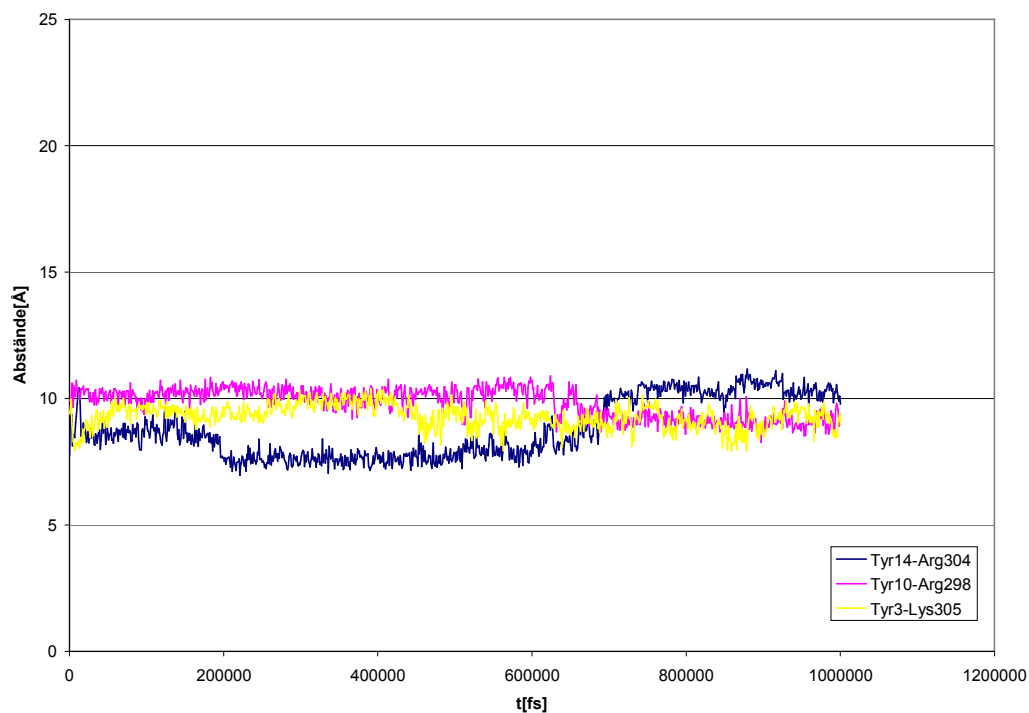
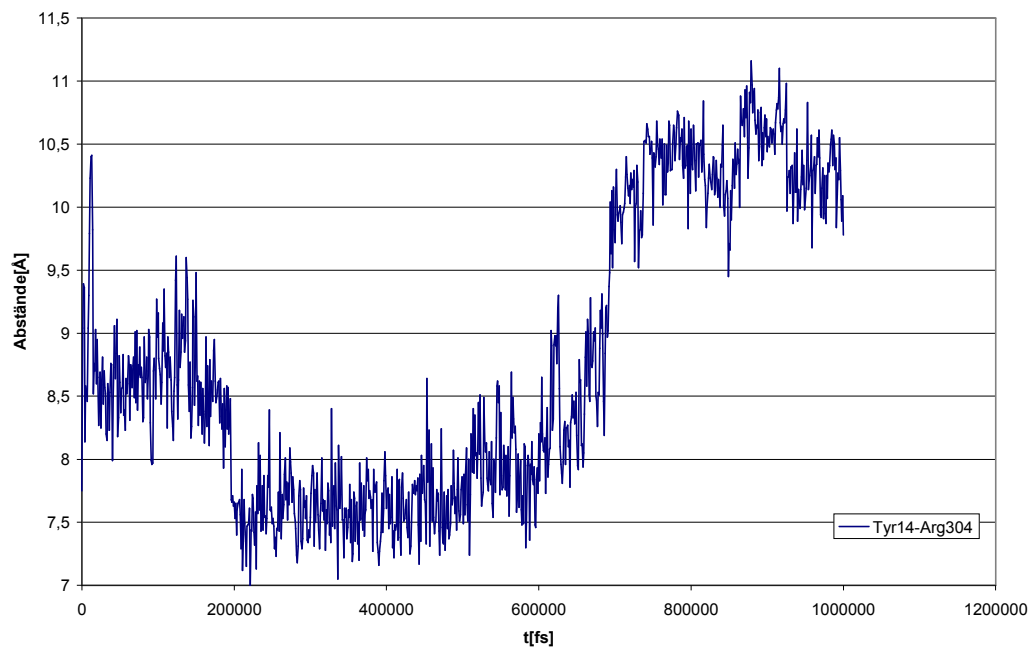
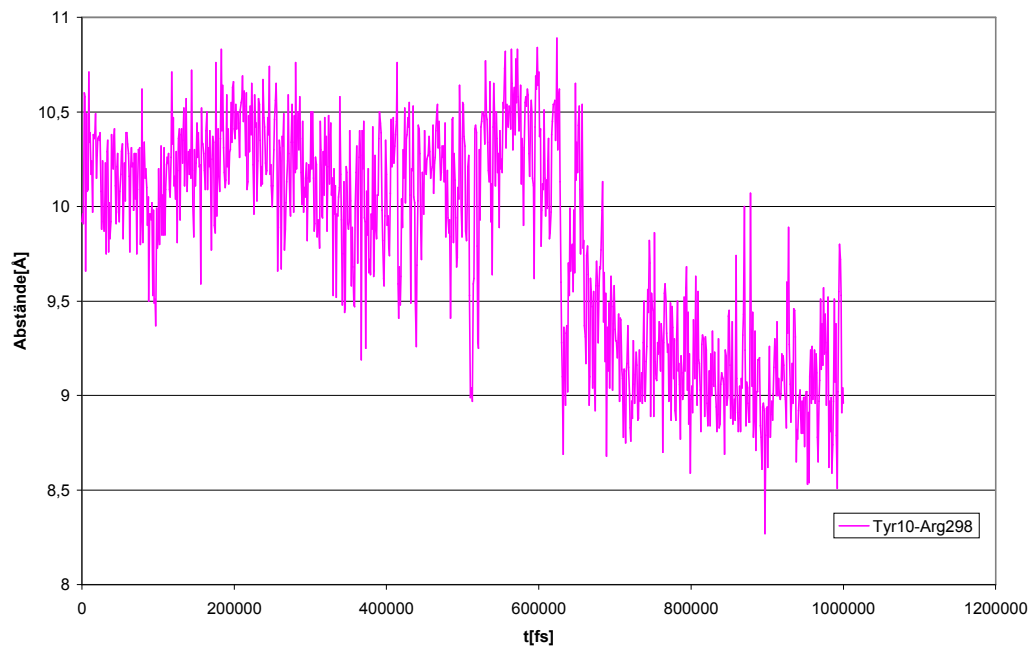


Abbildung 45: Die beiden MD-Simulationen wurden hinsichtlich der Abstände Tyr3-Arg298/Tyr10-Lys305/Tyr14-Arg304 beim CCR5/V3-Modell ausgewertet. Beim Alanin *in silico screening* Modell waren im Fokus der Auswertung die Abstände Tyr3-Ala298/Tyr10-Ala305/Tyr14-Ala304. Mit der blauen Linie sind die Atome gekennzeichnet, die zur Abstandsmessung herangezogen wurden. Gezeigt sind die Referenzatome bei den Paaren SO₃-Tyr-Arg, SO₃-Lys, Ala-Arg und Ala-Lys.





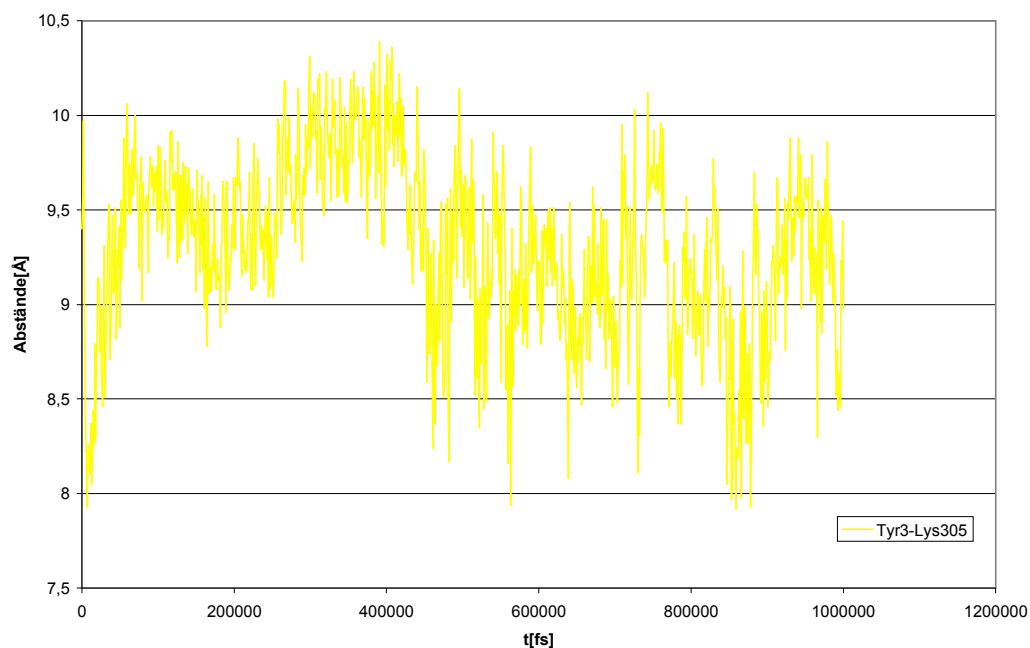
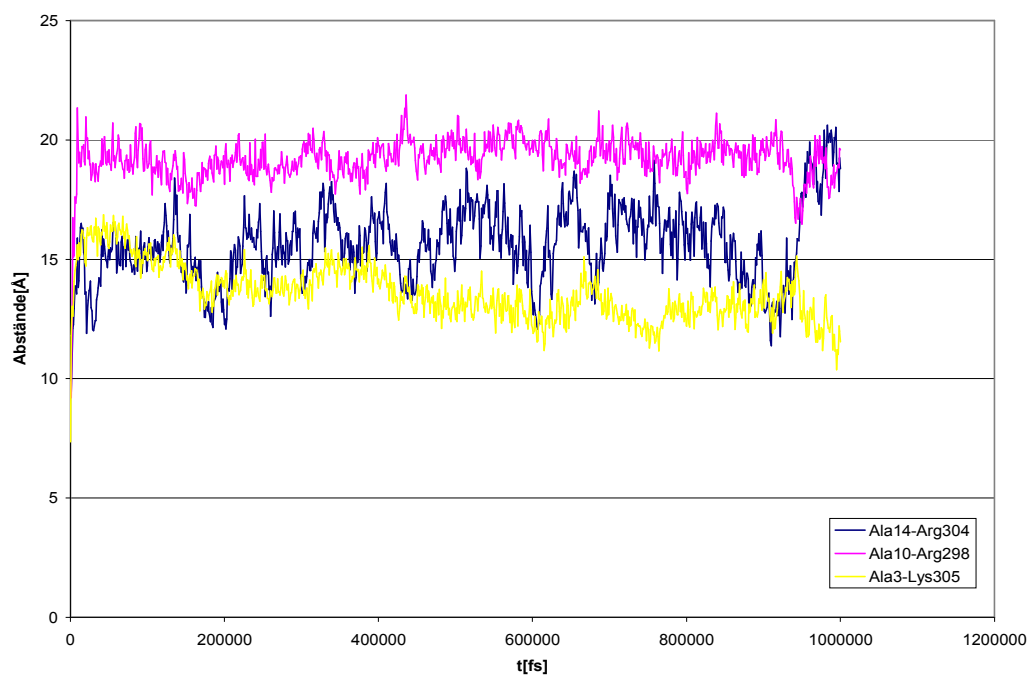
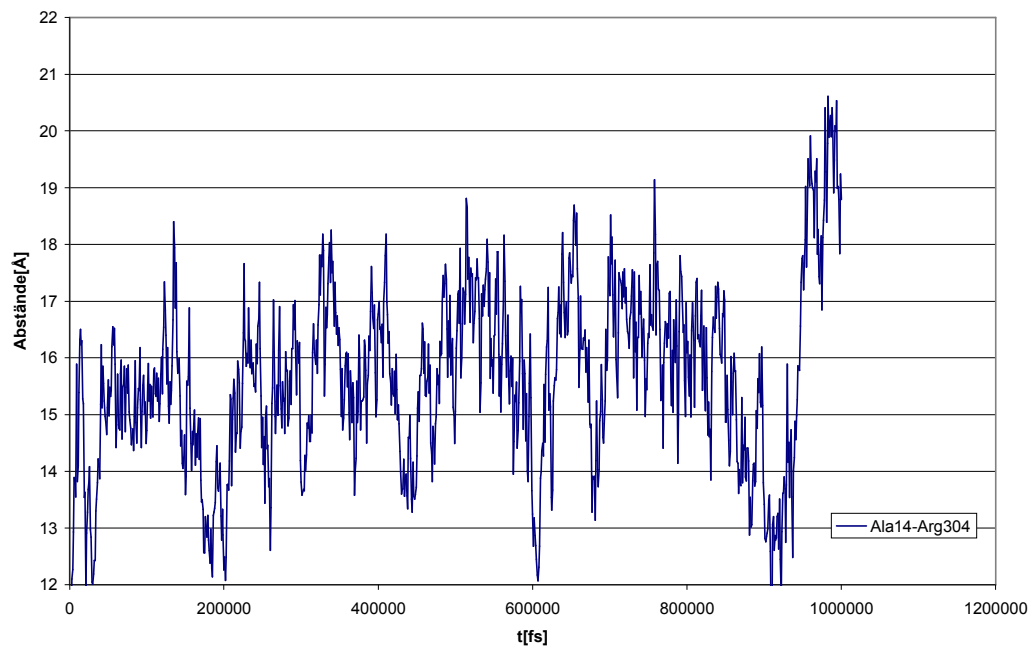
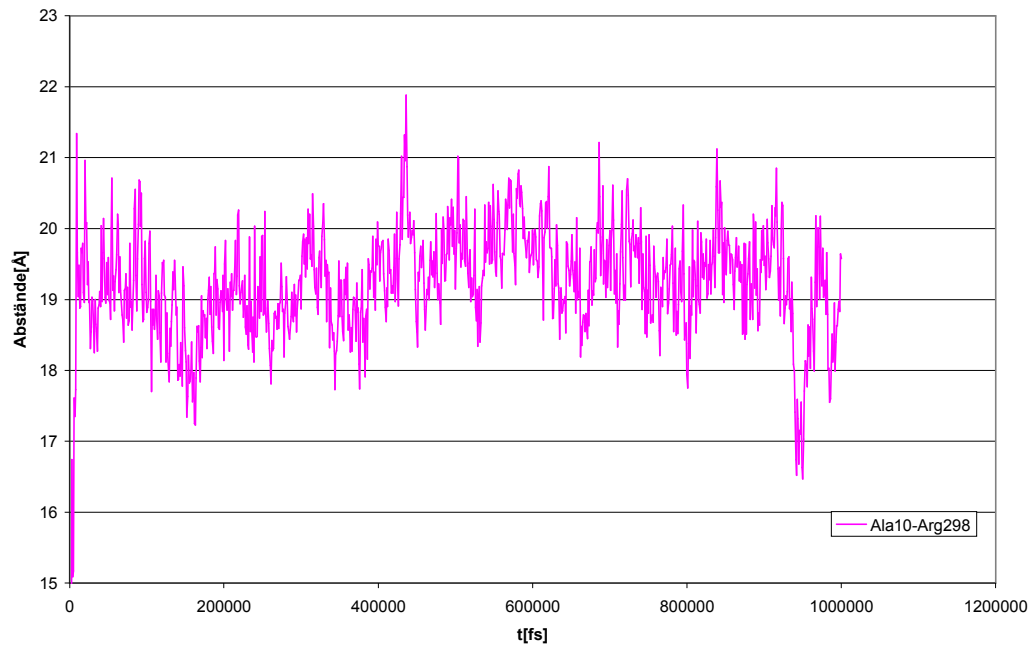


Abbildung 46: Aufgetragen sind die Abstände der sulfatierten Tyrosine aus dem CCR5 und den ihnen in der V3-Loop gegenüberstehenden Aminosäuren Arg bzw. Lys im Verlauf der MD-Simulation. Abgebildet ist ein Gesamtbild und jeder Abstand separat. Es zeigt sich, dass die Abstände im Verlauf der Simulation sich in einer relativ konstanten Schwankungsbreite von 3 Å bewegen und damit die V3-Loop in ihrer Position verharret.





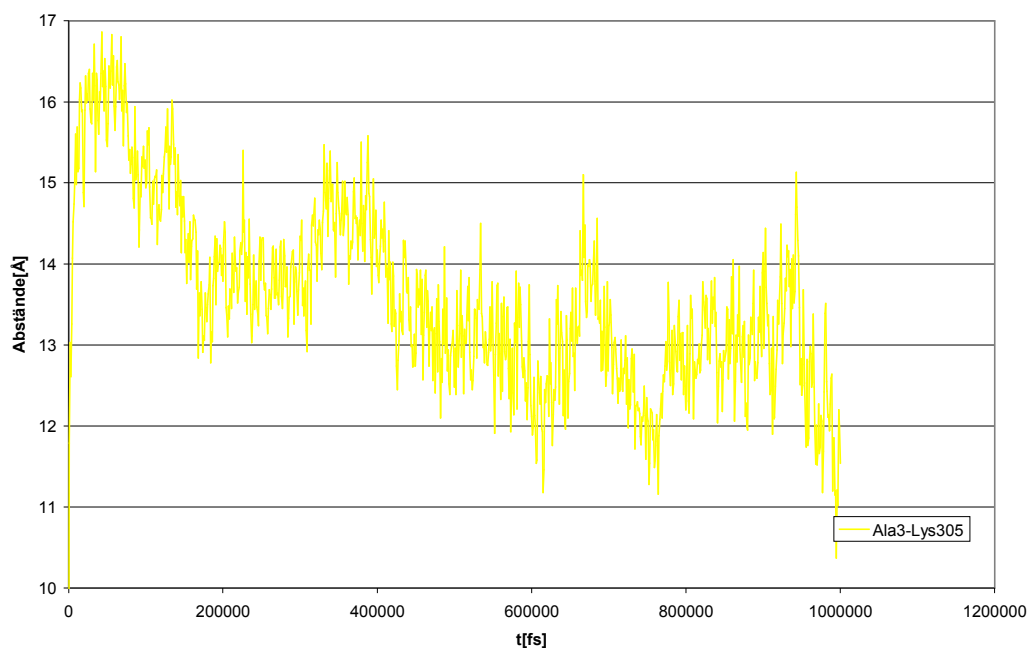


Abbildung 47: Aufgetragen sind die Abstände der durch den *Alanin-scan* eingesetzten Alanine aus dem CCR5 und den ihnen in der V3-Loop gegenüberstehenden Aminosäuren Arg bzw. Lys im Verlauf der MD-Simulation. Abgebildet ist ein Gesamtbild und jeder Abstand separat. Es zeigt sich, dass die Abstände bereits am Anfang und im Verlauf der Simulation relativ stark variieren. Diese Schwankungsbreite, in der Größenordnung von 6 Å, kann dahingehend interpretiert werden, dass die V3-Loop nicht in der Ausgangsposition verharret.

Abbildung 46 zeigt, dass die Abstände im CCR5/V3-Modell während der Simulation relativ konstant bleiben, wogegen sie sich beim *in silico* Alanin-*scan*-Modell deutlich verändern. Die Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass die Wechselwirkung zwischen den sulfatierten Tyrosinen aus dem CCR5 und den Aminosäuren Arginin und Lysin aus der V3-Loop als ein Anker dienen und somit die V3-Loop auf dem Rezeptor fixiert.

Visuell sind diese Ergebnisse zusätzlich in den Abbildungen 48 und 49 wiedergegeben.

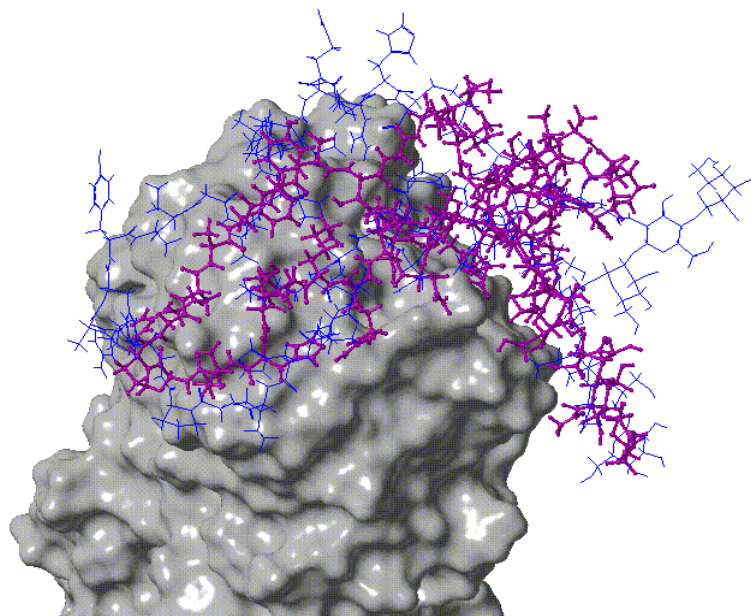


Abbildung 48: In magenta ist die verwendete Ausgangsorientierung der V3-Loop abgebildet, die bereits im Abschnitt 4.1 präsentiert wurde und die Oberflächenstruktur des CCR5-Modells mit den sulfatierten Tyrosinen Y3, Y10 und Y14. Blau ist die Position der V3-Loop nach der 1 ns dauernden MD-Simulation. Es zeigt, dass die V3-Loop in der Ausgangsposition verharret. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick/capped stick*)

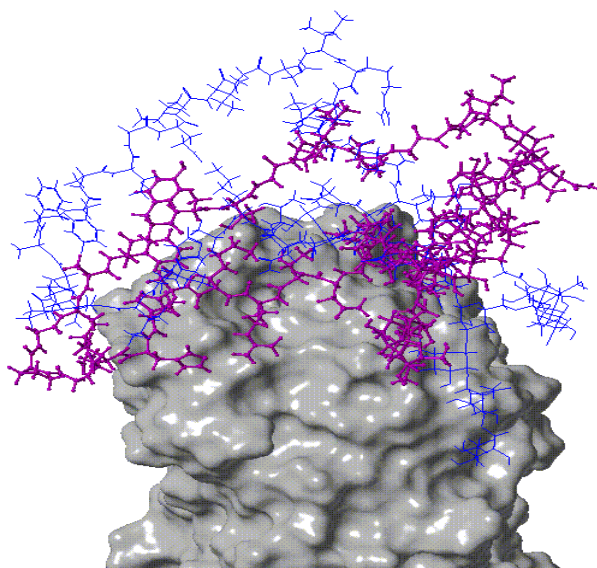


Abbildung 49: In magenta ist die verwendete Ausgangsorientierung der V3-Loop abgebildet, die bereits im Abschnitt 4.1 präsentiert wurde und die Oberflächenstruktur des CCR5-Modells, bei

dem die sulfatierten Tyrosinen Y3, Y10 und Y14 gegen Alanin ersetzt wurden. Blau ist die Position der V3-Loop nach der 1 ns dauernden MD-Simulation. Es zeigt, dass die V3-Loop sich aus der Ausgangsposition entfernt hat. Der Grund kann darin liegen, dass durch das Ersetzen der sulfatierten Tyrosinen die Fixierung der V3-Loop auf dem CCR5-Rezeptor nicht mehr gegeben ist. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

4.4 Abgleich mit experimentellen Ergebnissen

In der Arbeitsgruppe von Prof. B. Meyer sind im Rahmen einer weiteren Dissertation Teilstücke der V3-Loop synthetisiert worden, um die Bindungseigenschaften der V3-Loop zum CCR5-Rezeptor zu untersuchen.

Die nachfolgende Abbildung 50 zeigt einen der Liganden, der zur Untersuchung der Interaktion mit dem Chemokinrezeptor CCR5 synthetisiert wurde.

Die Wechselwirkungen bzw. Bindungseigenschaften konnten mit dem 1D-STDD-Verfahren vermessen werden. Das *STDD*-Verfahren (*Saturation Transfer Double Difference*) ist dazu geeignet, an lebenden Zellen mit hoch exprimierten Zelloberflächenrezeptoren Bindungsereignisse mit Hilfe der *NMR*-Spektroskopie auf atomarer Ebene zu charakterisieren.

Zur Vermeidung von Redoxreaktionen der Thiolgruppe wurde das Cys296 gegen Serin ausgetauscht. Anstelle der Komplex-Typ-Glycosylierung wurde ein *N* γ -Chitobiosylrest eingefügt.¹⁰⁷

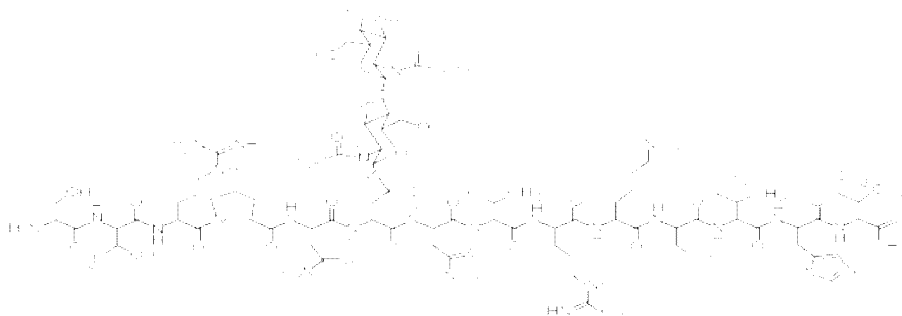


Abbildung 50: Abbildung des V3-Loop-Sequenzabschnittes 296STRPNN(GlcNAc-4GlcNAc)NTRKSIHI309, der im Arbeitskreis von Prof. B. Meyer synthetisiert und unter der Verwendung des STDD-Verfahrens vermessen wurde.

Dieses Teilstück der V3-Loop wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Modell entwickelt, indem das vorliegende V3-Loop-Modell⁸⁹ entsprechend gekürzt und Cys296 gegen Serin ausgetauscht wurde. Anschließend wurde die Struktur energieminiert und durch eine MD-Simulation optimiert. In der Abbildung 51 ist zu erkennen, dass auch im V3-Loop-Teilstück das positiv geladene Dreieck aus den Aminosäuren Arginin und Lysin existiert und entsprechend mit dem negativen Dreieck Y3, Y10 und Y14 aus dem CCR5-Rezeptor wechselwirkt.

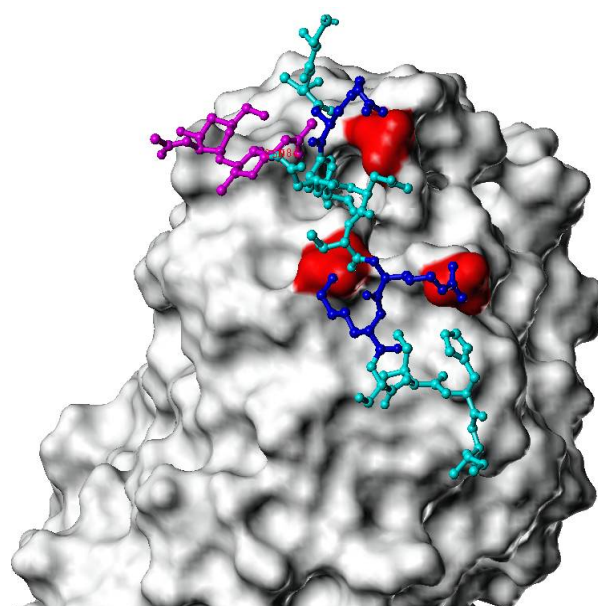


Abbildung 51: Es zeigt sich, dass auch im V3-Loop-Teilstückmodell das positiv geladene Dreieck aus den Aminosäuren Arginin und Lysin (in blau dargestellt) existiert und mit dem negativen Dreieck Y3, Y10 und Y14 (rot dargestellt im Oberflächenmodell) aus dem CCR5-Rezeptor wechselwirkt. Der *N*-Chitobiosylrest ist violett dargestellt. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

Die Abbildung 52 zeigt, dass neben der geschilderten Dreiecks-Wechselwirkung sich das V3-Loop-Teilstück auch ideal in die Oberfläche des Rezeptors einpasst.

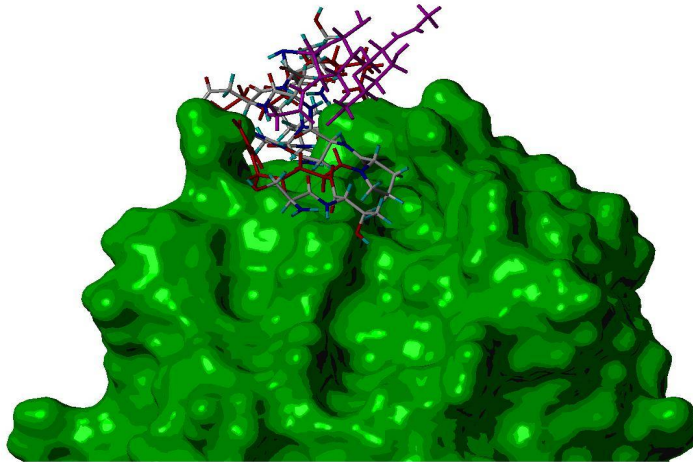


Abbildung 52: Die seitliche Aufsicht zeigt, dass neben der geschilderten Dreiecks-Wechselwirkung sich das V3-Loop-Teilstück auch ideal in die Oberfläche des CCR5-Rezeptors einpasst. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

In der Arbeitsgruppe von Prof. B.Meyer wurde das Programm DISTANCEMAPPER entwickelt.¹⁰⁸ Es ist in der Programmiersprache C geschrieben und kann die theoretischen STD-Prozente eines Liganden-Modell gedockt an einem Rezeptor-Modell berechnen. Durch dieses Tool ist die Möglichkeit gegeben, die im Arbeitskreis von Prof. B. Meyer gewonnenen experimentellen STDD-Daten, von dem im vorangegangenen Abschnitt erwähnten synthetisierten Teilstück der V3-Loop in Wechselwirkung mit dem CCR5-Rezeptor, mit den Daten aus dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Modell CCR5/V3-Teilstück zu vergleichen.

STD-Signale sind im Bereich von bis zu 6 Å sichtbar. Bei der Nutzung des Programms DISTANCEMAPPER wurden die theoretischen STD-Prozente bis zu einem Abstand von 6 Å zwischen Ligand und Rezeptor berechnet. In der Abbildung 53 sind die STD-Prozente von dem synthetisch hergestellten und vermessenen V3-Teilstück abgebildet und die Ergebnisse des Programms DISTANCEMAPPER vom V3-Teilstück-Modell. In der Abbildung sind durch Kreise die Bereiche hervorgehoben, in denen es zu einer gehäuften Ansammlung von Signalen kommt. Es zu erkennen, dass die Bereiche mit gehäuften STD-Signalen in beiden Strukturen ähnlich liegen. Somit stimmt die Grundorientierung der V3-Teilstücke zum Rezeptor überein, wodurch die Orientierung des V3-Teilstück-Modells, aber auch der gesamten V3-Loop durch experimentelle Ergebnisse bestätigt wird. In Bezug auf die Größe

der Intensität und die Atomverteilungen sind die STD-Prozente nicht absolut übereinstimmend, was auch damit zu erklären ist, dass eine exakt gleiche Orientierung im Modell und bei der experimentellen Messung unwahrscheinlich ist. Zusätzlich sind bei der hier benutzten Berechnung die Dynamik der Liganden und der Rezeptoren nicht berücksichtigt. Die Effizienz des Sättigungstransfers ist proportional zu r^{-6} ; daher kommt es schon bei minimalen Änderungen im Abstand vom Rezeptor zum Liganden zu deutlichen Änderungen in der Intensität oder zum Wegfall oder Auftreten von STD-Signalen.

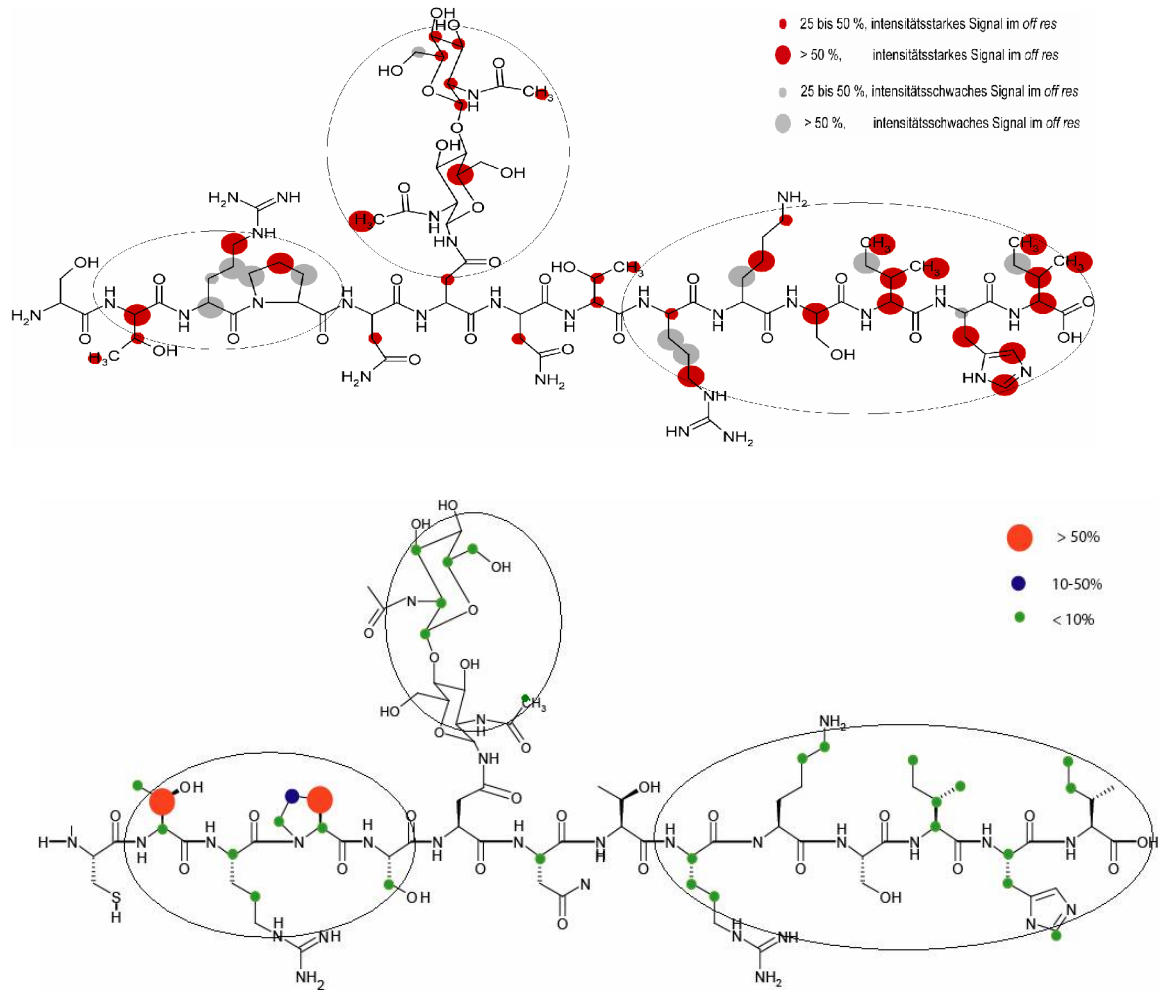


Abbildung 53: Bindungsepitop aus der V3-Loop in Wechselwirkung mit dem CCR5-Rezeptor, unterteilt in starke und schwache STD-Signale. Im oberen Teil der Abbildung sind die STD-Effekte der synthetisierten V3-Loop-Teilsequenz gezeigt; im unteren Bereich der Abbildung die Ergebnisse des V3-Teilstück-Modells. Es zeigt sich, dass es in den gleichen Bereichen zu einer Anhäufung von STD-Signalen kommt. Die Signale sind nicht genau deckungsgleich von der Intensität und der Verteilung; es muss dabei bedacht werden, dass minimale Änderungen im Abstand vom Rezeptor zum Liganden zu deutlichen Änderungen in der Intensität bzw. zum Wegfall bzw. Auftreten von STD-Signalen führen können.

4.5 Vergleich mit Literatur-Ergebnissen

-Glycan

C (296) T (297) R (298) P (299) S (300) N (301) N (302) T (303) R (304) K (305)
S (306) I (307) H (308) I (309) G (310) P (311) G (312) R (313) A (314) F (315)
Y (316) A (317) T (318) G (319) E (320) I (321) I (322) G (323) D (324) I (325)
R (326) Q (327) A (328) H (329) C (330)

Abbildung 54: Unterstrichen sind die Aminosäuren aus dem V3-Loop-Modell, die in maximal einem Abstand von 4 Å zum CCR5-Docking-Modell stehen und somit in einem günstigen Abstand um bindende Wechselwirkungen auszuüben. Blau ist der N-terminale V3 *stem* Bereich, schwarz der V3 *crow*n Abschnitt und orange der C-terminale V3 *stem* Bereich gekennzeichnet.

Aus der Abbildung 54 gehen die Aminosäuren aus dem V3-Loop-Modell hervor, die in einem Abstand von 4 Å zum CCR5-Docking-Modell stehen und sich somit in einem günstigen Abstand befinden, um bindende Wechselwirkungen auszuüben.

Der Abgleich mit Literaturdaten zeigt, dass Arginin 298 und Threonin 303 hoch konservierte Aminosäure in der V3-Loop sind. Der Austausch gegen Alanin führt zu stark verringerten Infektionsraten.¹¹⁶ In den Abbildungen 55 und 56 sind weitere Mutationsergebnisse abgebildet.

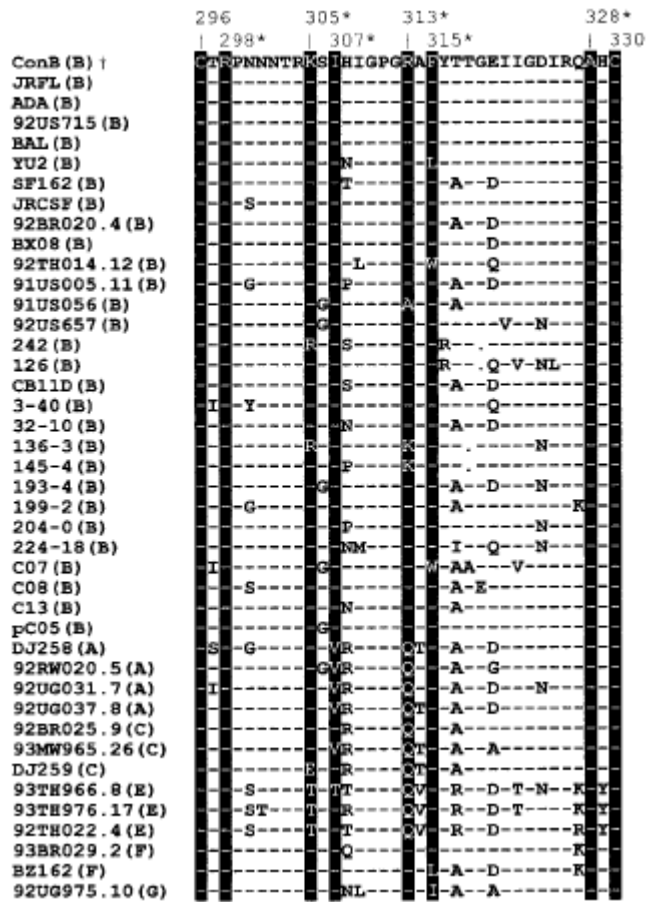


Abbildung 55: Aufgelistet sind V3 Sequenzen von R5 Viren verschiedener HIV-1 Subtypen; in Klammern sind die Subtypen angegeben. Aminosäuren, die als wichtig identifiziert worden sind für die Wechselwirkung der V3-Loop mit CCR5 tragen ein Sternchen.¹¹⁷

Abbildung 55 zeigt V3 Sequenzen von R5 Viren verschiedener HIV-1 Subtypen und Alanin-*scan*-Ergebnisse. Neben Arginin 298 sind auch Lysin 305, Isoleucin 307, Arginin 313, Phenylalanin 315, Alanin 328 besonders wichtig für die Wechselwirkung der V3-Loop mit CCR5 für den entry Prozess.¹¹⁷

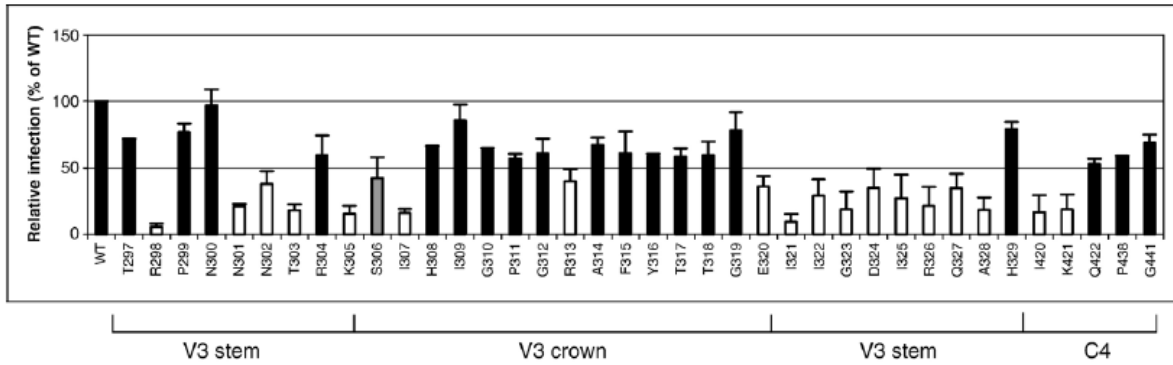


Abbildung 56: Aufgezeigt ist der Effekt von V3 und C4 Mutationen durch einen Alanin-Scan auf die HIV-Infektion. Die weissen Balken zeigen eine verringerte Infektion von über 50% an; der graue Balken zeigt eine Verringerung um 50%, die schwarzen oberhalb von 50% an.¹¹⁵

Weitere Alanin-*scan* Ergebnisse bzw. Mutationsergebnisse zeigt Abbildung 56.¹¹⁵ Sie decken sich mit den Ergebnissen aus Abbildung 55 im N-terminalen V3 *stem* und V3 *crown* Abschnitt, zeigen aber Unterschiede im C-terminalen V3 *stem* Bereich auf. In der folgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse aus den Abbildung 54, 55 und 56 zusammengefasst.

Es zeigt sich, dass die Ergebnisse des CCR5/V3-Modells im N-terminalen V3 *stem* und *crown* Abschnitt gut mit den Literatur-Ergebnissen übereinstimmen. Im C-terminalen V3 *stem* Abschnitt unterscheiden sich jedoch die Daten; die Literatur-Ergebnisse geben in diesem Abschnitt allerdings auch kein einheitliches Bild ab. Hintergrund könnte sein, dass der C-terminale V3 *stem* Abschnitt eine V3-Konformation gebende Funktion hat und weniger an der direkten Interaktion mit CCR5 beteiligt ist. Beispiel hierfür sind die Erkenntnisse, dass Asp 324 die V3-Konformation stabilisiert.¹¹³

V3-CCR5-Modell (Abb. 52)	Alanin-Scan (Ref. Abb.53)	Alanin-Scan (Ref. Abb.54)
C(296)	C(296)	C(296)
T(297)	T(297)	T(297)
R(298)	R(298)	R(298)
P(299)	P(299)	P(299)
S(300)	N(300)	N(300)
N(301)	N(301)	N(301)
N(302)	N(302)	N(302)
T(303)	T(303)	T(303)
R(304)	R(304)	R(304)
K(305)	K(305)	K(305)
S(306)	S(306)	S(306)
I(307)	I(307)	I(307)
H(308)	H(308)	H(308)
I(309)	I(309)	I(309)
G(310)	G(310)	G(310)
P(311)	P(311)	P(311)
G(312)	G(312)	G(312)
R(313)	R(313)	R(313)
A(314)	A(314)	A(314)
F(315)	F(315)	F(315)
Y(316)	Y(316)	Y(316)
A(317)	T(317)	T(317)
T(318)	T(318)	T(318)
G(319)	G(319)	G(319)
E(320)	E(320)	E(320)
I(321)	I(321)	I(321)
I(322)	I(322)	I(322)
G(323)	G(323)	G(323)
D(324)	D(324)	D(324)
I(325)	I(325)	I(325)
R(326)	R(326)	R(326)
Q(327)	Q(327)	Q(327)
A(328)	A(328)	A(328)
H(329)	H(329)	H(329)
C(330)	C(330)	C(330)

Tabelle 5: Zusammengefasst gezeigt sind die Ergebnisse aus den Abbildungen 54, 55 und 56. Blau sind die Aminosäuren, die im V3-Modell einen Abstand von maximal 4 Å zum CCR5-Modell haben; die aus der Literatur genannten wichtigen Aminosäuren für den *entry* sind ebenfalls blau. Es zeigt sich, dass die Ergebnisse des V3/CCR5-Modells im N-terminalen V3 *stem* (grau) und *crown* (weiss) Abschnitt gut mit den Literatur-Ergebnissen übereinstimmen. Im C-terminalen V3 *stem* (gelb) Abschnitt unterscheiden sich jedoch die Daten.

Neben der V3-Loop aus dem gp120 zeigen Mutationexperimente, dass auch Aminosäuren aus der C4-Domäne einen wichtigen Einfluss bei der gp120 CCR5 Bindung haben.

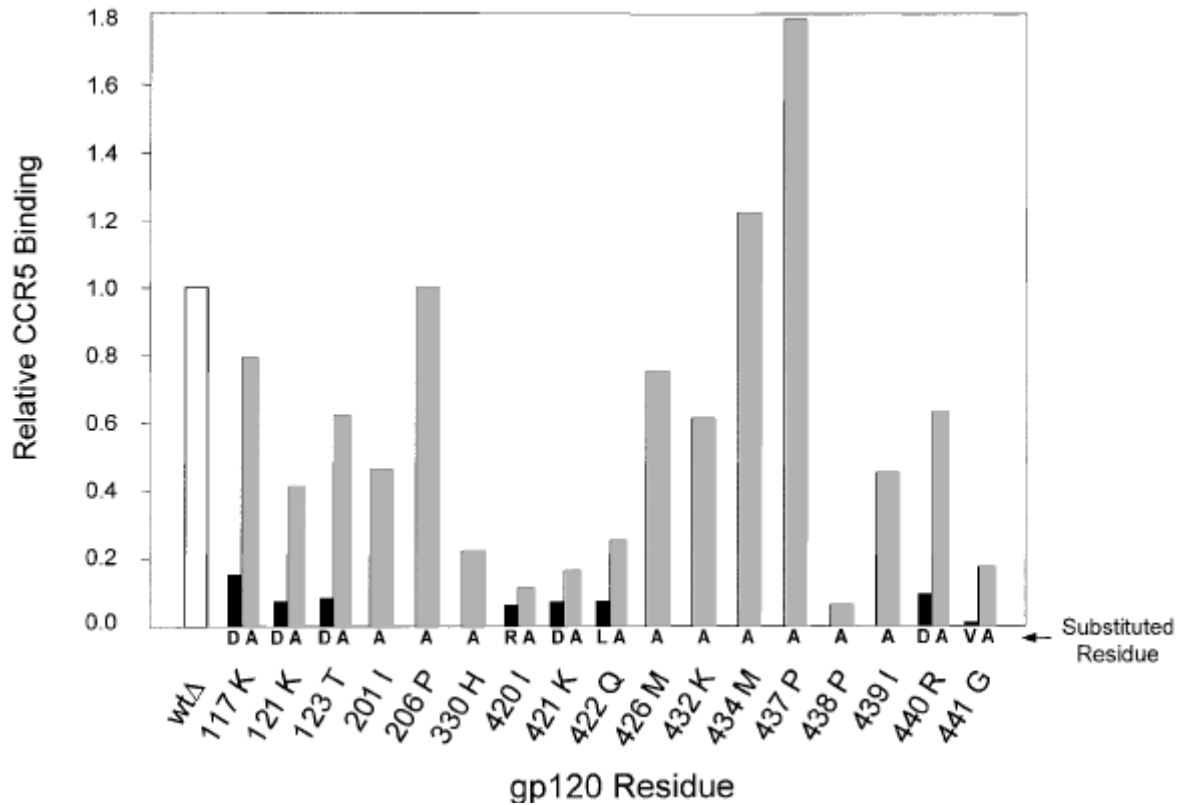


Abbildung 57: Einfluss von Aminosäure Substitutionen im gp120, ausserhalb des V3-Loops Abschnittes, auf die Fähigkeit an CCR5 zu binden. Ergebnisse der Alanin Substitutionen sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet; Substitutionen mit anderen Aminosäuren tragen einen grauen Balken.¹¹⁴

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse aus der Abbildung 57 und gegenübergestellt Aminosäuren aus dem gp120-Modell aus der vorliegenden Arbeit, die in einem Abstand von maximal 4 Å zum gedockten CCR5-Modell stehen. Es wurden nur die Aminosäuren ausserhalb der V3-Loop berücksichtigt. Die Rolle dieser Aminosäuren auf die Bindung muss aber nicht auf direkte Wechselwirkung zurückzuführen sein.

gp120/CCR5-Modell (Aminosäuren in einen max. Abstand von 4 Å)	Wichtige Aminosäuren; 1.0= <i>wilde-type</i> (Ref. Abb. 55)
	K(117) 0.8
	K (121) 0.4
	T (123) 0.6
	I (201)0.42
P(206)	P(206) 1.0
K(207)	-
I(208)	-
S(209)	-
F(210)	-
E(211)	-
	H (330) 0.22
G(380)	-
G(379)	-
E(381)	-
	I(420) 0.1
	K(421) 0.12
	Q(422) 0.25
	M (426) 0.7
	K (432) 0.6
	M (434) 1.2
	P (437) 1.7
P(438)	P(438) 0.05
I(439)	I (439) 0.5
R(440)	R (440) 0.65
G(441)	G(441) 0.2
Q(442)	-
I(443)	-

Tabelle 6: Ergebnisse aus der Abbildung 57 sind den Aminosäuren aus dem gp120-Modell gegenübergestellt, die in einem Abstand von maximal 4 Å zum gedockten CCR5-Modell stehen. Grau unterlegt sind die Aminosäuren der C4-Domäne aus dem gp120.

Der Vergleich der Ergebnisse aus der Tabelle 6 zeigt, dass für die Interaktion wichtige C4-Domäne im gp120-Modell in einer sinnvollen Entfernung zum CCR5 steht. Die Mutationsergebnisse zeigen noch weitere Aminosäuren aus der C4-Domäne auf, die wichtig für die Wechselwirkung sind. Hier könnte versucht werden das Modell zu verbessern, um zu prüfen, ob dieser Bereich noch näher an das CCR5 heran rücken kann.

4.6 Abstandsmessungen CCR5/V3

Mit der *molecular modelling* Software SYBYL 7.0⁸⁶ wurden die Abstände aller Atome aus dem V3-Loop-Modell zu sämtlichen Atomen aus dem extrazellulären Bereich des CCR5-Modells vermessen. Hierfür wurde das CCR5/V3-Modell aus Abschnitt 4.1 genutzt. Das Ergebnis waren 1.182.722 Abstände. Aufgrund der Datenmenge zeigt Tabelle 7 nur einen Ausschnitt der Daten.

	1 (V3-Atom-ID)	2 (V3-Atom-ID)	3 (V3-Atom-ID)	4 (V3-Atom-ID)	5 (V3-Atom-ID)	6 (V3-Atom-ID)	7 (V3-Atom-ID)	8 (V3-Atom-ID)
2019 (CCR5 Atom-ID)	19.260 Å	18.695 Å	17.437 Å	17.383 Å	19.770 Å	21.147 Å	19.431 Å	18.476 Å
2036 (CCR5 Atom-ID)	18.453 Å	17.826 Å	16.527 Å	16.387 Å	18.826 Å	20.241 Å	18.602 Å	17.647 Å
2037 (CCR5 Atom-ID)	18.911 Å	18.324 Å	17.137 Å	17.155 Å	19.426 Å	20.714 Å	19.155 Å	18.022 Å

Tabelle 7: Auszug aus den 1.182.722 vermessenen Abständen des CCR5/V3-Modells. Aufgeführt sind die V3-Atom-IDs gegen die CCR5-Atom-IDs. Somit liegt für jedes Atom aus der V3-Loop der Abstand zu jedem Atom aus dem CCR5-Modell vor. Für nachfolgende Arbeiten, wie STD-NMR Ergebnisse, könnten die Daten genutzt werden, um sie gegeneinander abzugleichen.

4.7 Dockingstudien mit den Chemokinen MIP- α , MIP- β und Rantes

Da die Wechselwirkung des positiv geladenen Dreiecks aus Arg298, Arg304 und Lys305 der V3-Loop aus dem gp120 mit den negativ geladenen Dreieck der sulfatierten Tyrosinen Tyr3, Tyr10 und Tyr14 des CCR5 beim HIV *entry* wahrscheinlich eine bedeutende Rolle zukommt, ergibt sich die Frage, ob es auch eine ähnliche Interaktion mit den natürlichen Chemokin-Liganden des CCR5-Rezeptors gibt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde dieser Ansatz untersucht. Der Vergleich der Sequenzen von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES in der Abbildung 58 zeigt, dass in jedem der Chemokine drei positive Aminosäuren vorliegen, die in einer Entfernung in der Sequenz stehen, die es ermöglichen würde ein positiv geladenes Dreieck zu bilden. Das positive Dreieck könnte mit den sulfatierten Tyrosinen aus dem CCR5 interagieren.

V3-Loop

CT**R**PSNNT**RK**SIHIGPGRAF YATGEIIGDIRQAHC

MIP-1 α

SLAADTPTACCF $\text{SYTSRQIPQNFIAAYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVOK}$

MIP-1 β

APMGSDPPTACCF $\text{SYTARKLPRNFVVDYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSEWVO}$

Rantes

SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPVVFV**TRK**NRQVCANPEKKWVRE

Abbildung 58: Die Auflistung der Primärsequenzen zeigt, dass sowohl in der V3-Loop als auch in den Chemokinen MIP-1 α , MIP-1 β und Rantes sich die Aminosäuren Arginin und Lysin in einem Abstand befinden, der es ermöglichen würde ein positiv geladenes Dreieck zu bilden.⁸⁰

Zur Beantwortung der Frage, ob die Aminosäuren mit den positiv geladenen Seitenketten an der Chemokin-Oberfläche eine Dreiecks-Konformation einnehmen und zur Ausbildung einer Wechselwirkung mit dem Rezeptor führen kann, wurde mit den Struktur-Modellen der Chemokine untersucht. Im ersten Schritt wurden die Strukturen 1B53 (MIP-1 α), 1HUM (MIP-1 β) und 1RTO (Rantes) von der PDB-Datenbank geladen.⁸⁰ Die Strukturen basieren auf Röntgenstrukturdaten. Anschließend erfolgte die Aufbereitung. Die Chemokine lagen als Dimere vor, was ihrer Form beim Transport durch den Organismus entspricht. Vor der Wechselwirkung mit einem Rezeptor wird das Dimer aufgelöst und das Chemokin agiert als Monomer mit dem Rezeptor.¹⁰⁹ Um dies zu berücksichtigen wurden die Strukturen entsprechend aufbereitet, damit die nötigen Monomere zur Verfügung standen.

In den Abbildungen 60, 62 und 64 ist zu erkennen, dass wie schon bei der V3-Loop, es auch bei den Chemokinen zu einer Dreiecks-Konformation der Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten kommt. Das Ergebnis des durchgeführten Dockings zeigt, dass es möglich ist die Chemokine so zu positionieren, dass das positive geladene Dreieck der Chemokine mit dem negativen Dreieck, gebildet aus den sulfatierten Tyrosinen des Rezeptors, interagieren kann.

Zusätzlich ermöglicht diese Anordnung der Liganden zum Rezeptor auch mit den restlichen Aminosäuren eine sinnvolle Wechselwirkung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl in der V3-Loop, als auch in den Chemokinen das Strukturmotiv eines positiv geladenen Dreiecks vorhanden ist. Hierdurch wird die Bedeutung des Strukturmotivs weiter verstärkt und es kann als Ansatzpunkt bei der Entwicklung von Inhibitoren dienen, um diesen Bereich des Rezeptors gezielt zu blockieren.

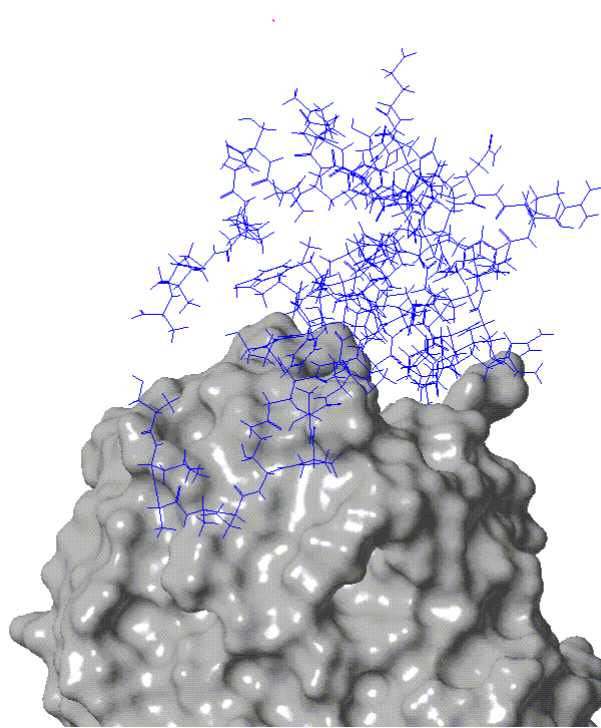


Abbildung 59: MIP-1 α (blau) angelagert an den CCR5-Rezeptor. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

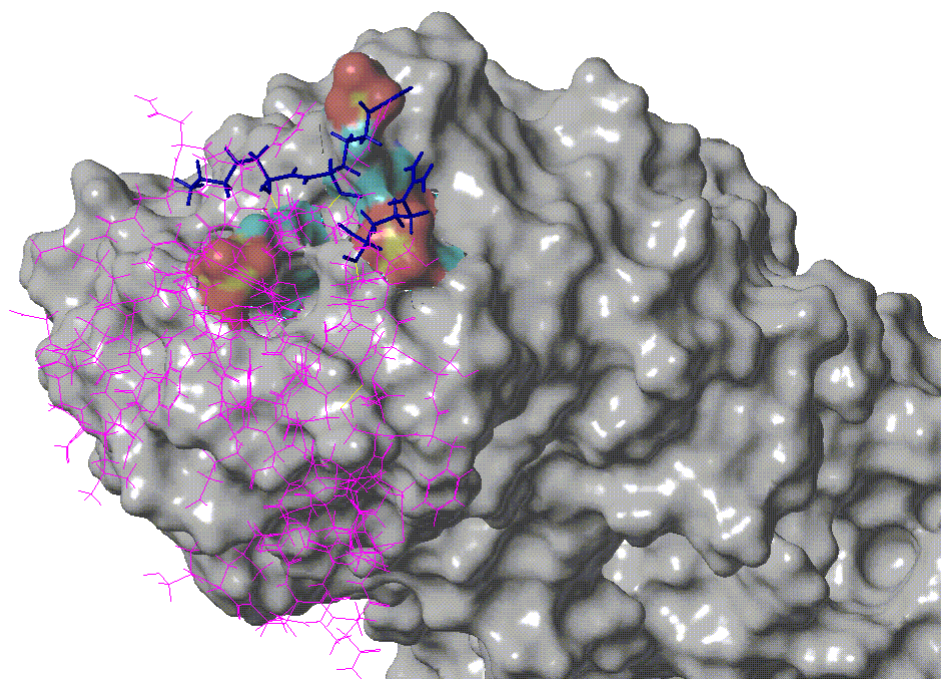


Abbildung 60: Die Aminosäuren K44, R45 und R47 in blau dargestellt aus MIP-1 α bilden ebenfalls, wie in der V3-Loop, ein positiv geladenes Dreieck und können daher mit den sulfatierten Tyrosinen Y3, Y10 und Y14, rot/gelb im Oberflächenmodell von CCR5 dargestellt, ideal interagieren. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

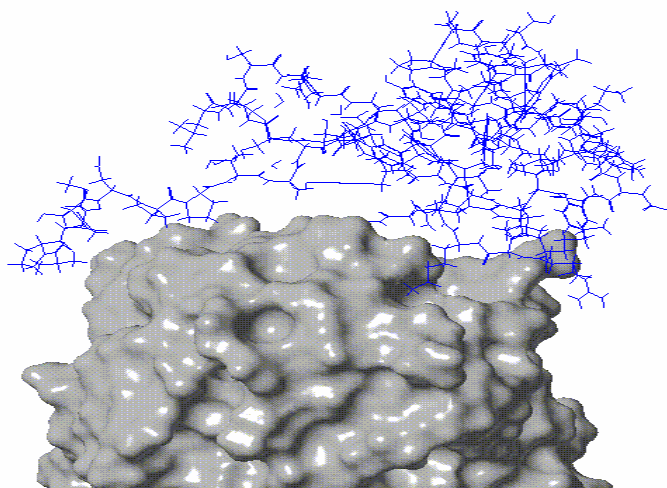


Abbildung 61: MIP-1 β in blau dargestellt angelagert an den CCR5-Rezeptor. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

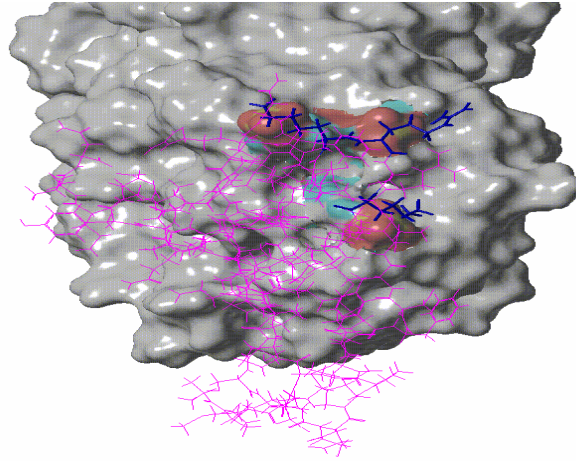


Abbildung 62: Die Aminosäuren K45, R46 und K48 in blau dargestellt aus MIP-1 β bilden ebenfalls wie in der V3-Loop ein positiv geladenes Dreieck und können daher mit den sulfatierten Tyrosinen Y3, Y10 und Y14, rot/gelb im Oberflächenmodell von CCR5 dargestellt, ideal interagieren. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

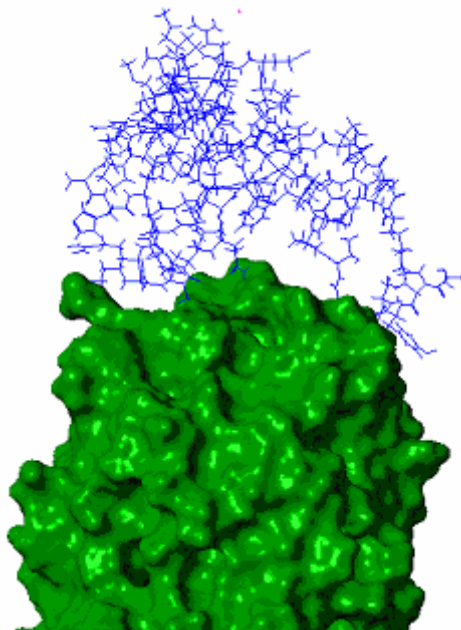


Abbildung 63: Rantes in blau dargestellt angelagert an den CCR5-Rezeptor. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

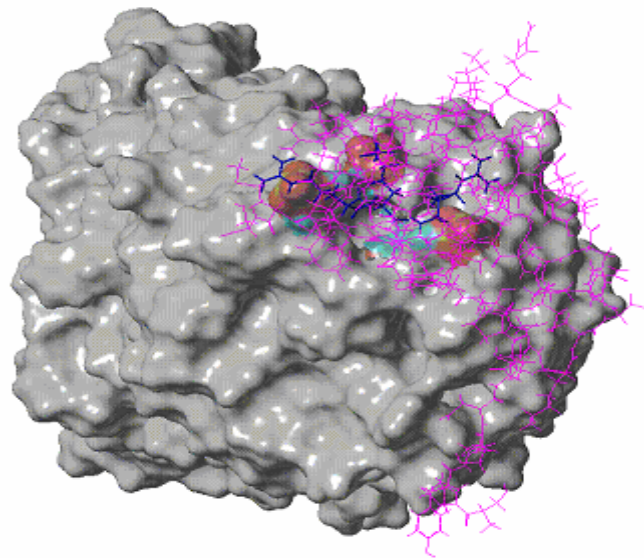


Abbildung 64: Die Aminosäuren R44, K45 und R47 in blau dargestellt aus Rantes bilden ebenfalls wie in der V3-Loop ein positiv geladenes Dreieck und können daher mit den sulfatierten Tyrosinen Y3, Y10 und Y14, rot/gelb im Oberflächenmodell von CCR5 dargestellt, ideal interagieren. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/capped stick*)

CCR5	Seitenlänge	V3	Seitenlänge [Å]	MiB-A	Seitenlänge [Å]	MiB-B	Seitenlänge [Å]	Rantes	Seitenlänge [Å]
TYR10-TYR14	9.4 Å	LYS305-ARG304	9,0	ARG45-ARG47	7,3	ARG46-Lys48	12,6	Lys45-ARG47	8,3
TYR10-TYR3	12.2 Å	LYS305-ARG298	11,8	Lys44-ARG47	14,6	Lys45-48	17,9	ARG44-Lys45	9,5
TYR14-TYR3	13.2 Å	ARG304-ARG298	11,9	ARG44-ARG45	12,9	Lys45-ARG46	13,6	ARG44-Lys47	15,5

Tabelle 8: Aufgeführt sind die Abstände der negativ geladenen Gruppen im CCR5-Modell und der positiv geladenen Gruppen im V3-Loop-Modell, MIP-1 α , MIP-1 β und Rantes.

Wie in der Abbildung 65 beschrieben sind elektrostatische Wechselwirkungen in der Anfangsphase der Interaktion zwischen einem Chemokin und CCR5 von wichtiger Bedeutung. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse in Bezug auf den Wechselwirkung zwischen den sulfatierten Tyrosinen des CCR5 sowie den positiv geladenen Dreiecken aus MIP-1 α , MIP-1 β oder Rantes könnten eine wichtige Bedeutung zukommen als Ankerpunkt zwischen Liganden und Rezeptor in der Anfangsphase der Chemokin/CCR5-Wechselwirkung.

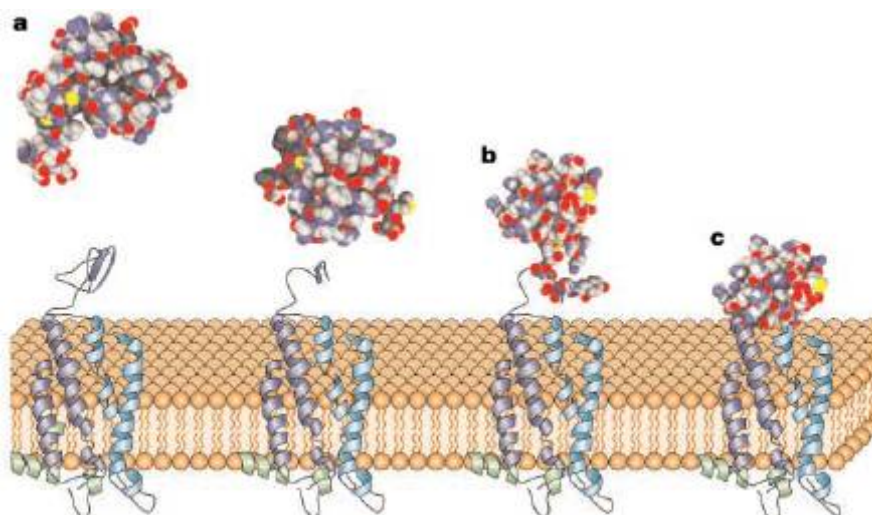


Abbildung 65: Model der Interaktion von einem Chemokin basierend auf Strukturen von CCR5 und Rantes. a+b) Die Annäherung eines Chemokin erfolgt unterstützend durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativen Ladungen der extrazellulären CCR5 Abschnittes und der positiven Ladungsschwerpunkte seitens der Chemokine. Nach dem initialen Docking kommt es zu weiteren Wechselwirkungen, u.a. im Bereich des N-Terminus der Liganden. c) Stabilisierung des Komplexes.¹¹⁸

4.8 CCR5 Einbettung in eine Lipiddoppelschicht

In den bisherigen Abschnitten der Arbeit wurde unter anderem die Sulfatierung der Tyrosine im N-Terminus des CCR5-Rezeptors untersucht und die Theorie von der Dreiecks-Wechselwirkung aufgestellt, die annimmt, dass drei negativ geladene Tyrosine mit drei positiv geladenen Aminosäuren aus der V3-Loop wechselwirken. Somit konnte ein Erklärungsansatz für einen wichtigen Schritt des HIV *entry* gegeben werden.

Bei der bisherigen Betrachtung der Wechselwirkung der V3-Loop mit dem Rezeptor wurde ein möglicher Einfluss der Zellmembran, in der sich der Rezeptor befindet, außer Acht gelassen. Im weiteren Verlauf der Arbeit richtete sich der Fokus darauf, ob die im Rahmen der Arbeit entwickelte Orientierung der V3-Loop zum Rezeptor auch möglich ist, wenn der Rezeptor in der Zellmembran sitzt. Im ungünstigen Fall könnte die V3-Loop, der Rest des gp120 oder der CD4-Rezeptor in die Zellmembran hineinragen, wodurch sich diese Orientierung als nicht sinnvoll herausstellen würde.

Der CCR5-Rezeptor mit der V3-Loop wurde in eine Lipiddoppelschicht eingebettet. Hiefür wurde das von Prof. Martz, University of Massachusetts, entwickelte Modell der 1-Palmitoyl-2-oleoyl phosphatidyl choline bilayer¹¹⁰ genutzt. Mit der Entfernung von Lipidmolekülen aus

der Lipiddoppelschicht konnte der nötige Freiraum geschaffen werden, um den Rezeptor einzubetten. Nach dem Einsetzen des Rezeptors mit der gedockten V3-Loop wurde die gesamte Struktur minimiert und durch eine MD-Simulation optimiert. In der Abbildung 66 ist das Ergebnis abgebildet. Es ist zu sehen, dass sich die V3-Loop sehr gut in den extrazellulären Bereich des CCR5-Rezeptors einpasst, die im vorangegangenen Teil der Arbeit beschriebenen Wechselwirkungen ausführen kann und dabei nicht in die Lipiddoppelschicht bzw. der Zellmembran hineinragt.

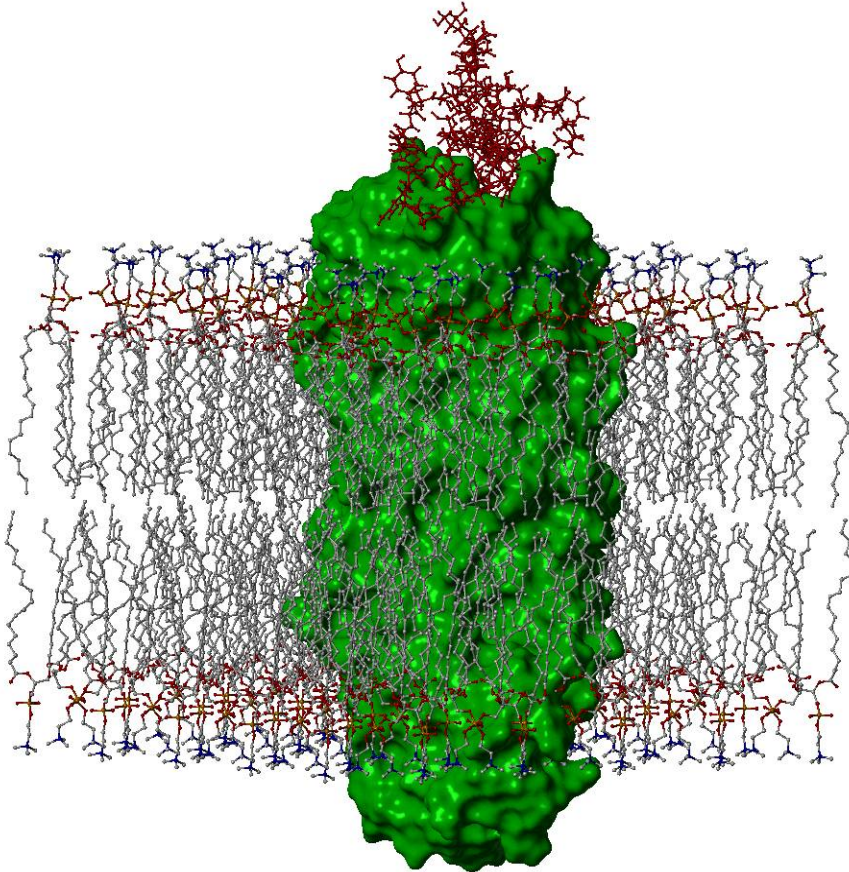


Abbildung 66: Der CCR5-Rezeptor eingebettet in eine Lipiddoppelschicht. Die V3-Loop (rot) hat in der gedockten Position, die im Rahmen der Arbeit vorgestellt wurde, genügend Freiraum. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

4.9 Einpassung in den Gesamtkomplex gp120/CD4

Die Ergebnisse im vorangegangenen Abschnitt zeigen, dass das V3-Loop-Modell nicht in die Zellmembran ragt. In die weitere Überlegung muss aber noch einbezogen werden, dass die V3-Loop eine Loop bzw. ein Abschnitt des gp120 vom HIV-1 ist. Hinzukommt, dass das gp120 zuerst mit einem diskontinuierlichen Epitop von Aminosäuren aus sechs konstanten und variablen Domänen an den CD4-Rezeptor bindet, um anschließend mit einer einhergehenden Konformationsänderung mit der V3-Loop am CCR5 zu interagieren. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob die vorliegenden Ergebnisse auch in den Gesamtkontext passen. Für die Beantwortung der Frage sind Modell-Strukturen vom gp120 und CD4 notwendig. Im Wesentlichen kommen hierfür die von Kwong *et al.*²⁴ und Huang *et al.*⁹³ entwickelten Strukturen in Betracht.

Kwong *et al.* gelang 1998 die Aufnahme einer Röntgenstruktur eines kristallisierten ternären Komplexes aus einem modifizierten gp120, dem D1-D2-Fragment des humanen CD4 und einem Antikörper-Fab-Fragment. Dabei waren N- und C-Terminus des gp120 um 52 bzw. 19 Aminosäuren verkürzt, die variablen Bereiche V1, V2 sowie V3 fehlten gänzlich und die N-Glycane waren bis auf den ersten GlcNAc-Rest entfernt worden. Gp120 bildete unter diesen Umständen eine äußere Domäne, die durch ein viersträngiges β -Faltblatt (*bridging sheet*) mit einer inneren Domäne verbunden war.

Huang *et al.*⁹³ erhielt 2005 einen ternären Komplex aus dem D1-D2-Fragment des humanen CD4, einem Antikörper-Fab-Fragment und dem unglycosylierten und modifizierten gp120 Kern, der die V3 enthält. Die erhaltene Struktur gleicht weitgehend der von Kwong *et al.*, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die V3-Loop des gp120 durch Interaktion mit dem CD4-Fragment oder dem Antikörper X5 30 Å in Richtung Zielzelle und somit Richtung Korezeptor herausgestreckt wird. Die V3-Loop ist in dieser Struktur daher durch den Antikörper und die gp120 Struktur stabilisiert und kann möglicherweise eine andere Orientierung einnehmen, als bei der Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor.

Für den weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur von Huang *et al.*⁹³ ausgewählt. Die Struktur hat Code 2B4C auf der Protein Datenbank (PDB).

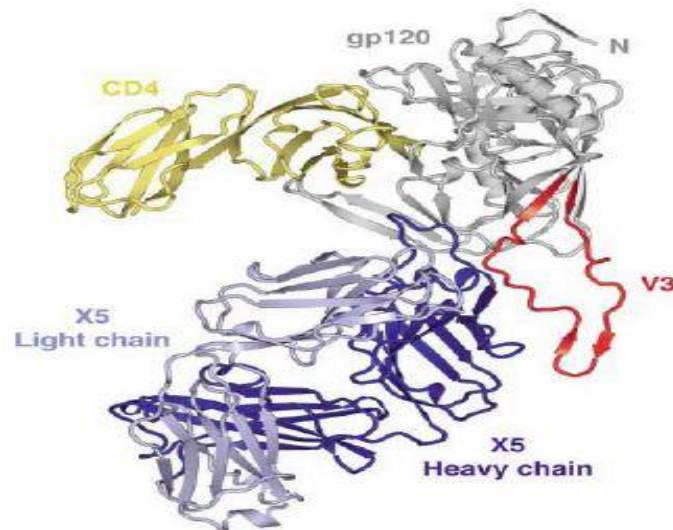


Abbildung 67: Darstellung der Röntgenstruktur des gp120 mit Wechselwirkung zum CD4-Rezeptor und zum Fab-Antikörper nach Huang *et al.*⁹⁹

Zuerst wurde der Antikörper und die V3-Loop aus dem Huang-Modell entfernt. An die gleiche Position wurde anschließend die in dieser Arbeit optimierte V3-Loop positioniert. Daraufhin konnte die Gesamtstruktur minimiert werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Positionierung des CCR5-Rezeptors, eingebettet in die Lipiddoppelschicht, an die V3-Loop. Die Positionierung entsprach dem Ergebnis des vorangegangenen Abschnittes 4.1. Die Abbildungen 68-74 zeigen, dass weder das gp120 in die Zellmembran hineinragt, noch der CCR5-Rezeptor in einer ungünstigen Position zum gp120 steht; auch der CD4-Rezeptor nimmt eine sinnvolle Position im Gesamtkomplex ein.

Somit werden die Ergebnisse des Dockings der V3-Loop an den CCR5-Rezeptor und die gefundenen einflussreichen Wechselwirkungen im Bereich der sulfatierten Tyrosine durch die Ergebnisse des Gesamtkomplexes bestätigt.

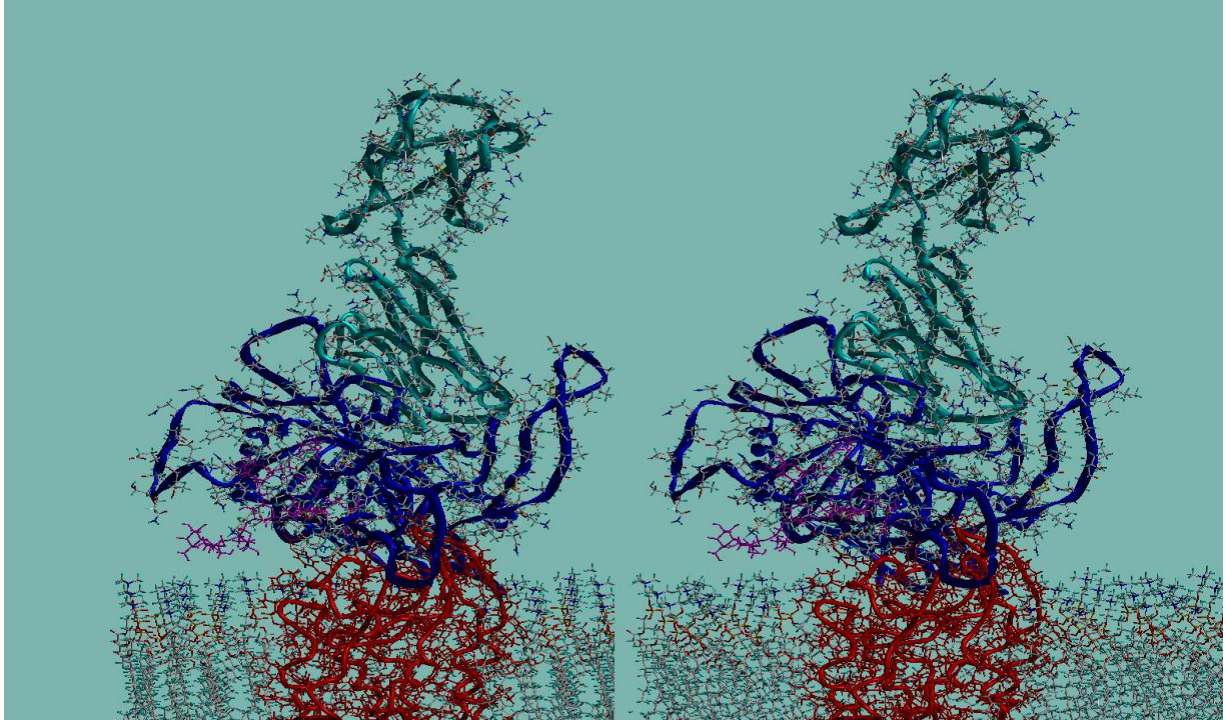


Abbildung 68: Der CCR5-Rezeptor (rot) eingebettet in die Lipidmembran. Angelagert ist das gp120 (blau), inklusive der V3-Loop (magenta), die in der gleichen Position zu dem CCR5-Rezeptor hin orientiert ist, wie es im Abschnitt 4.1 der Arbeit präsentiert wurde; der CD4-Rezeptor ist in türkis dargestellt. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *backbone/capped stick*)

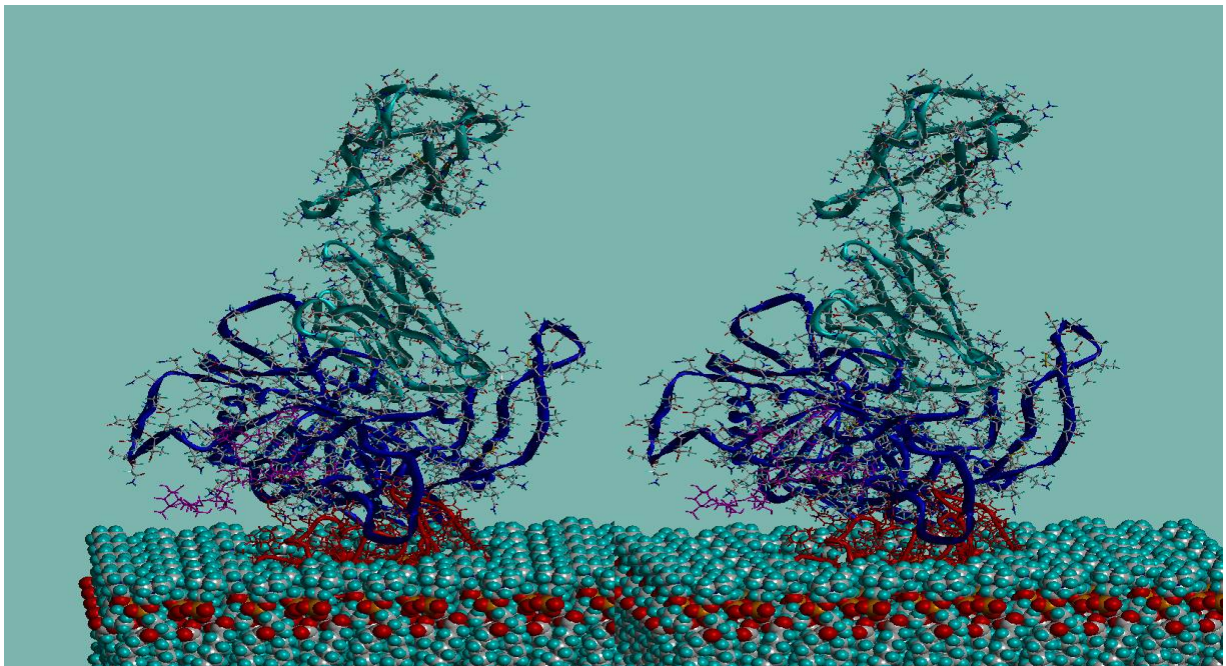


Abbildung 69: Im Unterschied zur Abbildung 68 ist die Lipidmembran als Kalottenmodell dargestellt. Aus der Membran ragt der extrazelluläre Bereich des CCR5-Rezeptor (rot).

Angelagert ist das gp120 (blau) inklusive der V3-Loop (magenta). Das gp120 steht auch mit dem CD4-Rezeptor (türkis) in Verbindung. Die Kalottendarstellung der Lipidmembran verdeutlicht, dass das gp120, inklusive der V3-Loop, mit dem extrazellulären Bereich des CCR5-Rezeptors interagieren kann, ohne dabei in die Lipidmembran zu ragen; hinzukommend hat auch der CD4-Rezeptor genügend Freiraum zur Entfaltung. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *backbone/capped stick/spacefill*)

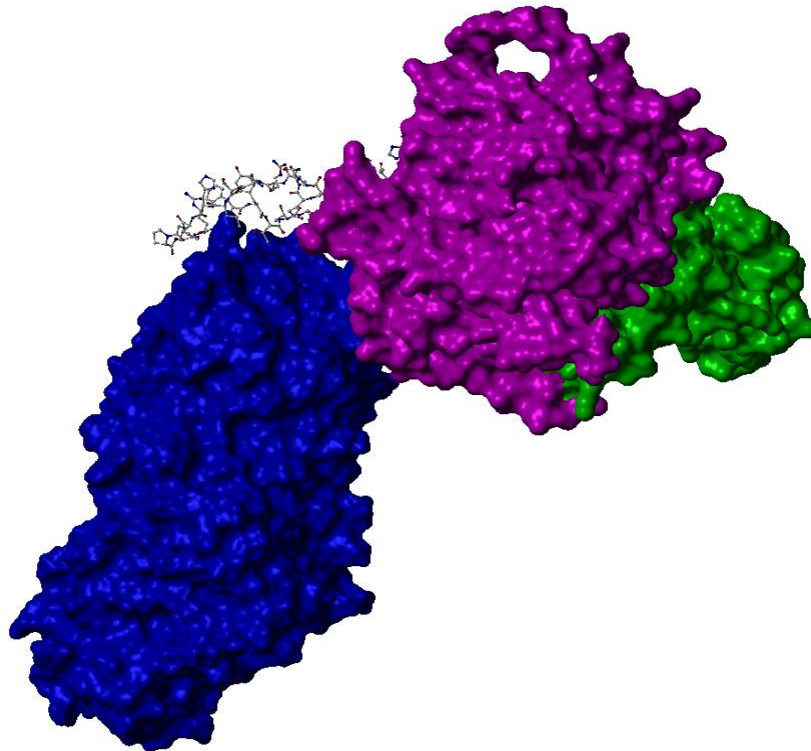


Abbildung 70: An dem CCR5-Rezeptor (blau) angelagert ist das gp120 (violett), inklusive der V3-Loop (*ball and stick*), die in der selben Position zu dem CCR5-Rezeptor hin orientiert ist, wie im Verlauf der Arbeit präsentiert wurde; der CD4-Rezeptor (grün) steht auch in Wechselwirkung mit dem gp120 und in einer sinnvollen Position zum Gesamtkomplex. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

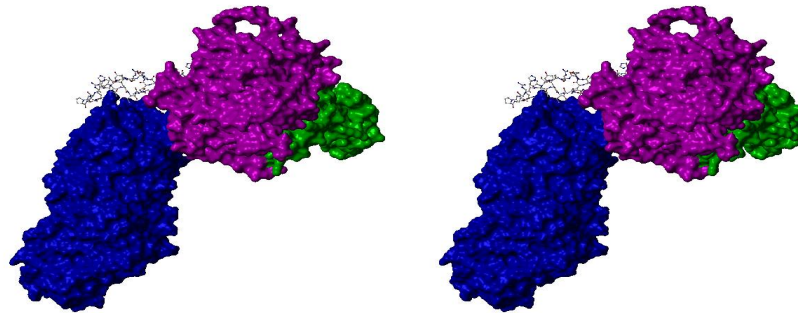


Abbildung 71: Gleiche Konstellation wie in Abbildung 70; die *stereo view Sichtweise* ist gewählt worden. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

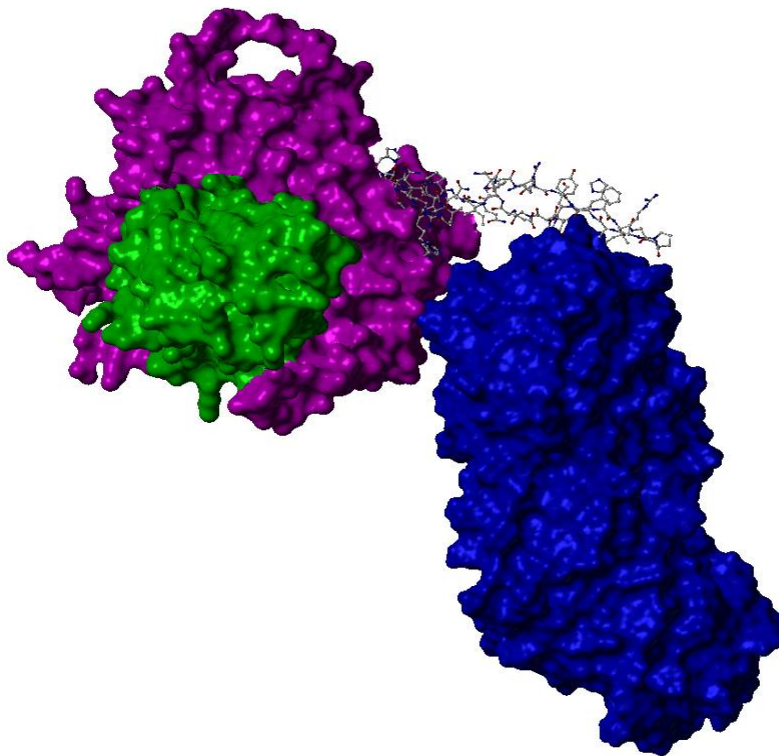


Abbildung 72: Im Vergleich zu Abbildung 70 ist der Blickwinkel auf den Komplex um 180° gedreht. An dem CCR5-Rezeptor (blau) angelagert ist das gp120 (violett), inklusive der V3-Loop, die in der selben Position zu dem CCR5-Rezeptor hin orientiert ist, wie im Verlauf der Arbeit präsentiert wurde; der CD4-Rezeptor (grün) steht auch in Wechselwirkung mit dem gp120 und in einer sinnvollen Position zum Gesamtkomplex. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

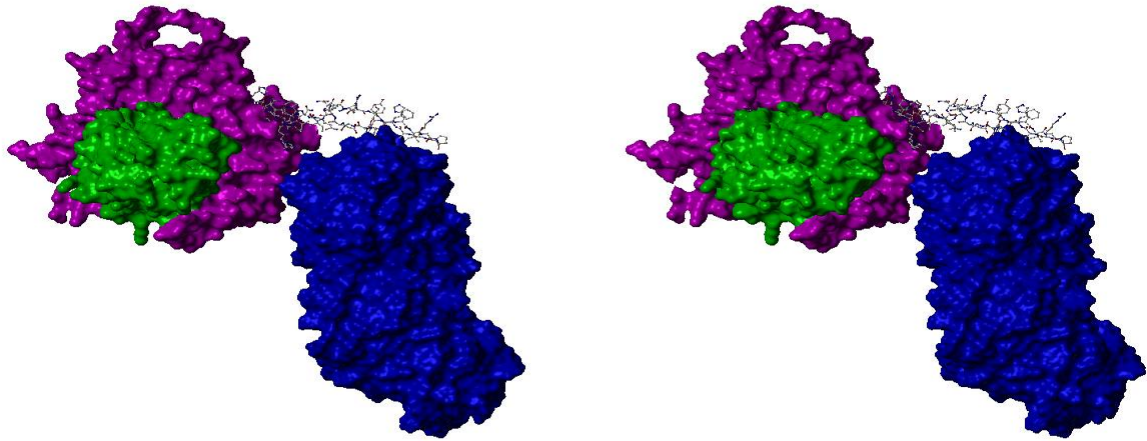


Abbildung 73: Gleiche Konstellation wie in Abbildung 72, nur die *stereo view* Sichtweise ist gewählt worden. (Aufgenommen mit: SYBYL 7.0 (Tripos Assoc.); Darstellungsform: *surface-style opaque/ball and stick*)

4.10 Ausblick

Die im Rahmen der Arbeit entwickelte Position der V3-Loop aus dem HIV-1 zum CCR5 konnte durch verschiedene Untersuchungen, wie die Einbettung der Struktur in den Gesamtkomplex aus gp120 und CD4, verfestigt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen könnten bestehende Inhibitoren der gp120/CCR5-Wechselwirkung optimiert und neuartige Inhibitoren entwickelt werden. Solche Inhibitoren könnten letztendlich zur Blockade der viralen Zell-Infektion beitragen. Dabei könnten Techniken wie das *in silico screening* oder das *de novo design* Anwendung finden. Bei der Entwicklung eines Inhibitors könnte nicht nur die Position der V3-Loop zum CCR5 als Grundlage dienen, sondern auch die Ergebnisse der Arbeit hinsichtlich des Einflusses der sulfatierten Tyrosine.

Die in der Arbeit präsentierten Ergebnisse können auch bei der Generierung weiterer Daten genutzt werden. Im Besonderen kann hierbei die Vermessung der Abstände der Ligand-Atome zum Rezeptor genutzt werden, um zum Beispiel zukünftige STD-Daten abzugleichen.

5 Zusammenfassung

Bei der Infektion einer Zelle mit dem HIV-1 bindet das virale Glycoprotein gp120 unter Ausbildung eines trimolekularen Komplexes an die Membranrezeptoren CD4 und CCR5.

Ein essentieller Schritt der HIV-Infektion von CD4⁺-Makrophagen ist die Interaktion der V3-Loop des viralen gp120 mit dem Korezeptor CCR5.¹⁹

Es ist bekannt, dass die Sulfatierung der Tyrosine im N-Terminus von CCR5 erforderlich ist für eine optimale HIV-1 Korezeptor und Chemokin Rezeptor Funktion. Phenylalanin-scans zeigten, dass die Sulfatierung der Tyrosine Tyr 3, Tyr 10, Tyr 14 und Tyr 15 einen unterschiedlichen Einfluss auf den HIV *entry* haben.⁴² Daher ergibt sich die Fragestellung welche sulfatierten Tyrosine für die Infektion von Bedeutung sind und aus welchem Grund.

MET1=ASP2=**TYR3(SO₃)**=GLN4=VAL5=SER6=SER7=PRO8=ILE9= **TYR3(SO₃)**=ASP11=ILE12=
ASN13= **TYR3(SO₃)**=**TYR3(SO₃)**=THR16=SER17=GLU18=PRO19=CYS20=GLN21=LYS22=ILE23=
ASN24=VAL25=LYS26=GLN27=ILE28=ALA29=ALA30=ARG31-

Abbildung 74: N-Terminus des CCR5-Rezeptors.¹⁰²

CYS296=THR297=**ARG298**=PRO299=ASN300=ASN301=ASN302=THR303=**ARG304**=**LYS305**=SER306
=ILE1307=HIS1308=ILE1309=GLY1310=PRO311=GLY1312=ARG313=ALA1314=PHE315=TYR316=T
HR317=THR318=GLY319=GLU320=ILE321=ILE322=GLY323=ASP324=ILE325=ARG326=GLN327=A
LA328=HIS329=CYS330

Abbildung 75: North American Consensus Sequenz der V3-Loop aus dem gp120.¹⁰²

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strukturmodelle für die Wechselwirkung der V3-Loop mit dem CCR5 Rezeptor und für den Komplex des gp120, CD4 und CCR5 entwickelt sowie optimiert. Dafür wurden V3- und CCR5-Strukturmodelle aus dem Arbeitskreis von Prof. B. Meyer im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet.^{89,90}

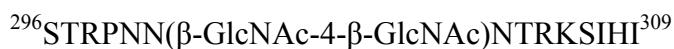
Die V3-Struktur konnte dahingehend sinnvoll an das CCR5-Modell angelagert werden, dass ein positives geladenes Dreieck, gebildet aus Arg 298, Arg 304 und Lys 305, über dem negativ geladenen Dreieck, gebildet aus den sulfatierten Tyr 3, Tyr 10 und Tyr 14, steht. Dies könnte eine Erklärung für die Bedeutung der Sulfatierung sein. Tyr 15 ist im CCR5-Modell im Inneren des Proteins zu finden. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit der Tatsache, dass das Tyr 15 beim HIV *entry* keine bedeutende Rolle spielt.

Der nächste Schritt war die Durchführung eines Dockings der V3-Loop an CCR5 mit dem Programm DOCK 4.0.¹⁰⁵ Im Rahmen des Dockings wurden 25 Millionen Orientierungen durchlaufen; die Orientierung mit der günstigsten Bindungsenergie, -26 kcal/mol, war fast identisch mit der selber entwickelten Konformation und Orientierung.

Ein *in silico* Alanin-scan der Tyrosine Tyr 3, Tyr 10, Tyr 14 sollte weiteren Aufschluss darüber geben welchen Einfluss die sulfatierten Tyrosine haben. Durchgeführte MD-Simulationen über 1 ns zeigten, dass die V3-Loop beim gedockten CCR5/V3-Modell in der Ausgangsposition verharrte, während sie sich beim Alanin-scan-Modell vom Rezeptor wegbewegte. Somit kann die Wechselwirkung zwischen den sulfatierten Tyrosinen und den Aminosäuren Arg 298, Arg 304 und Lys 305 aus der V3-Loop als ein Ankerpunkt interpretiert werden, der die V3-Loop in ihrer Orientierung zum Rezeptor fixiert.

Die theoretischen Ergebnisse konnten mit experimentellen Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Prof. B.Meyer abgeglichen werden. Verglichen wurden *STD-NMR* spektroskopische Daten und theoretische STD-Intensitäten, die mit einem im Arbeitskreis von Prof. B. Meyer entwickelten Programm berechnet wurden.¹⁰⁷ Das Programm vermisst alle Distanzen von Protonen des Liganden zu Protonen des Rezeptors im Abstand von bis zu 6 Å und berechnet darauf basierend ein Maß für die Intensität in einem theoretischen *STD-NMR* Spektrum.¹⁰⁸

Die experimentellen Ergebnisse basieren auf einem synthetisierten Teilstück der V3-Loop:



Dieses Teilstück wurde aus dem V3-Loop-Modell exzidiert und aufbereitet. Die theoretisch berechneten *STD-NMR* Intensitäten stimmen in den Grundzügen mit den experimentellen Ergebnissen überein.

Die natürlichen Liganden des CCR5-Rezeptors sind die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES.¹⁰⁹ Das Ziel des nächsten Schrittes war zu Untersuchen, ob positiv geladene Aminosäuren auch in den Chemokinen vorhanden sind und in einer entsprechenden Position stehen, um mit den sulfatierten Tyrosinen aus dem CCR5 zu interagieren. Es zeigte sich, dass auch eine Dreiecks-Konstellation aus den Aminosäuren K 44, R 45, R 47 bei MIP-1 α , K 45, R 46 und K 48 bei MIP-1 β und R 44, K 45 und R 47 bei Rantes vorliegt und die daraus resultierende Wechselwirkung mit einer sinnvollen Orientierung der Liganden zum Rezeptor einhergeht.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde das entwickelte CCR5/V3-Modell in einen auf Röntgenstrukturdaten basierenden Gesamtkomplex von Huang *et al.*⁹³, bestehend aus CD4 und dem gp120, eingesetzt. Zusätzlich wurde der CCR5-Rezeptor in eine Lipidmembran¹¹⁰ eingebettet. Es zeigte sich, dass sich die im Rahmen der Arbeit entwickelte Orientierung der V3-Loop zum CCR5-Rezeptor sinnvoll in den Gesamtkomplex integrieren lässt.

Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten detaillierten Aussagen über die Bindungsaffinität der V3-Loop zu dem CCR5-Rezeptor sind wertvoll für das molekulare Verständnis und für die Entwicklung von Inhibitoren.

6 Summary

Infection of a cell with HIV-1 begins with binding of the viral glycoprotein gp120 to the membrane receptors CD4 and CCR5 forming a trimolecular complex. One of the essential steps of the HIV infection of CD4⁺-macrophages is the interaction of the V3-loop of the viral gp120 with the coreceptor CCR5.¹⁹

It is well established that the sulfation of tyrosine residues in the N-terminus of CCR5 is required for optimal HIV-1 coreceptor and chemokine receptor function. However, it has not been clear which of the four tyrosines are sulfated and phenylalanine scanning has demonstrated that the sulfation of each tyrosine residues Tyr 3, Tyr 10, Tyr 14 and Tyr 15 respectively has a different influence on the HIV entry.⁴² This leads to the questions: What is the reason for the sulfation and why has the sulfation a different influence?

MET1=ASP2=**TYR3(SO₃⁻)**=GLN4=VAL5=SER6=SER7=PRO8=ILE9= **TYR3(SO₃⁻)**=ASP11=ILE12=
ASN13= **TYR3(SO₃⁻)**=**TYR3(SO₃⁻)**=THR16=SER17=GLU18=PRO19=CYS20=GLN21=LYS22=ILE23=
ASN24=VAL25=LYS26=GLN27=ILE28=ALA29=ALA30=ARG31-

Illustration 74: The amino acid sequence of the N termini of CCR5.¹⁰²

CYS296=THR297=**ARG298**=PRO299=ASN300=ASN301=ASN302=THR303=**ARG304**=**LYS305**=SER306
=ILE1307=HIS1308=ILE1309=GLY1310=PRO311=GLY1312=ARG313=ALA1314=PHE315=TYR316=T
HR317=THR318=GLY319=GLU320=ILE321=ILE322=GLY323=ASP324=ILE325=ARG326=GLN327=A
LA328=HIS329=CYS330

Illustration 75: The amino acid North American Consensus sequence of the V3-Loop.¹⁰²

In the context of this work structural models for the correlation of the V3-Loop with the CCR5 Receptor and for the complex of the gp120, CD4 and CCR5 were developed and optimized. Therefore V3- and CCR5-structure-models of the research group of Prof. B.Meyer were used within the frame of the present dissertation.^{89,90}

The V3-structure has been optimized as ligand to the CCR5-model with the result of a positive charged triangle (built with Arg 298, Arg 304 and Lys 305), standing above the negative charged triangle (built with the sulfated Tyr 3, Tyr 10 and Tyr 14).

This is an explanation for the importance of the four sulfation sites. The fact that Tyr 15 in the CCR5-model is oriented inwards, explains why it does not have a significant role during the HIV entry. The next step was the implementation of docking the V3-loop on CCR5 with the DOCK 4.0¹⁰⁵ software. Within the docking 25 million orientations of the V3-loop were tested. The orientation with the best bond energy -26 kcal/mol was nearly identical with the orientation discussed in the last chapter.

An *in silico* Alanin-scan of the tyrosine Tyr 3, Tyr 10, Tyr 14 was performed to more information about the influence of the sulfated tyrosine. MD simulations of a duration of 1 ns showed that the V3-Loop stayed in the docked CCR5/V3-model in the basic position while it moved away from the receptor in each of the alanin-scan-models.

Therefore the interaction between the sulfated tyrosine residues and the amino acid Arg 298, Arg 304 and Lys 305 of the V3-loop can be interpreted as a local point which locates the V3-loop in its orientation to the receptor.

The theoretical results have been compared with experimental results from the workgroup of Prof. B.Meyer. STDD-NMR spectroscopical data and theoretical STD-intensities were calculated with a program developed by the workgroup of Prof. B.Meyer.¹⁰⁷ This software measures all distances from proton of the ligand to the proton of the receptor in distance of up to 6 Å and calculates on the basis of this results a measurement for the intensity in a theoretical STD NMR spectrum.¹⁰⁸

The experimental results base on a synthesis part of the V3-loop:

²⁹⁶STRPNN(b-GlcNAc-4-β-GlcNAc)NTRKSIHI³⁰⁹

This section was cut out of the V3-loop-model. The theoretically calculated STD NMR intensities correspond to the main features of the experimental results.

The natural ligands of the CCR5-rezeptor are the chemokines MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES¹⁰⁹. The intention of the next step was to analyse if positive charged amino acids also exist in the Chemokine and if they stand in a corresponding position to induce a interaction with the sulfated tyrosine of the CCR5.

The analysis showed also a triangle conformation of the amino acid K 44, R 45, R 47 in MIP-1 α , K 45, R 46, K 48 in MIP-1 β , R 44, K 45, R 47 in Rantes. The resultant interactions put the ligands in a reasonable orientation relative to the receptor.

In the last chapter of the study the developed CCR5/V3-model has been implemented in a gp120/CD4-structure of Huang *et al*⁹³, based on X-ray analysis, composed of CD4 and gp120. Additional to this, the CCR5-rezeptor was embedded in a lipid bilayer. The analysis showed that the orientation of the V3-loop to the CCR5-rezeptor, which has been developed within the study, can be integrated reasonable into the CD4/gp120/CCR5 complex.

The detailed analysis of the binding affinity V3-loop to the CCR5-rezeptor is important for the molecular understanding and can be used for the design of new inhibitors.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Hard- und Software

Hardware

Handelsübliche PCs (X32 Prozessor)

Silicon Graphics Workstations (Octane2/R14000)

HP-Workstation (Red Hat, 64 bit)

Software

DOCK (SPHGEN, AUTOMS, GRID, SHOWBOX, CHIMERA) <http://dock.compbio.ucsf>

SYBYL *molecular modelling package*, Version 7.0; Tripos, Inc.: St.Louis, M

Tripos Bookshelf 7.0, Tripos Inc., St. Louis, MO, USA

MDL ISIS Draw 2.5

Swiss-PDB-Viewer 3.5

RasMol 2.7

Im folgendem sind die Parameter-Werte von den genutzten Programmen aufgelistet. Die angegebenen Werte wurden standardisiert genutzt; Abweichungen werden explizit im Rahmen der Arbeit angegeben.

7.2 DOCK 4.0 suite: MS

DOCK 4.0 suite: MS (molecular surface program)	
command	dms CCR5_ohne_H.pdb -a -n -w 1.4 -v -o CCR5_ganz.ms
Anzahl verwendeter Atome	2916 atoms
Atomtyp/Anzahl verwendeter Atome	S 23
Atomtyp/Anzahl verwendeter Atome	O 488
Atomtyp/Anzahl verwendeter Atome	N 462
Atomtyp/Anzahl verwendeter Atome	C 1903
Atomtyp/Anzahl verwendeter Atome	??? 40
Output data	Servers initialized
Output data	Neighbors computed
Output data	Probes computed
Output data	Neighbors sent
Output data	Surface computed
Output data	Server request count:
Output data	localhost 109518
Output data	101466 points (25411 contact, 76055 reentrant)
Output data	18738.77 sq. A (4990.89 contact, 13747.88 reentrant)
Output data	5.41 pts/sq.A (5.09 contact, 5.53 reentrant)

Tabelle 9: DOCK 4.0 suite: MS (MOLECULAR SURFACE program); Verwendet für das docking der V3-Loop an CCR5.

7.3 DOCK 4.0 suite: INSPH

DOCK 4.0 suite: INSPH (Parameter-Datei für das DOCK 4.0 Programm SPHGEN)	
Input paramter	fxa.ms
Input paramter	R
Input paramter	X
Input paramter	0.0
Input paramter	4.0
Input paramter	1.4
Input paramter	fxa.sph

Tabelle 10: DOCK 4.0 suite: INSPH

7.4 DOCK 4.0 suite: SPHGEN

DOCK 4.0 suite: SPHGEN	
command	sphgen
Beispiel für generierte <i>spheres</i> Koordinaten	12 1.13140 -1.54981 1.66457 1.412 50 0 0
Beispiel für generierte <i>spheres</i> Koordinaten	13 2.05033 0.58400 1.92492 1.633 737 0 0
Beispiel für generierte <i>spheres</i> Koordinaten	14 2.31359 -0.35341 2.04997 1.792 737 0 0

Tabelle 11: DOCK 4.0 suite: INSPH

7.5 DOCK 4.0 suite: SHOWSHERE

DOCK 4.0 suite: SHOWSHERE	
Enter name of sphere cluster file:	CCR5_nur_THR.sph
Input paramter	Enter cluster number to process (<0 = all): 0
Input paramter	Generate surfaces as well as pdb files (<N>/Y)? n
Input paramter	Enter name for output PDB file name: CCR5_nur_THR_showsphere.pdb

Tabelle 12: DOCK 4.0 suite: SHOWSHERE

7.6 DOCK 4.0 suite: SHOWBOX

DOCK 4.0 suite: SHOWBOX	
command	showbox
Input paramter	automatically construct box to enclose spheres [Y/N]? y
Input paramter	extra margin to also be enclosed (angstroms)? (this will be added in all 6 directions) 2
Input paramter	sphere file- CCR5_nur_extraZ.sph
Input paramter	cluster number- 0
Input paramter	output filename? CCR5_nur_extraZ_showbox_0_cl

Tabelle 13: DOCK 4.0 suite: SHOWBOX

7.7 DOCK 4.0 suite: GRID

DOCK 4.0 suite: GRID		
Input parameter (grid.in)	1 compute_grids	yes
Input parameter (grid.in)	2 grid_spacing	0.3
Input parameter (grid.in)	3 output_molecule	no
Input parameter (grid.in)	4 contact_score	yes
Input parameter (grid.in)	5 contact_cutoff_distance	4.5
Input parameter (grid.in)	6 chemical_score	no
Input parameter (grid.in)	7 energy_score	yes
Input parameter (grid.in)	8 energy_cutoff_distance	12
Input parameter (grid.in)	9 atom_model	a
Input parameter (grid.in)	10 attractive_exponent	6
Input parameter (grid.in)	11 repulsive_exponent	12
Input parameter (grid.in)	12 distance_dielectric	yes
Input parameter (grid.in)	13 dielectric_factor	15
Input parameter (grid.in)	14 bump_filter	yes
Input parameter (grid.in)	15 bump_overlap	0.75
Input parameter (grid.in)	16 receptor_file	CCR5.mol2
Input parameter (grid.in)	17 box_file	CCR5_nur_THR_showbox_0_cl
Input parameter (grid.in)	18vdw_definition_file	/usr/user7/wscherres/dock_CCR5_V3_2/dock/parameter/vdw.defn
Input parameter (grid.in)	19 score_grid_prefix	grid
command	grid -i	
Beispiel für generierte Ladungen	CHARGED RESIDUE MET1: 1.038	
Beispiel für generierte Ladungen	CHARGED RESIDUE ASP2: -0.996	
Beispiel für generierte Ladungen	CHARGED RESIDUE TYR3: -1.000	
Beispiel für generierte Ladungen	CHARGED RESIDUE GLN4: 0.000	
Beispiel für generierte Ladungen	CHARGED RESIDUE VAL5: 0.000	

Beispiel für generierte Ladungen	CHARGED RESIDUE SER6: -0.000
Output data (Reading in grid box information.)	Box center of mass: 0.031 6.344 6.781
Output data (Reading in grid box information.)	Box dimensions: 19.815 18.759 16.367
Output data (Reading in grid box information.)	Number of grid points per side [x y z]: 68 64 56
Output data (Reading in grid box information.)	Total number of grid points: 243712

Tabelle 14: DOCK 4.0 suite: GRID

7.8 DOCK 4.0 suite: DMS

Der genutzte Startbefehl für DMS lautete:

```
dms ccr5.pdb -a -n -w 1.4 -v -o output_Oberfläche.ms
```

Parameter	Bedeutung
dms	Aufruf des Programmes
ccr5.pdb	Bezeichnung des Molekül-file, das für die Oberflächenberechnung genutzt wird.
-a	Alle Atome an der Oberfläche fließen in die Berechnung mit ein und nicht nur zum Beispiel Aminosäuren; im Besonderen bei diesem Modell wichtig für die Einbeziehung der sulfatierten Tyrosine.
-n	Kalkulation von standardisierten Oberflächenpunkten.
-w	Abstand der Oberflächenpunkte = 1.4 Å
-v	verbose
-o	Spezifizierung eines File Namens für die berechnete Oberflächenstruktur.
output_Oberfläche.ms	Name der berechneten Oberflächenstruktur

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Parameter und deren Bedeutung beim Verwenden des DMS-Programms¹⁰⁵.

7.9 DOCK 4.0 suite: SPHGEN

SPHGEN benötigt bestimmte Angaben für die Berechnung; diese Angaben werden in eine Datei mit dem Namen INSPH hinterlegt.

Parameter	Wert
Oberflächen-file aus Schritt 3	output_Oberfläche.ms
R(Bildung von spheres ausserhalb der Oberfläche) L(Bildung von spheres innerhalb der Oberfläche)	R
Auswahl von Oberflächen-Untergruppen; X= alle Oberflächen-Punkte wählen	X
Bevorzugung von großen spheres mit engem Kontakt zur Oberfläche	0.0
Maximum von spheres Radius in Angström	4.0
Name des spheres output files	fxa.sph

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Parameter und deren Bedeutung beim Verwenden des SPHGEN-Programms.

7.10 DOCK 4.0 suite: SHOWSPHERE

Parameter	Wert
Enter name of sphere cluster file (Das output-file von SPHGEN angeben)	CCR5_1000_nurExtraZ.sph
Generate surfaces as well as pdb files (<N>/Y)? (Berechnen einer sphere-Oberfläche)	N

Enter cluster number to process (<0 = all) (SPHGEN berechnet immer verschiedene Varianten, die Cluster genannt werden. Eines der Cluster wird ausgewählt.)	1
--	---

Tabelle 17: Übersicht über die verwendeten Parameter und deren Bedeutung beim Verwenden des SHOWSPHERE-Programms.

7.11 DOCK 4.0 suite: DOCK

DOCK 4.0 suite: DOCK; mit Verwendung des rndscreen-Skriptes		
Input parameter	flexible_ligand	yes
Input parameter	orient_ligand	yes
Input parameter	score_ligand	yes
Input parameter	minimize_ligand	yes
Input parameter	multiple_ligands	no
Input parameter	random_seed	%RND
Input parameter	anchor_search	no
Input parameter	torsion_drive	no
Input parameter	torsion_minimize	no
Input parameter	match_receptor_sites	yes
Input parameter	random_search	no
Input parameter	ligand_centers	no
Input parameter	automated_matching	yes
Input parameter	maximum_orientations	10000
Input parameter	write_orientations	yes
Input parameter	rank_orientations	yes
Input parameter	rank_orientation_total	1
Input parameter	intramolecular_score	yes
Input parameter	intermolecular_score	yes
Input parameter	gridded_score	yes
Input parameter	grid_version	4
Input parameter	bump_filter	yes

Experimenteller Teil

Input parameter	bump_maximum	0
Input parameter	contact_score	no
Input parameter	chemical_score	no
Input parameter	energy_score	yes
Input parameter	energy_cutoff_distance	10
Input parameter	distance_dielectric	yes
Input parameter	dielectric_factor	20
Input parameter	attractive_exponent	6
Input parameter	repulsive_exponent	12
Input parameter	atom_model	a
Input parameter	vdw_scale	1
Input parameter	electrostatic_scale	1
Input parameter	energy_minimize	yes
Input parameter	initial_translation	1
Input parameter	initial_rotation	0.1
Input parameter	maximum_iterations	50
Input parameter	energy_convergence	0.1
Input parameter	maximum_cycles	1
Input parameter	ligand_atom_file	/usr/user/wscherres/dock_lief/bin/%LIGAND
Input parameter	receptor_site_file	tausendnurECCR5.sph
Input parameter	score_grid_prefix	tausendGRID
Input parameter	vdw_definition_file	/usr/user7/wscherres/dock_lief/parameter/vdw.defn
Input parameter	flex_definition_file	/usr/user7/wscherres/dock_lief/parameter/flex.defn
Input parameter	ligand_energy_file	%RESULT

Tabelle 18: DOCK 4.0 suite: DOCK mit Verwendung des rndscreen-Skriptes.

<p>rndscreen Skript: Geschrieben in der Arbeitsgruppe von Prof. B. Meyer. Eingegebene Parameter sind unterstrichen.</p>	
<p>command</p>	<p>rndscreen v3.mol2 50</p>
<pre>#!/bin/tcsh if (! \$#) then echo "<u>Usage: rndscreen NURV3.mol2 500</u> " exit endif setenv workdir `pwd` setenv moldir <u>/usr/user/wscherres/dock_lief/bin</u> setenv ligandfile \$1 set i=1 while (\$i <= \$2) set rnd = `awk -f <u>/usr/user/wscherres/dock_lief/bin/rnd.awk</u>` echo \$rnd setenv name `echo \$ligandfile sed s/.mol2//` echo "Name ist: "\$name setenv infile dock_rndscreen2-"\$i"_"\$name".in echo "Infile Ist: "\$infile setenv outfile dock_rndscreen2-"\$i"_"\$name".out echo "Outfile ist :"\$outfile cat dock-rndscreen.in.templ sed s/%RND/\$rnd/ sed s/%LIGAND/"\$1"/ sed s/%RESULT/"\$name" _rndscr2-"\$i" _nrg2.mol2/ >> \$infile dock -i \$infile -p -o \$outfile set i=`expr \$i + 1`</pre>	
<p>Script: rnd.awk</p>	<pre>BEGIN { srand() # rnd=rand() # print \$rnd # Erzeugung einer Zufallszahl # zwischen 0 und 32000 rndno=int(rand() * 32000) print rndno }</pre>

Tabelle 19: rndscreen-Skrip

Experimenteller Teil

DOCK 4.0 suite: Dock; ohne Verwendung des rndscreen-script		
Input parameter	flexible_ligand	no
Input parameter	orient_ligand	yes
Input parameter	score_ligand	yes
Input parameter	minimize_ligand	no
Input parameter	multiple_ligands	no
Input parameter	random_seed	3
Input parameter	match_receptor_sites	yes
Input parameter	random_search	no
Input parameter	ligand_centers	no
Input parameter	automated_matching	yes
Input parameter	maximum_orientations	50000
Input parameter	write_orientations	yes
Input parameter	rank_orientations	yes
Input parameter	rank_orientation_total	10
Input parameter	intermolecular_score	yes
Input parameter	gridded_score	yes
Input parameter	grid_version	4
Input parameter	bump_filter	yes
Input parameter	bump_maximum	3
Input parameter	contact_score	no
Input parameter	chemical_score	no
Input parameter	energy_score	yes
Input parameter	atom_model	a
Input parameter	vdw_scale	1
Input parameter	electrostatic_scale	20
Input parameter	ligand_atom_file	thousandV3.mol2
Input parameter	receptor_site_file	tausendnurECCR5.sph
Input parameter	score_grid_prefix	tausendGRID
Input parameter	vdw_definition_file	/usr/user7/wscherres/dock_lief/parameter/vdw.defn
Input parameter	ligand_energy_file	docking_1000_8.mol2

Experimenteller Teil

Output parameter	ligand_energy_file britta_v3_nach_bm_3_500minimize_rndscr2-3247_nrg2.mol2
Output parameter	Reading general grid info from tausendGRID.bmp
Output parameter	Reading bump grid from tausendGRID.bmp
Output parameter	Reading energy grids from tausendGRID.nrg
Output parameter	VDW grids use a 6-12 Lennard-Jones potential with an all atom model.
Output parameter	Reading attractive VDW energy grid.
Output parameter	Reading repulsive VDW energy grid.
Output parameter	Reading electrostatic energy grid.
Output parameter	Name : V3
Output parameter	Description : ****
Output parameter	Orientations tried: 50000
Output parameter	Orientations scored: 43
Output parameter	Best energy score: 18.64
Output parameter	Intramolecular energy score: 39.93
Output parameter	Intermolecular energy score: -21.29
Output parameter	rmsd of best energy scorer (A): 9.00
Output parameter	Elapsed cpu time (sec): 30.99
Output parameter	Procedure timings time (s) percent
Output parameter	Read 0.05 0
Output parameter	Screen 0.00 0
Output parameter	Orientation Search 21.00 66
Output parameter	Orientation Score 9.65 30
Output parameter	Conformation Anchor 0.31 1
Output parameter	Conformation Peripheral 0.00 0
Output parameter	Other 0.92 3
Output parameter	Total 31.93 100
Output parameter	Minimizer usage minimum average maximum
Output parameter	Calls per molecule 43 43 43
Output parameter	Score improvement per call 0.03 55 9.9e+02
Output parameter	Vertices per call 6 6 6

Output parameter	Cycles per call 1 1 1
Output parameter	Iterations per cycle 31 48 50
Output parameter	Finished processing molecule in 31.9302 seconds

Tabelle 20: DOCK 4.0 suite: DOCK ohne Verwendung des rndscreen-Skriptes.

7.12 SYBYL 7.0: Minimize-Parameter

Energy	208.86 kcal/mol
Energy after minimization	-612.69 kcal/mol
Waterbox	6987 H ₂ O-TIP Waterbox
Minimize	
Method	Powell
Initial Optimization	Simplex
Termination (Gradient)	0.05 kcal/(mol*A)
Max Iteration	2500
Minimize Details	
Method	Powell
Max Iteration	2500
Max Displacement	0.01
Min Energy Change	0.05
Simplex Threshold	1000
LS Accuracy	0.001
LS Step Size	0.001
Status Update	1
Graphics Update	1
Termination	Gradient
Non-Bonded Reset	10
RMS Displacement	0.001
Gradient	0.05
Simplex Iteration (checked)	20
Derivative Reset:	100
Color Option	Potential
Checkpoint Interval	0
List Terms Threshold	-10
List Terms	not checked
Energy	
Force Field	Tripos
Charges	Gasteiger-Hückel
NB Cutoff	8.0
Dielectric Function	Distance
Dielectric Constant	1.0
Boundary Condition	not checked
Constrains	not checked
Ignore Atoms	not checked

Aggregates	not checked
Use Force Field Engine	not checked
FF Parm Set	Tripos
Force Field Details	
FF Parm Set	Tripos
One-Four-Scaling	1
NB Cutoff	8
H-Bond Radius Scaling	0.7
Charges	Gasteiger-Huckel
Dielectric Finction	Distance
Dielectric Constant	1
List Energy Term by Term	not checked

Tabelle 21: Gewählte Parameter bei der Energie-Minimierung von der *target*-Struktur-2.

7.13 SYBYL 7.0: MD-Simulation Parameter

Energy	-557.57 kcal/mol
Energy after MD	-855.2 kcal/mol (<i>target</i> -Struktur-1.1) -888.65 kcal/mol (<i>target</i> -Struktur-1.2)
Interval	
Length	300000 fs
Step	1 fs
Snapshot Every	30 fs
Ensemble	NTV
Temperature	300 K
Coupling	100
Initial Velocity	Boltzmann
Seed	32759
Bonds to Shake	/
Max Iterations	100
Tolerance	0.0001
Non-Bonded Update Every	25 fs
Scale Velocities	not checked
Energy	
Use Force Field Engine	not checked
Force Field	Tripos
Charges	Gasteiger-Huckel
NB Cutoff	8.0
Boundary Conditions	not checked
Dielectric Function	Distance
Dielectric Constant	15.0
Constraints	not checked
Ignore Atoms	not checked
Aggregates	not checked
Force Field Details	
FF Patm Set	Tripos
One-Four Scaling	1

NB Cutoff	8
H-Bond Radius Scaling	0.7
Charges	Gasteiger-Huckel
Dielectric Function	Distance
Dielectric Constant	15
List Energy Term by Term	not checked

Tabelle 22: Gewählte Parameter bei der MD-Simulation von der *target*-Struktur-1 (300ps).

7.14 Distancemapper:

These results were generated by the following settings (alpha num ordered):

FileExtension: mol2	Molekül-File-Format
LIGfile: lig-v3	Name des Liganden files
LigSetName: P2	Name des Liganden sets
MaxiDist: 6 Å	Maximaler Abstand vom Liganden zum Rezeptor für die Berechnung der STD-Prozenten
MiniDist: 1.8	Minimaler Abstand vom Liganden zum Rezeptor für die Berechnung der STD-Prozenten
NRGsuffix: _nrg	Suffix
OutFile: ccr5-analysis	Name des Ergebnis files
RECfile: rec-CCR5	Name des Rezeptors files
RecSetName: P2	Name des Rezeptors sets
SetType: STATIC	Auswahl des static-set aus dem mol2-file

Tabelle 23: In der Tabelle sind die Parameter aufgelistet, die bei der Verwendung des DISTANCEMAPPER Anwendung fanden.

8 Literaturverzeichnis

1. Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage, München – Jena: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, **2003**
2. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., and Gupta, R. Timing the ancestor HIV-1 pandemic strains. *Science* 288, 1789-96, **2000**.
3. UNAIDS. AIDS Epidemic Update December 2007, **2007**.
4. Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., and Kaptue, L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 68, 1581-5, **1994**.
5. Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun-Vezinet, F., Simon, F., and Saragosti, S. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* 69, 5640-9, **1995**.
6. Vanden Haesevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H., and Saman, E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 68, 1586-96, **1994**.
7. Simon, F., Maucelere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4, 1032-7, **1998**.
8. Nkengasong JN, Kalou M, Maurice C, Bile C, Borget MY, Koblavi S, Boateng E, Sassan-Morokro M, Anatole-Ehounou E, Ghys P, Greenberg AE, Wiktor SZ. Comparison of NucliSens and Amplicor monitor assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in plasma of persons with HIV-1 subtype A infection in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Clin Microbiol* 36, 2495-8, **1998**.

9. Kulpa D, Topping R, Telesnitsky A. Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *EMBO J* 16, 856-65, **1997**.
10. Henderson, L. E. and Arthur, L. O. Defeating AIDS: What will it take? *Sci Am* 279, 61-87, **1998**.
11. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285, 1-32. **1999**.
12. Dewhurst S, Whetter L. Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci* 2, 147-59, **1997**.
13. Cohen J. AIDS vaccine shows promise after years of frustration. *Science* 291, 1686-8, **2001**.
14. Letvin NL. Progress in the development of an HIV-1 vaccine. *Science*, 280, 1875-80, **1998**.
15. Wyatt, R. and Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science* 280, 1884-8, **1998**.
16. Stryer, L. Biochemie, 4. Auflage. Berlin: Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **1996**.
17. Poignard, P. , Saphire, E. O., Parren, P. W., and Burton, D. R. gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* 19, 253-74, **2001**.
18. Bartlett, J. G. and Moore, R. D. Improving HIV therapy. *Sci Am* 279, 84-7, 89, **1998**.
19. Department of Biology, Davidson College, Davidson
www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/chemokinespeech/chemo4.html,
Chemokines' Ability to Block HIV Infection, **2006**.

20. Bartlett, J. G. and Moore, R. D. Improving HIV therapy. *Sci Am* 279, 84-7, 89, **1998**.
21. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn B. Viral dynamics in human Immunodeficiencyvirus type 1 infection. *Nature* 373, 117-22, **1995**.
22. Informationen des Robert Koch Institutes, Berlin, Stand Nov 2008, <http://www.rki.de>., **2000**.
23. Janeway, C. and Travers, P. Immunologie.Heidelberg, Spektrum Akad. Verlag, **1997**.
24. Kwong, P. D. , Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659, **1998**.
25. Bandres, J. C., Wang, Q. F., O'Leary, J., Baleaux, F., Amara, A., Hoxie, J. A., Zolla-Pazner, S., and Gorny, M. K. Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J Virol* 72, 2500-4, **1998**.
26. Farzan, M., Choe, H., Vaca, L., Martin, K., Sun, Y., Desjardins, E., Ruffing, N., Wu, L., Wyatt, R., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. A tyrosine-rich region in the N-terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol* 72, 1160-4, **1998**.
27. Doranz, B. J., Lu, Z. H., Rucker, J., Zhang, T. Y., Sharron, M., Cen, Y. H., Wang, Z. X., Guo, H. H., Du, J. G., Accavitti, M. A., Doms, R. W., and Peiper, S. C. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71, 6305-14, **1997**.
28. Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A., and Sattentau, Q. J. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 250, 1139-42, **1990**.

29. Gallaher, W. R. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50, 327-8, **1987**.
30. Hart, T. K., Kirsh, R., Ellens, H., Sweet, R. W., Lambert, D. M., Petteway, S. R. Jr, Leary, J., and Bugelski, P. J. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2189-93, **1991**.
31. Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 250, 1139-42, **1990**.
32. Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Wyatt, R., and Sodroski, J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol*, 68, 469-84, **1994**.
33. Korber, B T M.;Foley, B.;Kuiken, C.;Leitner, T.;McCutchan, F.;Mellors, J W.; Hahn, B H. Human retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, N.M: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, **1997**.
34. Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D., and Matthews, T. J. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* 250, 1590-3, **1990**.
35. Bartelsman M, Veeken H .The HIV pandemic in the year 2007, an overview. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 151, 2655-60, **2007**.
36. Sciencephotolibrary, <http://www.sciencephoto.com>, Coloured TEM of HIV virus penetrating a T-cell, **2007**.
37. L. R. Brady, A. N. Barclay, The structure of CD4. *Curr. Top. Microbio. Immun.*, 205, 1-18, **1996**.

38. Wang, J.H., Meijers R., Xiong Y., Liu J., Sakihama T., Zhang R., Joachimiak A., Reinherz E. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10799-804 **2001**.
39. Fernandez, E. J. and Lolis, E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 469-99, **2002**.
40. Hill, C. M., Kwon, D., Jones, M., Davis, C. B., Marmon, S., Daugherty, B. L., DeMartino, J. A., Springer, M. S., Unutmaz, D., and Littman, D. R. The amino terminus of human CCR5 is required for its function as a receptor for diverse human and simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 248, 357-71, **1998**.
41. Bieniasz, P. D. and Cullen, B. R. Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection. *Front Biosci*, 3: 44-58, **1998**.
42. Dragic, T., Trkola, A., Lin, S. W., Nagashima, K. A., Kajumo, F., Zhao, L., Olson, W. C., Wu, L., Mackay, C. R., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Moore, J. P., and Maddon, P. J. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 72, 279-85, **1998**.
43. Blanpain, C., Doranz, B. J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S. S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem* 274, 34719-27, **1999**.
44. Horuk, R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today* 20, 89-94, **1999**.
45. Dimitrov, D. S., Xiao, X., Chabot, D. J., and Broder, C. C. HIV coreceptors. *J Membr Biol* 166, 75-90, **1998**.

46. Cheng-Mayer, C., Seto, D., Tateno, M., and Levy, J.A. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 240, 80-2, **1988**.
47. Scarlatti G., Tresoldi E., Björndal A., Fredriksson R., Colognesi C., Deng H., Malnati M., Plebani A., Siccardi A., Littman D., Fenyö E., Lusso P. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3, 1259-65, **1997**.
48. Connor, R.I. and Ho, D.D. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* 68, 4400-8, **1994**.
49. Tersmette M., Gruters R., Wolf F., Goede R., Lange J., Schellekens P., Goudsmit J., Huisman H., Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 63, 2118-25, **1989**.
50. Bieniasz PD, Cullen BR. Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection. *Front Biosci* 3, 44-58, **1998**.
51. Littman DR. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 93, 677-80, **1998**.
52. Paterlini MG. Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity. *Biophys J* 83, 3012-31. **2002**.
53. Cormier EG, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* 76, 8953-7, **2002**.
54. Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96, 667-76, **1999**.

55. Dewhurst, S. and Whetter, L. Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci* 2, 147-59, **1997**.
56. Rockstroh, J.K. Antiretroviral therapy of HIV-infections. *Pharm Unserer Zeit* 29, 284-96, **2000**.
57. Condra, J.H., Miller, M.D., Hazuda, D.J., and Emini, E.A. Potential new therapies for the treatment of HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53, 541-55, **2002**.
58. Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-9, **1998**.
59. Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G., Smith M., Allikmets R., Goedert J., Buchbinder S., Vittinghoff E., Gomperts E., Donfield S., Vlahov D., Kaslow R., Saah A., Rinaldo C., Detels R., Brien S. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273, 1856-62, **1996**.
60. P. Lusso, HIV and the chemokine system: 10 years later, *EMBO J.* 25, 447–456, **2006**.
61. Nelson, P. J. and A. M. Krensky Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* 10, 265-70. **1998**.
62. Angers, S., Salahpour, A. und Bouvier, M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 409-35, **2002**.
63. White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. und Marshall, F. H. Heterodimerization

isrequired for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679-82, **1998**.

64. Ng, G. Y., Clark, J., Coulombe, N., Ethier, N., Hebert, T. E., Sullivan, R., Kargman, S., Chateaufneuf, A., Tsukamoto, N., McDonald, T., Whiting, P., Mezey, E., Johnson, M. P., Liu, Q., Kolakowski, L. F., Jr., Evans, J. F., Bonner, T. I. O'Neill, G. P. Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *J Biol Chem* 274, 7607-10. **1999**

65. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106, **2000**.

66. Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D. A., Palczewski, K. und Engel, A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native Membranes. *J Biol Chem* 278, 21655-62, **2003**.

67. Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N. P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96, 667-76, **1999**.

68. Farzan, M., Vasilieva, N., Schnitzler, C. E., Chung, S., Robinson, J., Gerard, N. P., Gerard, C., Choe, H., and Sodroski, J. A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J Biol Chem* 275, 33516-21, **2000**.

69. Cormier, E. G., Persuh, M., Thompson, D. A., Lin, S. W., Sakmar, T. P., Olson, W., and Dragic, T. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5762-7, **2000**.

70. Seibert C, Cadene M, Sanfiz A, Chait BT, Sakmar TP. Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *PNAS* 99, 11031-6, **2002**.

71. Veiga AS, Santos NC, Castanho MA. An insight on the leading HIV entry inhibitors. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc* 1, 67-73, **2006**.
72. Dominique Schols HIV co-receptors as targets for antiviral therapy. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 883-93, **2004**.
73. Anthony L. DeVico and Robert C. Gallo HIV Coreceptors and Chemokines as Therapeutic Targets Against HIV/AIDS. *AIDS Rev* 1, 4-14, **1999**.
74. Alberto Mantovani, Raffaella Bonecchi & Massimo Chemokines and chemokine receptors Locati *Nature Reviews Immunology* 6, 907-918, **2006**.
75. Voet D., L. Biochemie, 1. Auflage. Wiley-VCH, Heidelberg, **2002**.
76. Leach A., Molecular modelling, 2. Auflage, Pearson Verlag, **2001**.
77. Bourne P, Weissig H.. Structural Bioinformatics, 1. Auflage, Wiley-Liss, **2003**.
78. Datenbank, TrEMBL, Stand Nov 2008, www.ebi.ac.uk/trembl/, **2008**.
79. Datenbank, Swiss-Prot, Stand Nov 2008, <http://www.expasy.org/sprot/>, **2008**.
80. Datenbank, PDB, Stand Nov 2008, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/>, **2008**.
81. Baldi, Brunak, Bioinformatics, 3. Auflage, MIT Press, **1999**.
82. Schwede T., Bioinformatics I: Protein Structure Homology Modeling, www.biozentrum.unibas.ch/bioinfor.html, **2003**.
83. Weiner P. und Kollman P., J. Assisted model building with energy refinement. *Comput. Chem.* 2, 287-303, **1981**.
84. Gunsteren W., Berendsen H., *Mol. Phys.* 45, 637-47, **1982**.

85. Clarck M., Cramer R., Van Opdenbosch R., *J. Comput. Chem.* 10, 982-1012, **1989**.
86. SYBYL 7.0, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA, Tripos Inc., **2004**.
87. Kunz R., *Molecular modelling für Anwender* 2. Auflage, Teubner Verlag Stuttgart, **1997**.
88. Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC. 1997. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71:6305-14, **1997**.
89. Meyer S., *Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des gp120 aus dem HIV*, Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **1999**.
90. Scherres W., *Molecular modelling des humanen Chemokin-Corezeptors CCR5 mit anschließender Docking-Studie der V3-Loop des gp120 aus dem HIV-1*, Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg, **1999**.
91. Mayer, M. and Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 123, 6108-17 **2001**.
92. Takami, S., Masabumi M., Takahiro K., Izumi N., Shobu N., Masamichi S., TAK-779, a nonpeptide CC chemokine receptor antagonist, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 780-4 **2002**.
93. Huang C., Tang M., Zhang M., Majeed S., Montabana E., Stanfield ., Dimitrov S., Korber B., Sodroski J., Wilson J., Wyatt R., Kwong P., Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**, 1025-8, **2005**.
94. L. R. Brady, A. N. Barclay, The structure of CD4, *Curr. Top. Microbio. Immun.*, 205, 1-18, **1996**.

95. M. Clark, R. D. Cramer III, and N. van Opdenbosch Validation of the general purpose tripos 5. 2 force field", *J. Comp. Chem.* 10, 982-1012, **1989**.
96. Schünemann V., Biophysik, 1.Auflage, Springer Berlin Heidelberg, **2005**.
97. Allen F., Blue Gene: a vision for protein science using a petaflop supercomputer. *IBM Systems Journal* 40 , Issue 2, **2001**.
98. Sousa S., Fernandes P. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins* 65:15-26, **2006**.
99. Michael K. Gilson, Huan-Xiang Zhou, Calculation of Protein-Ligand Binding Affinities. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36, 21-42, **2007**.
100. Böhm H. J., Klebe G., Kubinyi H., Wirkstoffdesign, Heidelberg - Berlin – Oxford, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
101. Hütt, Dehnert, Methoden der Bioinformatik. 1.Auflage, Springer Berlin Heidelberg, **2006**.
101. Tian H.; Lan C.; Chen Y.-H., Sequence variation and consensus sequence of V3 loop on HIV-1 gp120. *Immunology Letters* 83, 231-233, **2002**.
102. Datenbank, TrEMBL, www.ebi.ac.uk/trembl/, **2008**.
103. Andrews PR, Craik DJ, Martin JL. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J Med Chem* 27, 1648-57, **1984**.
104. Dullweber F., Strukturelle und physikochemische Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg, **2000**.
105. DOCK Version 4.0 Reference Manual, University of California at San Francisco

(UCSF), USA, **1998**.

106. DOCK, Version 4.0, Kuntz, I. D. (UCSF), **1997**.

107. Hünnefeld B., Analyse der Bindung von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins gp120 mit dem humanen Korezeptor CCR5
Universität Hamburg, Hamburg, **2007**.

108. Westermann J., Determination of the binding mode of carbohydrates bound to galectin-1: combination of data from saturation transfer difference NMR and molecular modeling procedures., Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **2006**.

109. Duma L., D. Haussinger, M. Rogowski, P. Lusso, S. Grzesiek, Recognition of RANTES by Extracellular Parts of the CCR5 Receptor. *J Mol Biol* 365, 1063-75, **2007**.

110. Lipid Bilayer Membranes, www.umass.edu/microbio/rasmol/bilayers.htm, **2003**.

111. Steinbrecher T., Untersuchungen von Protein- Ligand-Wechselwirkungen mit Hilfe von Computersimulationen, Dissertation, Dissertation, Albert - Ludwigs – Universität Freiburg im Breisgau, Freiburg **2005**.

112. Nölting B., Preussisches Privatinstitut für Technologie zu Berlin, D-13187 Berlin und Karl Andert, Institut für Biologisch-Medizinische Forschung und Technologie e.V., D-13125 Berlin, publiziert in *Proteins* 41, 288-298, **2000**.

113. Ling H., Usami O., Xiao P., Gu H. The N-terminal of the V3 loop in HIV Type 1 gp120 Is Responsible for Its Conformation-Dependent Interaction with Cell Surface Molecules *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* 20, 213-218, **2004**.

114. Rizzuto C., Sodroski J. Fine Definition of a Conserved CCR5-Binding region on the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein 120 *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* 16, 741-749, **2000**.

115. Suphaphiphat P., Essex M., Lee T. Mutations in the V3 stem versus the V3 crown and C4 region have different effects on the binding and fusion steps of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with the CCR5 coreceptor *Virology* 360, 182-190, **2007**.

116. Wang W., Dudek T., Zhao Y., Brumblay H., Essex M., Lee T. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120 *Medical Sciences* 95, 5740-5745, **1998**.

117. Wang W., Dudek T., Essex M., Lee T. Hypervariable region 3 residues of HIV type 1 gp120 involves in CCR5 coreceptor utilization: Therapeutic and prophylactic implications *Medical Sciences* 96, 4558-4562, **1999**.

118. Wells T., Schwarz M. New Therapeutics That Modulate Chemokine Network *Nature Reviews* 1, 347-358, **2002**.

9 Curriculum Vitae

Professional Experience

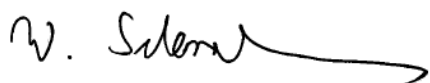
- 12/2007 – present **Lead Project Monitor, Oncology, Novartis AG**
Hamburg
- 02/2007 – 05/2009 **Clinical Research Associate, Oncology, Novartis AG**
Hamburg
- 08/2004– 02/2007 **Student assistant-** Chemistry, biochemistry and
molecular biology tutoring
Hamburg
- 09/2003 – 03/2006 **Student assistant-** Computer Administration
University of Hamburg-Department of Chemistry
Hamburg
- 07/2001 – 06/2004 **Student assistant-** Software Quality Assurance
Poet Software GmbH
Hamburg

Education

- 09/2007– present **M.B.A**
Marketing, Strategic Management, Business Finance,
Human Resource Management, Controlling.
*Master thesis: Standardization potential in international distributions
policy from point of view of a consumer product manufacturer.*
University of Hagen and Allfinanz Academy

-
- 09/2004– present **Ph.D, Chemistry**
Title Dissertation thesis: *Modelling of CCR5 interactions with the V3 loop of HIV-1 gp120.*
Department of Chemistry, University of Hamburg
- 09/1994 – 05/2004 **Diploma, Chemistry**
Title Diploma thesis: *Molecular modeling of HIV-1 coreceptor CCR5 and docking study with V3 loop of HIV-1 gp120.*
Department of Chemistry, University of Hamburg
- 06/1993 – 06/1994 Military Service, Bad Segeberg
- 08/1980 – 06/1993 Primary and secondary school, Hamburg/Norderstedt

Hamburg, May 24th 2009



Winrich Scherres

Danksagung

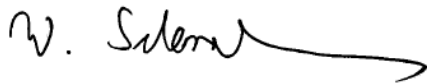
Bedanken möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und die schöne Zeit bei:

Marco Axmann, Atilla Coksezen, Christian Flügge, Thomas Hackl, Martin Hollinger, Britta Hünnefeld, Robin Job, Kolja Klein, Boris Kröplien, Ilona Grüneberg, Axel Neffe, Karolina Poc, Dirk Rehders, Svenja Scheid, Anna-Winona Struck, Jutta Tost, Katharina Wallach, Jan-C. Westermann, Dennis Wilhelm und bei meiner Freundin Nadine.

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

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

Hamburg, den 24.05 2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'W. Scherres', with a long horizontal flourish extending to the right.

Winrich Scherres