



ENTWICKLUNG CD4 BINDENDER PEPTIDE ALS INHIBITOREN DER HIV-INFEKTION

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jan Wülken

aus Hamburg



1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 27.08.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1997 bis Juli 2001 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. P. Margaretha, 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.

"Corpora non agunt nisi fixata"

PAUL EHRLICH, 1913

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	11
1.1	AIDS UND HIV.....	11
1.1.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>11</i>
1.1.2	<i>Der Erreger.....</i>	<i>12</i>
1.1.3	<i>Mechanismus der HIV-Infektion.....</i>	<i>14</i>
1.1.4	<i>Klinischer Verlauf der HIV-Infektion.....</i>	<i>16</i>
1.1.5	<i>HIV-Medikamente.....</i>	<i>17</i>
1.2	DIE GLYCOPROTEINE CD4 UND GP120.....	18
1.2.1	<i>Das Glycoprotein CD4.....</i>	<i>19</i>
1.2.2	<i>Das Glycoprotein gp120.....</i>	<i>20</i>
1.3	DIE RÖNTGENSTRUKTUR VON CD4-GP120-17B-AB.....	21
1.4	DIE CD4-GP120-WECHSELWIRKUNG.....	23
1.4.1	<i>Thermodynamik der CD4-gp120-Wechselwirkung.....</i>	<i>24</i>
1.5	ARZNEIMITTELFORSCHUNG.....	25
1.6	PEPTIDE ALS ARZNEIMITTEL.....	26
1.7	MOLEKÜLE, DIE AN CD4 BINDEN.....	27
1.8	INHIBITOREN DES HIV-ENTRYS.....	28
2	METHODEN.....	31
2.1	DIE PEPTID-FESTPHASENSYNTHESE.....	31
2.2	STD-NMR-SPEKTROSKOPIE.....	34
2.3	SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR).....	36
2.3.1	<i>Theorie.....</i>	<i>37</i>
2.3.2	<i>Kinetik.....</i>	<i>41</i>
3	PROBLEMSTELLUNG.....	44
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	45
4.1	DIE KRISTALLSTRUKTUREN VON CD4.....	45
4.2	CD4-BINDUNGSBEREICHE AUF GP120.....	46
4.3	AUS DER RÖNTGENSTRUKTUR ABGELEITETE PEPTIDE.....	50
4.4	PEPTIDSYNTHESEN.....	51
4.5	REINHEIT DER VERSCHIEDENEN CD4-SORTEN.....	52
4.6	ERMITTLUNG DES pI-WERTES VOM CD4.....	53
4.7	LYSINE IM CD4.....	54
4.8	BIACORE-BINDUNGSSTUDIEN.....	55
4.9	VARIATION DES PEPTIDS C4_C1_10ER.....	65
4.10	BIACORE-BINDUNGSSTUDIEN MIT IMMOBILISIERTEM C4_C1_10ER.....	70
4.11	NMR-EXPERIMENTE.....	73

4.11.1	<i>Vorversuche</i>	73
4.11.2	<i>1D-1H-STD-Titrationsexperimente</i>	75
4.11.3	<i>Bestimmung des Bindungsépitops von C4_C1_10er</i>	79
4.11.4	<i>STD-TOCSY-Experimente</i>	81
4.11.5	<i>STD-HSQC-Experiment</i>	82
4.11.6	<i>Vergleich der Bindungsépitope HSQC / TOCSY</i>	84
4.12	GENDATENBANK.....	86
4.13	AUSBLICKE.....	88
4.14	BIO-ASSAY.....	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	91
6	SUMMARY	93
7	EXPERIMENTELLER TEIL	95
7.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	95
7.2	PROTEINE.....	95
7.2.1	<i>Recombinant human soluble CD4 (Baculovirus)</i>	95
7.2.2	<i>Recombinant human soluble CD4 (CHO)</i>	96
7.2.3	<i>HIV-1 envelope gp120 antigen (recombinant)</i>	96
7.3	ULTRAFILTRATIONS- UND DIALYSEMATERIAL.....	96
7.4	VERWENDETE PUFFER.....	96
7.5	VERWENDETE GERÄTE.....	97
7.6	PEPTIDSYNTHESEN.....	99
7.6.1	<i>Allgemeines</i>	99
7.6.2	<i>Abspaltung vom Harz</i>	99
7.6.3	<i>Direktes Einengen</i>	99
7.6.4	<i>Ausschütteln mit tert-Butylmethylether</i>	100
7.6.5	<i>Reinigung der Peptide mittels HPLC</i>	100
7.6.6	<i>Lagerung der Peptide</i>	100
7.6.7	<i>Charakterisierung mit MALDI-TOF und NMR</i>	100
7.6.8	<i>Parallel-Synthesen</i>	101
7.6.9	<i>Peptide</i>	101
7.7	BIACORE-EXPERIMENTE.....	122
7.7.1	<i>Umpuffern von 500 µg CD4</i>	122
7.7.2	<i>Umpuffern von 100 µg CD4 mit Peptid C2_5er</i>	123
7.7.3	<i>Biacore-Bindungsstudien</i>	123
7.7.4	<i>Biacore-Bindungsstudien mit immobilisierten C4_C1_10er</i>	128
7.8	STD-NMR-EXPERIMENTE.....	128
7.8.1	<i>NMR Probe (0.1 mg CD4, Baculo)</i>	128
7.8.2	<i>NMR-Probe (0.5 mg CD4, CHO)</i>	129
7.8.3	<i>NMR-Probe (1 mg CD4, CHO)</i>	129

7.9	1D- ¹ H-STD-TITRATIONSEXPERIMENTE	129
7.10	STD-TOCSY-EXPERIMENT.....	130
7.11	STD-HSQC-EXPERIMENT	130
7.12	GENDATENBANK.....	131
8	TOXIKOLOGIE UND HANDHABUNG DER CHEMIKALIEN	132
9	PULSPROGRAMME.....	136
9.1	DIFF19SLSP2	136
9.2	INVIETGSSI2F.OS.....	137
9.3	MLEV2FWG.HM.....	139
10	ANHANG.....	142
10.1	PRIMÄRSEQUENZEN DER PROTEIN-KETTEN	142
10.1.1	<i>CD4 (D1-D2) Röntgenstruktur 1GC1.....</i>	<i>142</i>
10.1.2	<i>Gp120-core Röntgenstruktur 1GC1</i>	<i>142</i>
10.1.3	<i>Schwere Kette Fab Röntgenstruktur 1GC1</i>	<i>143</i>
10.1.4	<i>Leichte Kette Fab Röntgenstruktur 1GC1</i>	<i>144</i>
10.1.5	<i>CD4 (D1-D4) Röntgenstruktur 1WIO</i>	<i>144</i>
11	LITERATUR.....	146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D, 2D	ein-, zweidimensional
7TM	seven-transmembrane domain
AB	antibody
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ADME	adsorption, distribution, metabolism, excretion
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ARV	AIDS-associated retroviruses
AS	Aminosäure
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin (Zidovudin)
CCA	α-Cyano-4-hydroxymethylsäure
CD	cluster of differentiation
CDR	complementary determining region
CYT	cytoplasmic tail
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	N,N'-Diisopropylethylamin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethanolamin
EC	extracellular
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fcn	Flußzelle n mit n = 1, 2, 3 oder 4
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
Fuc	Fucose
gp120	Glycoprotein 120
gp120-core	Glycoprotein 120, mit verkürzter Proteinkette
gp41	Glycoprotein 41
HAART	highly active antiretroviral therapy
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBS	Hepes buffered saline
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
HTLV	human T-lymphotrope virus
HTS	high throughput screening
k _a	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
K _A	Gleichgewichtskonstante der Assoziation
k _d	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K _D	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
KDO	3-Deoxy-D-manno-octulonsäure
LAV	lymphadenopathy associated virus
mAb	monoclonal antibody
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight
MAP	multiple antigen peptide
MeCN	Acetonitril
MHC	major histocompatibility complex
MS	Massenspektrometrie
NaAc	Natriumacetat
NAG	N-Acetylglucosamin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control

NIH	National Institutes of Health
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
NOE	nuclear Overhauser enhancement
NOESY	nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
NRTI	nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
PAL	peptide amide linker
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	phosphate buffered saline
PDB [™]	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
ppm	parts per million
PS	polystyrene support
RCA	Ricinus communis agglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
RU	resonance unit
S/N	signal / noise
SIV	simian immunodeficiency virus
SPR	surface plasmon resonance
ssRNA	single strand RNA
STD	saturation transfer difference
tBoc	tert-Butyloxycarbonyl
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
tBu	tert-Butyl
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TM	transmembrane
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	total correlation spectroscopy
TPPI	time proportional phase increment
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
vdW	van-der-Waals
VIP	vasoactive intestinal peptide
WATERGATE	water suppression by gradient tailored excitation
WHO	world health organization

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

1 Einleitung

1.1 AIDS UND HIV

1.1.1 Allgemeines

Als in den frühen achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts die ersten Fälle des erworbenen Immunschwächesyndroms (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) bekannt wurden, war man sich dessen Tragweite nicht bewußt. Heute (Stand: 12/2000), fast zwei Jahrzehnte später sind 21.8 Millionen Menschen, davon 4.3 Millionen Kinder, an AIDS gestorben¹. Allein innerhalb des Jahres 2000 starben 3 Millionen Menschen an dieser Krankheit. Infiziert mit dem Erreger sind heute weltweit 36.1 Millionen Menschen. Diese Zahl liegt um mehr als 50 % über der Prognose der WHO von 1991. Im Jahre 2000 haben sich 5.3 Millionen Menschen neu infiziert (1999: 5.4 Millionen), davon 3.8 Millionen (1999: 4.0 Millionen) in den Ländern südlich der Sahara. Dort liegt die HIV-Prävalenz bei 25.3 Millionen Menschen und macht damit 70 % aller weltweit Infizierten aus. Mehr als 95 % der Neuinfektionen von täglich 15000 finden in Entwicklungsländern statt, wobei davon über 50 % der Infizierten im Alter von 15-24 Jahren sind; der Frauenanteil beträgt 50 %. In Abbildung 1 ist gut sichtbar, daß sich HIV zu einer Pandemie ausgeweitet hat. Dies wird insbesondere in den Ländern südlich der Sahara deutlich, in denen der Prozentsatz der infizierten Bevölkerung teilweise schon zweistellig ist.

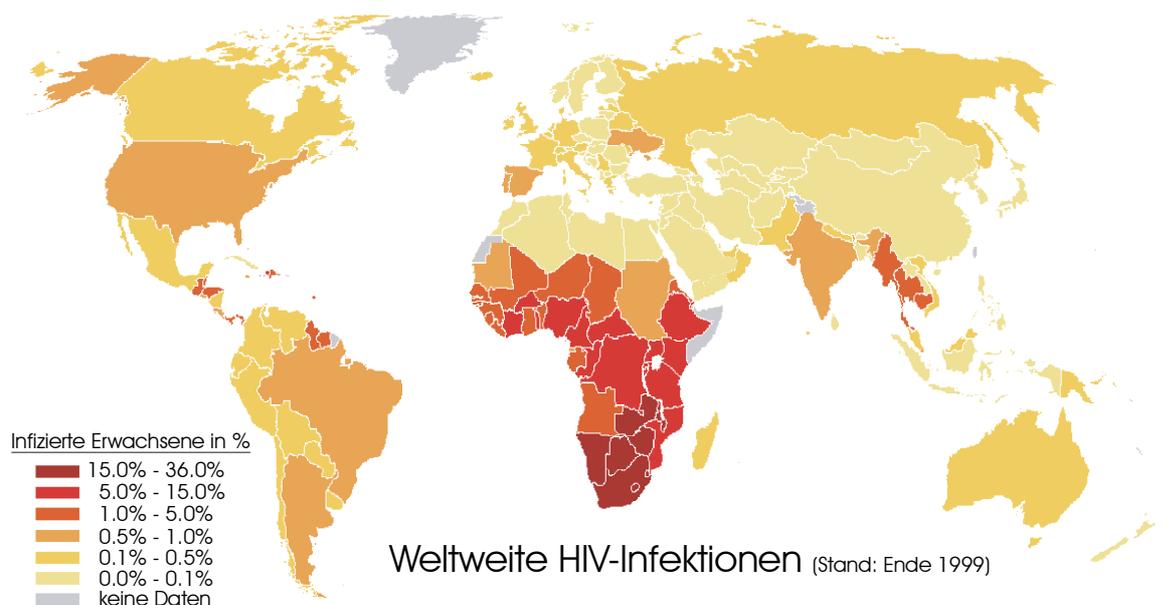


Abbildung 1 Verteilung der weltweiten HIV-Infektionen im Dezember 1999.

Erstmalig gibt es in diesem Jahr Hinweise auf eine mögliche Stabilisierung der HIV-Inzidenz in dem Bereich südlich der Sahara. Dieser leichte Rückgang der Neuinfektionen ist jedoch vermutlich auf zwei Faktoren zurückzuführen. Zum einen hat die Epidemie in vielen Ländern in Afrika bereits weite Teile der sexuell aktiven Bevölkerung erfaßt, so daß sich nur wenige Menschen neu infizieren. Zum anderen haben einige wenige Länder – allen voran Uganda - erfolgreiche Präventionsprogramme, die zum regionalen Rückgang beitragen. Ein intensives Vorgehen gegen die AIDS-Epidemie in Afrika ist dringend erforderlich, ist jedoch durch geschätzten Kosten im dreistelligen Milliardenbereich von den Ländern nicht tragbar. Erst durch die jetzt eingeleitete Abgabe von AIDS-Medikamenten an Länder in Afrika zu sehr günstigen Konditionen, kann auf eine Verbesserung der Lage für die Menschen gehofft werden.

1.1.2 Der Erreger

1983 wurde von Luc Montagnier ein Virus entdeckt² und als LAV (*lymphadenopathy associated virus*) bezeichnet. Es wurde vermutet, daß es der Erreger von AIDS ist. Andere Forschergruppen, unter anderem auch die Gruppe um Robert Gallo, bezweifelten diese Ergebnisse und den Zusammenhang zwischen dem gefundenen Virus und AIDS. Gallo präsentierte 1984 als Erreger ein Virus aus der Gruppe der „*Human T-lymphotrope Viruses*“ (HTLV)³. Diese Viren befallen die T-Lymphocyten des menschlichen Immunsystems und gliedern sich in mehrere Klassen. Gallo bezeichnete den von ihm gefundenen Erreger als HTLV-III. Obwohl die französische Gruppe von Anfang an Recht hatte und die Daten früher publiziert hatten, wurde Gallo 1984 als Entdecker des AIDS-Erregers gefeiert. Erst 1986 wurde offiziell bestätigt, daß die beiden entdeckten Viren identisch sind und der Virus erhielt die Bezeichnung HIV (*human Immunodeficiency virus*), das sogenannte menschliche Immunschwächevirus.

Der Begriff Virus (lateinische Bezeichnung für "Gift") wurde erstmals von Cornelius Aulus Celsus im ersten Jahrhundert vor Christus verwendet. Er wollte damit ausdrücken, daß Krankheiten, in diesem Fall die Tollwut, durch ein "Gift" übertragen wurden. Viren haben keine proteinproduzierenden Strukturen und keine energiegenerierenden Mechanismen, sondern nutzen diejenigen ihrer Wirte. Ihre Informationen zum Überleben in Form von DNA oder RNA sind im Inneren des Viruspartikels (Virions) enthalten.

HIV verursacht AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) und gehört zu den Lentiviren (lateinisch *lentus*: langsam). Lentiviren besitzen eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit von mehreren Jahren. Der Virus beinhaltet als Retrovirus alle Informationen in Form von ssRNA sowie eine Reverse Transkriptase zur Transkription in DNA. Die Ungenauigkeit bei der Transkription durch

die Reverse Transkriptase ist ca. zehnmal höher als bei anderen bekannten Enzymen dieser Art, was eine hohe Mutationsrate des HIV-Genoms zur Folge hat. Dadurch wird die Entwicklung eines Impfstoffes oder Medikamentes gegen AIDS erheblich erschwert. In Abbildung 2 ist der schematische Aufbau des HI-Virus gezeigt⁴.

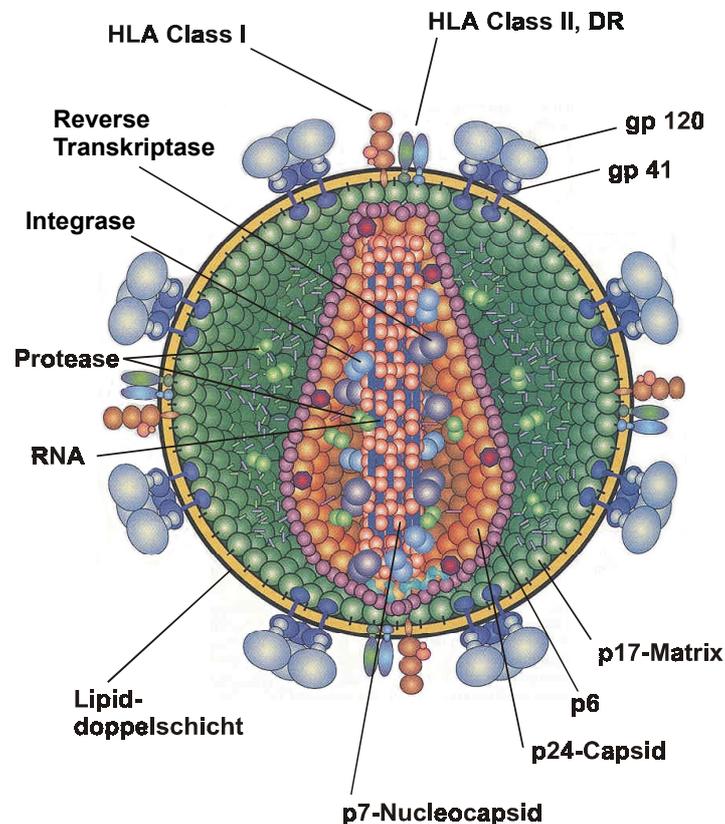


Abbildung 2 Schematischer Aufbau des Virions von HIV-1. Durchmesser: ~ 100 nm.

In der Lipiddoppelschicht liegen ungefähr 72 Trimere des transmembranen Proteins gp41 vor⁵. Nicht-kovalent verknüpft an das Glycoprotein gp41 hängt je ein gp120. Hervorgegangen sind diese aus einem Vorläuferprotein, dem gp160, das durch eine Protease gespalten wurde. Außerdem beinhaltet die Lipiddoppelschicht mehrere zelluläre transmembrane Proteine von der Wirtszelle (HLAs). Die nächstinnere Schicht des Virus besteht aus ungefähr 2000 Proteinmolekülen p17. In der Mitte des Viruspartikels befindet sich ein kegelförmiges Gebilde aus ca. 2000 Kopien des p24-Capsid Protein. Darin enthalten sind zweimal das virale Genom als ssRNA Molekül. Die beiden RNA Moleküle liegen darin als Ribonukleoprotein-Komplex mit ungefähr 2000 Kopien des p7 Nucleocapsid zur Stabilisierung vor. Außerdem sind in dem Capsid noch die drei Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease enthalten⁶.

1.1.3 Mechanismus der HIV-Infektion

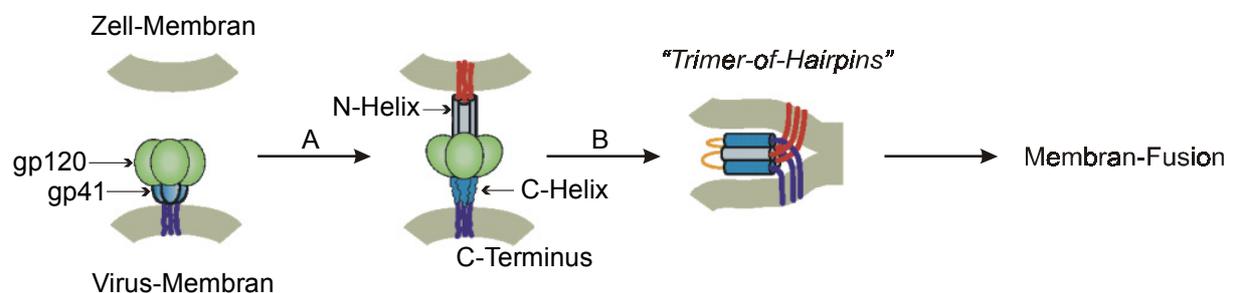
Man kennt heute mindestens zwei Typen von HIV, deren Genome zu 40 Prozent identisch sind: HIV-1 und HIV-2, wobei der überwiegende Teil der weltweiten Infektionen durch HIV-1 erfolgt. Das HI-Virus infiziert Lymphocyten. Diese unterteilen sich grob in zwei Klassen, die B-Zellen und die T-Zellen. Die T-Zellen lassen sich weiter unterteilen in T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen („T-Helferzellen“) und T_C -Zellen, die cytotoxischen T-Zellen. Die T_H -Zellen tragen jeweils CD4-Rezeptoren auf ihren Oberflächen, die T_C -Zellen den CD8-Rezeptor. CD4 ist ein stabförmiges 55 kDa Glycoprotein, welches sich aus vier immunglobulinartigen Domänen (D1-D4) zusammensetzt. CD8 ist ein Heterodimer bestehend aus α - und β -Ketten mit immunglobulinartigen Domänen. CD4 und CD8 haben nur entfernt ähnliche Strukturen, aber eine sehr ähnliche Funktion.

T_H1 -Zellen sind für die Aktivierung von infizierten Makrophagen verantwortlich. T_H2 -Zellen sind für die Aktivierung von B-Zellen verantwortlich. Die eigentliche, nicht pathogene Funktion von CD4 ist, daß es als Corezeptor auf den T_H -Zellen bei der Antigenerkennung mit dem TCR dient. Die Bindung des TCRs an den antigenpräsentierenden Komplex, bestehend aus dem MHC-II und einem Peptid aus einem fremden Protein, wird durch das CD4 deutlich verbessert. Dabei bindet CD4 mit einer Seite seiner D1-Domäne weit entfernt an unveränderliche Teile der $\beta 2$ -Domäne des MHC-II Moleküls. CD4 spielt also durch seine Interaktion mit dem MHC-II-Molekül eine sehr wichtige Rolle in der Immunantwort^{7,8,9}. Die T_C -Zellen binden an MHC-I und sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich. Sie können virusinfizierte Zellen, die viruseigene Peptide präsentieren, töten.

Im Menschen erfolgt der Eintritt des HI-Virus durch die Interaktion zwischen dem CD4 und dem Glycoprotein gp120 auf der Oberfläche des Virus. Es konnte gezeigt werden, daß CD4 der primäre Rezeptor für das HI-Virus ist^{10,11}. CD4 fungiert als Rezeptor für HIV-1, HIV-2 und auch für SIV¹², eine Variante des Virus, das Affen infiziert. Das Virus infiziert die CD4⁺-Zellen und führt zu deren Zerstörung mit einer Halbwertszeit von weniger als zwei Tagen^{13,14,15}. Eine HIV-Infektion führt also normalerweise zu einem Verlust an CD4⁺-Zellen. Durch die Abnahme an CD4-T-Zellen wird das Immunsystem immer unwirksamer, und es treten vermehrt opportunistische Infektionen auf. Dies korreliert mit der Ausbildung von AIDS¹⁶.

Für den Eintritt in die Zelle benötigt das Virus nach der Bindung an CD4 noch einen weiteren Rezeptor auf der Zielzelle. Hierfür dient ihm ein Protein, das zur großen Familie der Chemokin-Rezeptoren gehört^{17,18,19,20}. Von den bekannten Chemokin-Rezeptoren ist *in vivo* nur die Beteiligung von CCR5 oder CXCR4 belegt worden. Bei allen Anderen ist noch ungeklärt, ob sie eine Rolle bei der Infektion spielen können. Nach der Bindung des Virions mit seinem gp120 an

das CD4 der Zielzelle kommt es zu einer Konformationsänderung im gp120^{21,22}, die die Bindung des gp120 an den Chemokin-Rezeptor durch bestimmte, erst danach ausgebildete Epitope ermöglicht^{20,21,23,24,25}. Aufgrund dieser Bindungen kommt es zu einer Destabilisierung des gp120-CD4-Komplexes mit der Konsequenz einer Konformationsänderung des gp41, so daß ein hydrophobes "Fusionspeptid" präsentiert wird (siehe Abbildung 3). Dieses Fusionspeptid am N-Terminus des gp41 kann dann in die Zielzellmembran insertieren und es erfolgt die Fusion von Virus- und Zellmembran^{26,27,28}. 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. Diese *Trimer-of-Hairpins* bringt die Membranen zusammen und führt so zur Membranfusion.



- 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 3 Postulierter Mechanismus der Membranfusion.

Nach der Membranfusion gelangen die Virusproteine und die RNA-Kopien ins Zellinnere. Mittels der Reversen Transkriptase wird aus der Virus-RNA eine doppelsträngige DNA-Kopie erstellt. Diese wird dann durch die Integrase in die Zell-DNA insertiert. Danach bezeichnet man dieses DNA-Stück als Provirus. Die Expression des Provirus führt zur Produktion aller zur Erzeugung von neuen Virionen benötigten Bestandteile. Diese schnüren sich aus der Zellmembran ab und können neue Zellen infizieren (siehe Abbildung 4, Bild entnommen aus²⁹). Der Virus besitzt also eine Membran, die aus der Zielzell entstanden ist und daher werden einige Zellproteine (HLAs) auf der Oberfläche präsentiert. Dies erschwert die Erkennung durch das Immunsystem des infizierten Menschen. Zusätzlich erschwert wird sie durch die intensive Glycosylierung der gp120-Moleküle durch das zelleigene Glycosylierungssystem.

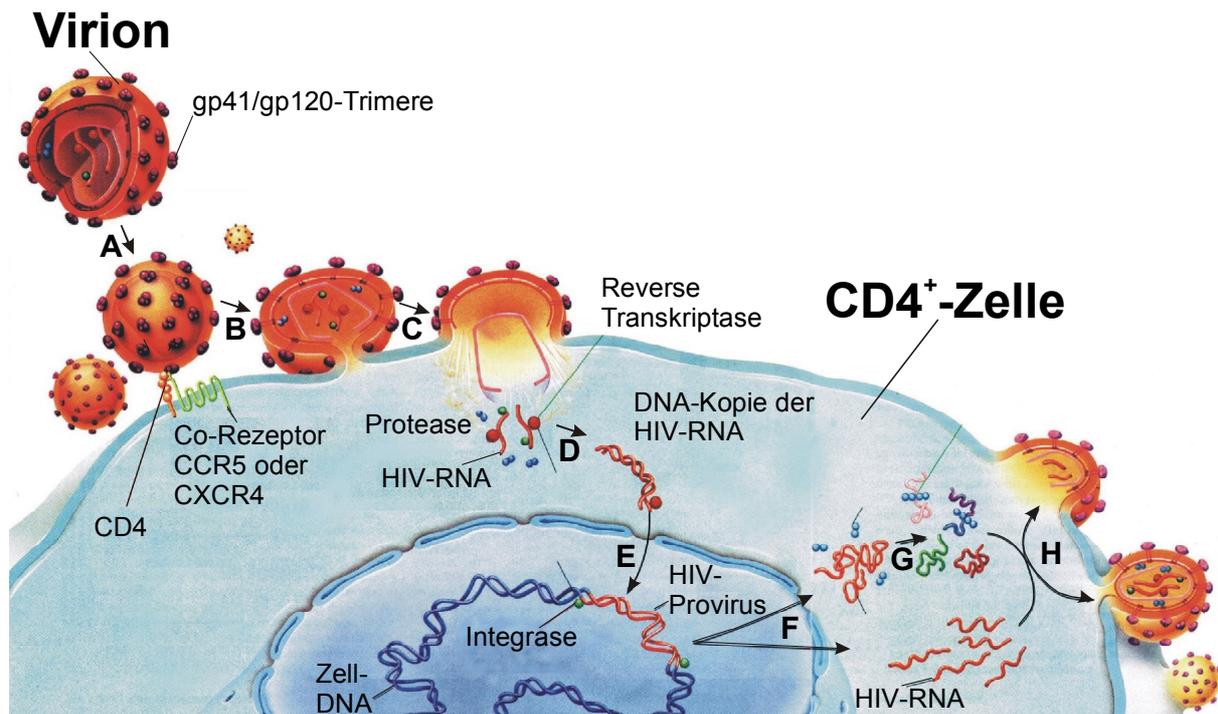


Abbildung 4

Lebenszyklus des HIV. A: Anlagerung des Virions an die CD4⁺-Zelle unter Beteiligung von CD4 und einem Chemokin-Rezeptor (CCR5 oder CXCR4). B: Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran. C: Einbringen der Virus-ssRNA-Kopien, der Reversen Transkriptase und der Protease in die Zelle. D: Transkription der Virus-RNA in doppelsträngige DNA durch die Reverse Transkriptase. E: Insertion der DNA in das Genom der Zelle durch die Integrase. F: Das Provirus wird exprimiert. Es werden virale ssRNA und Virusproteine gebildet. G: Die Protease spaltet ein exprimiertes Virusprotein. H: Aus den Virusproteinen und den ssRNA Kopien entstehen neue Virionen, die sich von der Membran abschnüren.

1.1.4 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Während der ersten zwei bis sechs Wochen nach einer Infektion mit HIV kann eine grippeähnliche Erkrankung auftreten. Dabei steigt der Virus-Titer stark an, und die Anzahl an CD4-T-Zellen sinkt ab (siehe Abbildung 5). Anschließend normalisiert sich der Titer der CD4-T-Zellen wieder, und das Immunsystem bringt die Infektion unter Kontrolle (Serokonversion), jedoch liegt der CD4-T-Zell-Spiegel unterhalb des normalen Wertes von ~ 1200 Zellen/ μL . Die folgende asymptomatische Phase kann mehrere Jahre dauern. Dabei besteht jedoch eine hoch dynamische Interaktion zwischen der Infektion von CD4-T-Zellen durch freie Viren, Entfernung der Viren und infizierter Zellen durch das Immunsystem, Produktion neuer CD4-T-Zellen und der Produktion von HI-Viren durch infizierte Zellen.

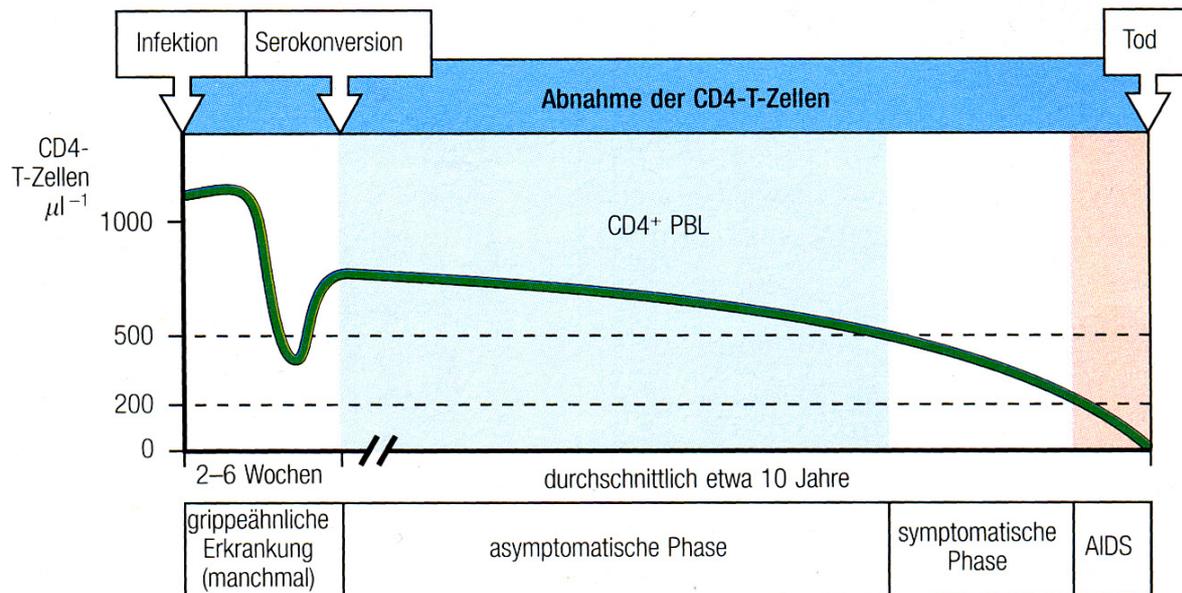


Abbildung 5 Typischer Verlauf einer HIV-Infektion³⁰.

Die Anzahl an CD4-T-Zellen im Blut nimmt stetig weiter ab. Nach einem Zeitraum von 2 bis 15 Jahren, ab ca. 500 CD4-T-Zellen pro μL Blut, beginnt die symptomatische Phase mit opportunistischen Infektionen. Sinkt die Anzahl an CD4-T-Zellen auf unter 200 pro μL Blut, spricht man von AIDS. Die Letalität der HIV-Infektion ist im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten erschreckend hoch. Unbehandelt versterben innerhalb von 15 Jahren etwa zwei Drittel der Patienten an den Folgen ihrer HIV-Infektion³¹. Die Übertragung des Virus erfolgt sowohl durch ungeschützten Geschlechtsverkehr, als auch durch Einbringung von erregerehaltigem Blut oder Blutprodukten in die Blutbahn. Letzteres kann durch Transfusion von kontaminierten Blutkonserven oder Gerinnungspräparaten geschehen oder auch durch Gebrauch von Spritzen durch mehrere Personen (Nadeltausch bei Drogenkonsumenten). Weiterhin besteht das Risiko der Infektion prä-, peri- oder postnatal von der infizierten Mutter auf ihr Kind.

1.1.5 HIV-Medikamente

Das erste antiretrovirale Medikament mit Wirksamkeit gegen HIV war das 1986 präsentierte Zidovudin. Dabei handelt es sich um 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ein Nukleosidanalogen mit hemmender Wirkung auf die Reverse Transkriptase. Allerdings konnte unter Monotherapie mit Zidovudin keine Verbesserung der Überlebensrate erreicht werden³², da sich nach spätestens zwei Jahren ein kompletter Wirkungsverlust durch medikamentenresistente HIV-Stämme einstellte. Daher wurden neue Nukleosidanaloga entwickelt, die in Kombination verabreicht

wurden, was zu einer Verlängerung des Lebens der Patienten führt. Außerdem gelang der Forschung die Entdeckung einer neuen Wirkstoffgruppe, den Protease-Inhibitoren. Zur Zeit werden drei Klassen antiretroviraler Medikamente zur Behandlung genutzt:

◆ nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

Diese Medikamente werden anstelle von Nukleotiden aus der Wirtszelle in die DNA eingebaut und führen zu Abbruchtranskripten.

◆ nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

Sie inhibieren die Reverse Transkriptase allosterisch und hemmen die RNA- und DNA-abhängigen Polymeraseaktivitäten, ohne die menschlichen zellulären Polymerasen zu inhibieren.

◆ Protease-Inhibitoren

Sie binden an die Protease und inhibieren damit die Funktion der Spaltung des Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteins in seine Einzelkomponenten. Unterbleibt die Spaltung im Endstadium der Virusreplikation, so werden nicht infektiöse Viruspartikel freigesetzt.

Weitere mögliche Wirkstoffklassen sind die Integraseinhibitoren, HIV-Entry-Inhibitoren oder die in Kapitel 1.8 vorgestellten hoch aktuellen Fusions-Inhibitoren.

Die seit Mitte der 90er Jahre eingesetzte *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), bei der Kombinationen der Medikamente eingesetzt werden, zeigte anfangs vielversprechende Ergebnisse. Zwei unterschiedliche Nukleosidanaloga kombiniert mit einem Proteasehemmer führten zu einer Minderung der erwarteten opportunistischen Infektionen um 50 % gegenüber den Patienten, die nur mit zwei Nukleosidanaloga behandelt wurden³³. Jedoch zeigen jüngere Ergebnisse³⁴, daß es zur Ausbildung von resistenten Virusstämmen kommen kann³⁵. Eine endgültige Entfernung der Viren aus dem Körper erscheint zur Zeit sehr schwierig, da HIV in Reservoirs im Körper über einen längeren Zeitraum persistieren kann³⁶. Bis heute gibt es keinen Impfstoff, der eine HIV-Infektion verhindern könnte. Aktuelle Ergebnisse mit SIV lassen jedoch einen Impfschutz möglich erscheinen³⁷.

1.2 DIE GLYCOPROTEINE CD4 UND GP120

Die Beobachtung, daß die CD4⁺-Zellen in AIDS-Patienten deutlich verringert werden^{38,39,40} und daß nur die CD4⁺-Zellen mit HIV-1 infizierbar waren⁴¹, führte schon früh zu der Vermutung, daß CD4 der Rezeptor für den Einstieg von HIV war. Unterstützt wurde diese These durch folgende Ergebnisse:

- ◆ Bestimmte Antikörper gegen CD4 blockieren sowohl die Infektion als auch die Syncytium-Bildung^{10,11,42}.
- ◆ Humane Zellen ohne CD4, die normalerweise nicht infizierbar sind, werden nach Transfektion mit CD4-Expressions-Vektoren infizierbar⁴³.
- ◆ Gp120 bindet spezifisch an CD4⁴⁴ (Kapitel 1.4).

1.2.1 Das Glycoprotein CD4

Das CD4-Molekül (frühere Bezeichnung: T4 für humanes CD4, W3/25 für Ratten-CD4 bzw. L3T4 für Mäuse-CD4) ist ein einzelkettiges 55 kDa großes Glycoprotein, welches auf der Oberfläche von verschiedenen Immunzellen vorkommt (CD4-Übersichtsartikel siehe Brady *et al.* 1996⁴⁵). Die Nomenklatur CD (*cluster of differentiation*) wurde eingeführt, um monoklonale Antikörper (mAb) zu gruppieren, die das gleiche Antigen auf menschlichen Leukocyten zu erkennen vermögen⁴⁶. Mit einem mAb mit dem Namen T4 wurde 1979 von Reinherz *et al.*⁴⁷ das CD4 auf menschlichen Zellen entdeckt, nachdem es schon 1977 von Williams *et al.* auf Rattenzellen gefunden wurde⁴⁸. Man findet es auf einigen Gruppen von Thymocyten, T-Helferzellen (T_{H2}) und inflammatorischen T-Zellen (T_{H1}) und auf Monocyten und Makrophagen³⁰.

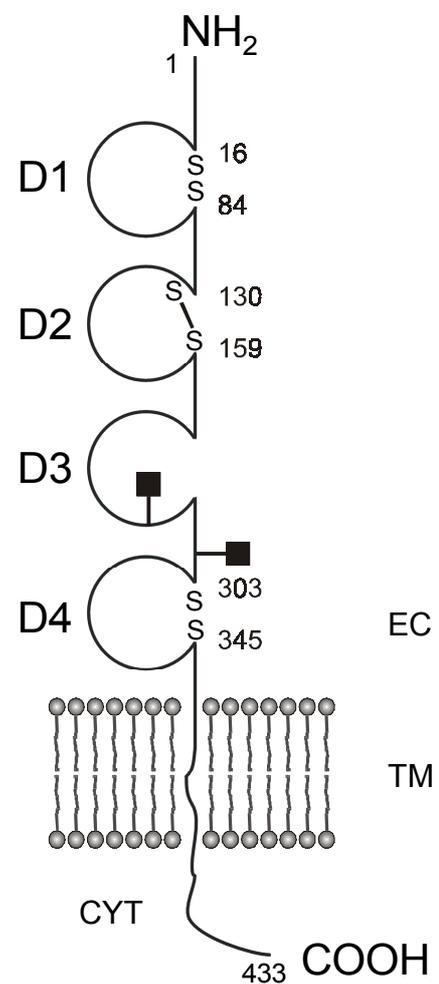


Abbildung 6 Schematischer Aufbau vom humanen CD4. D1 bis D4 sind die vier immunglobulinartigen Domänen, SS Disulfidbrücken, gefüllte Quadrate die Glycosylierungsstellen, TM die transmembrane-, EC die extrazelluläre- und CYT die cytoplasmatische Region. Die Zahlen bezeichnen die Position in der Sequenz.

CD4 ist membrangebunden und besteht insgesamt aus 433 Aminosäuren mit einem extrazellulärem Teil aus 370, einer Transmembrandomäne aus 25, und einem cytoplasmatischem Segment aus 38 Aminosäuren⁴⁹. Der extrazelluläre Teil besteht aus vier Domänen (siehe Abbildung 6) D1 bis D4^{49,50,51}. Bei der posttranslationalen Modifikation werden

Disulfidbindungen innerhalb der Domänen D1, D2 und D4 geschlossen und außerdem zwei N-Glycane auf D3 und D4 angefügt⁴⁹. Die CD4-Moleküle zeigen eine speziesabhängige Glycosylierung. Kaninchen-CD4 trägt ein, Ratten/Mäuse und Katzen CD4 jeweils drei und Hunde-CD4 tragen fünf N-Glycane. Die D1-Domäne zeigt Sequenzähnlichkeit mit der Immunglobulin-superfamilie (IgSF) und zwar mit der variablen Region der leichten Kette von Ig. Der extrazelluläre Teil D1-D4 ist stabförmig und ragt mit einer Länge von ca. 120 Å aus der Membran heraus⁵². Die N-terminal erste Domäne (V1, AS 1-106) zeigt 35 % Homologie mit variablen Bereichen aus den Immunglobulin-κ-Ketten. Schon Ende der achtziger Jahre konnte die D1-Region von CD4 als sehr wichtig für die Bindung identifiziert werden^{53,54}. Petersen konnte den Bereich von 40 bis 48 von D1 als gp120-Bindungsereich identifizieren⁵⁵. Dieser Bereich ist homolog zu CDR2 der leichten Ketten von Immunglobulinen.

Bestätigt wurden diese Befunde durch Untersuchungen von Clayton⁵⁶ und Mizukami⁵⁷. Es konnte gezeigt werden, dass CD4 (exprimiert durch CHO-Zellen und durch SF9-Zellen) *in vitro* als potenter Inhibitor der Infektion durch HIV wirkt^{53,58,59,60,61}. Jedoch führten klinische Versuche zu negativen Ergebnissen. Es wurden sehr hohe Konzentrationen von CD4 benötigt, um primäre Isolate von HIV zu neutralisieren^{62,63}. Der sehr schnelle Abbau *in vivo* sowie die Unfähigkeit, alle Gewebearten zu durchdringen, führten vermutlich zu niedrigen Konzentrationen von CD4 im Blut. Die Plasma Halbwertszeit im Menschen von CD4 beträgt ca. 1h⁶⁴.

1.2.2 Das Glycoprotein gp120

Aus einem Vorläufer-Protein (gp160) wird durch eine viruseigene Protease gp41 und gp120 gebildet^{65,66}. Das gp120 ist nicht-kovalent an das membranständige gp41 gebunden⁶⁷. Diese Heterodimere liegen als Trimere auf dem Virus vor. Gp120 ist ein Glycoprotein mit einer Molmasse von 120 kDa, wovon auf den Kohlenhydratanteil ca. 50 % entfallen⁶⁸. Das Glycoprotein besteht aus fünf hypervariablen *Loops* (V1-V5), die durch neun Disulfidbrücken und mehreren relativ konservierten Sequenzabschnitten (C1-C5) verbunden sind (siehe Abbildung 7, oben). Das gp120 besitzt, in Abhängigkeit der jeweiligen Sequenz, 24 bis 26 potentielle N-Typ Glycosylierungsstellen hauptsächlich des komplexen- und des mannosereichen Typs⁶⁹.

1.3 DIE RÖNTGENSTRUKTUR VON CD4-GP120-17B-AB

Die Röntgenstrukturanalyse ist eine häufig angewandte Methode, um Informationen über die dreidimensionale Gestalt von Proteinen zu erlangen. Für Glycoproteine sind dagegen nur relativ wenige Beispiele bekannt. Die Kristallisation von Glycoproteinen ist durch einen hohen Glycosylierungsgrad deutlich erschwert. Außerdem sind die Kohlenhydratreste von Glycoproteinen aufgrund der hohen Flexibilität der Zucker oft nicht, oder nur schlecht aufgelöst. Im Juni 1998 veröffentlichten Kwong *et al.* eine Röntgenstruktur (PDBTM-Code: 1GC1) eines Komplexes in 2.5 Å-Auflösung bestehend aus einem gp120-*core* Protein, einem D1-D2-Fragment vom humanen CD4 und einem Antigen bindenden Fragment eines neutralisierenden CD4i-Antikörpers (siehe Abbildung 8). Für die Kristallisation wurden diverse Ansätze mit den unterschiedlichsten Kombinationen an Modifikationen getestet: Mehrere HIV-Stämme, verschiedene Deglycosylierungsraten und verschiedene Modifikationen am Protein-*backbone* (hauptsächlich Verkürzungen an den C- und N-Termini sowie die Entfernung einiger Loops)⁷⁰. Das gp120 war vom HXBc2 Stamm von HIV-1. Das gp120-*core* hatte Deletionen von 52 und 19 Aminosäuren am C- und N-Terminus (Abbildung 7). Die 67 Aminosäuren der Loops V1/V2 und die 32 Aminosäuren von der V3-Loop waren gegen je drei Aminosäuren (Gly-Ala-Gly) ersetzt.

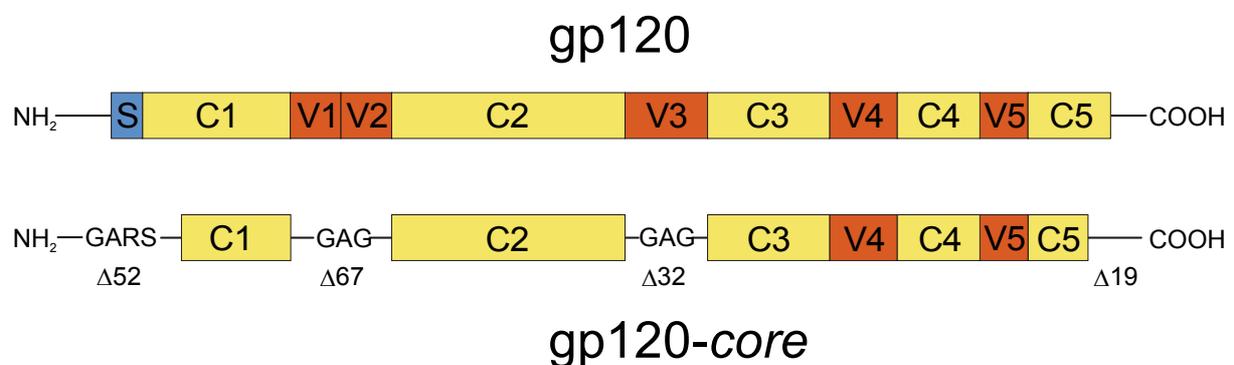


Abbildung 7

Gp120-*core* (unten) im Vergleich mit dem nativen gp120 (oben) . In Gelb sind die konstanten Domänen (C), in Orange die variablen Domänen (V) eingefärbt. Im gp120-*core* sind die Domänen V1/V2 und V3 durch je drei Aminosäuren ersetzt. Die Zahlen nach dem Δ geben die Anzahl an fehlenden Aminosäuren an. Am N-Terminus ist die Sequenz GARS eingeführt.

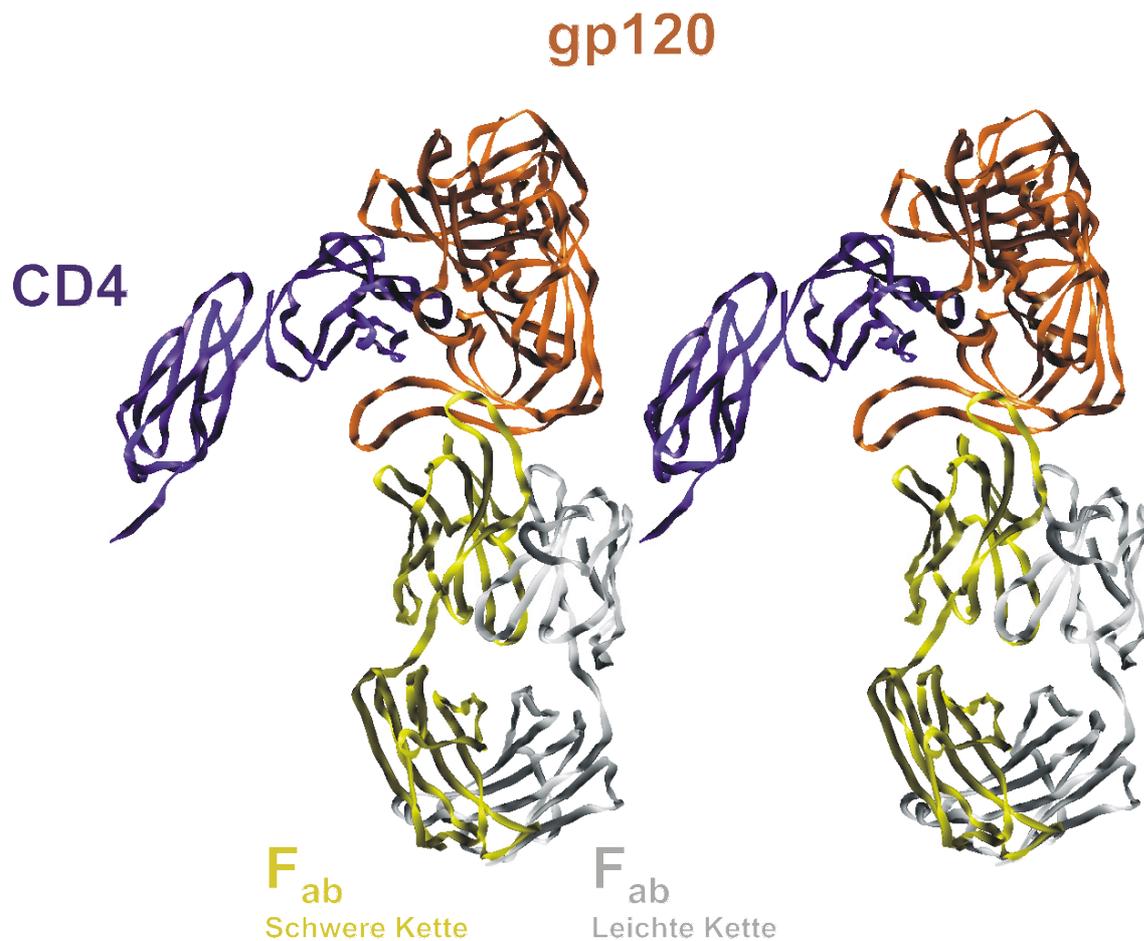


Abbildung 8 Röntgenstruktur 1GC1 bestehend aus CD4 (D1-D2, lila *ribbon*), gp120-core (orange *ribbon*) und der Schwere (gelbes *ribbon*) und Leichten (graues *ribbon*) Kette des 17B AK. *Crossed Stereo-Darstellung* der *ribbons* durch das jeweilige Protein-*backbone*.

Mittels enzymatischer Deglycosylierung waren 90 % der Kohlenhydrate entfernt worden. Übriggeblieben sind sieben N-Acetylglucosamine und vier N-Acetylglucosamine mit (1→6) verknüpften α -Fucose-Resten. Die Interaktion mit CD4 und wichtigen Antikörpern ist dadurch nicht beeinflusst⁷¹. Schon Ende der achtziger Jahre konnte gezeigt werden, daß eine enzymatische Deglycosylierung von gp120 die CD4-Bindungsfähigkeit kaum verändert⁷². Es scheint so zu sein, daß die konservierten Bereiche, die nach der CD4-Bindung erst stärker präsentiert und zugänglich werden, in die Chemokin-Rezeptor-Bindung involviert sind. Durch die Bindung von CD4 an gp120 wird die Bindung von mehreren Antikörpern (so genannte „CD4i“ i für *induced*) an den Chemokin-Rezeptor-Bereich auf dem gp120 verstärkt^{22,73}. Beim Vergleich der Röntgenstrukturen des D1-D2-Teils des CD4 Moleküls allein (PDBTM-Code: 1CDJ⁷⁶) mit dem D1-D2-Teil des CD4s (um 3 AS C-terminal verkürzt, um die Strukturen zu überlagern) aus der Röntgenstruktur von Kwong *et al.* (PDBTM-Code: 1GC1)²¹ wird ersichtlich, daß das CD4-Molekül durch die Bindung an das gp120 in seiner Konformation kaum verändert wird.

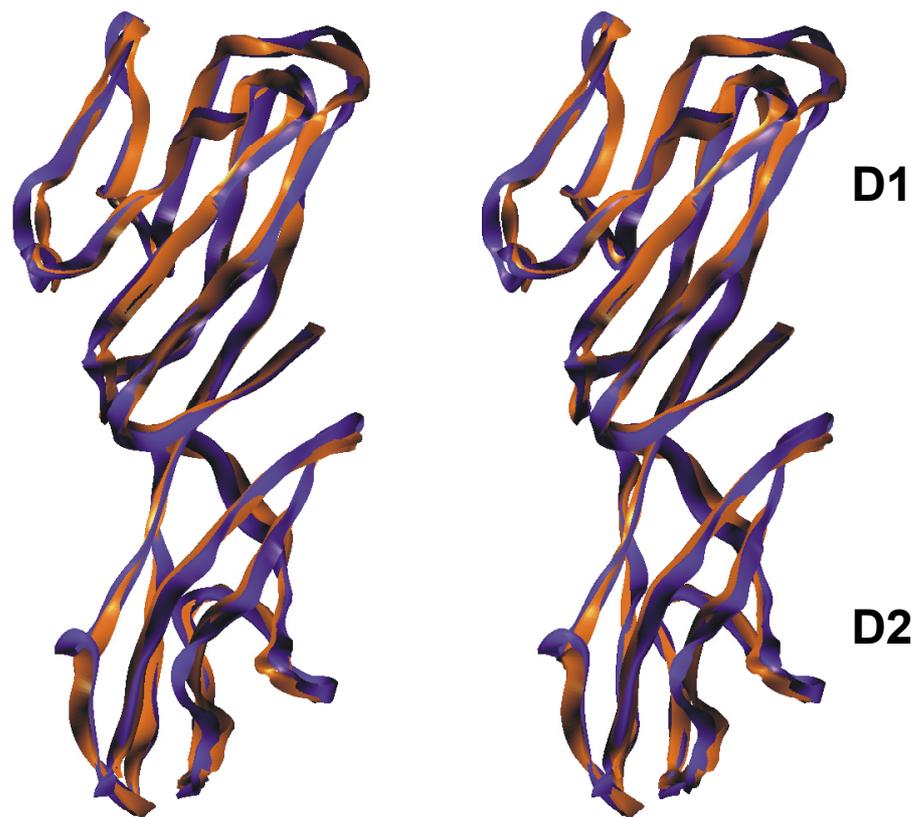


Abbildung 9 *Crossed Stereo-Darstellung* der überlagerten Röntgenstrukturen von CD4 (AS 1-178, Lila) aus 1CDJ mit dem CD4-Teil aus der Röntgenstruktur 1GC1 (AS 1-178, Orange). Abgebildet sind die durch das Protein-*backbone* gelegten *ribbons*. Die gp120-Bindungsregion D1 ist am Kopf des Bildes.

Man erkennt in Abbildung 9 sehr gut, daß nur minimale Abweichungen im Verlauf des Protein-*backbones* auftreten. Oben im Bild befindet sich die Domäne D1, die gp120-Bindungsstelle. Für eine bessere Übersichtlichkeit werden die beiden Strukturen jeweils durch ein *ribbon* dargestellt, welches durch das Protein-*backbone* verläuft.

1.4 DIE CD4-GP120-WECHSELWIRKUNG

Eine Bestimmung des K_I -Wertes der CD4 gp120-Wechselwirkung gelang Lasky *et al.* erstmals 1987. Mittels eines kompetitiven Bindungsassay und Analyse der Daten mit einem Scatchard-Plot ergab sich einen K_I -Wert von 4.18 nM ⁷⁴. Lasky *et al.* benutzten einen Antikörper (α -gp1205C2E5), der in der Lage ist, die Interaktion zwischen CD4 und gp120 zu unterbinden. Das dort ermittelte gp120-Epitop bestand aus Aminosäure 413 bis 455. 1988 ermittelten Schnittman *et al.*, ebenfalls mit einem kompetitiven Bindungsassay und einem Scatchard-Plot,

einen K_I von 3.5 - 6.0 nM⁷⁵. Mittels BIACORE konnten Wu *et al.* 1996 zeigen, daß der K_D der CD4-gp120-Wechselwirkung bei 19 ± 5 nM liegt (mit $k_a = 83000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ und $k_d = 1.6 \cdot 10^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$). Während eine Mutante des CD4, die nur aus den Domänen D1 und D2 besteht, eine identische Kinetik und Gleichgewichtskonstante der Dissoziation zeigt, führten die Mutanten F43V (Phenylalanin-43 des CD4 wurde ersetzt durch ein Valin), A55F und G47S zu verringerten K_D -Werten um die Faktoren 200, 50 und 5⁷⁶. Dabei basierte der Abfall hauptsächlich auf einer langsameren Assoziation. Fischer *et al.* hatten 1995 die Wechselwirkung zwischen immobilisiertem gp120 und CD4 untersucht⁷⁷. Dabei wurde ein "two receptor model" zur Auswertung benutzt. Es ergaben sich K_D -Werte von 430 und 35 nM, $k_a = 49000$ und $12000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_d = 21$ und $3.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Zusammenfassend kann angenommen werden, daß es sich bei der Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120 um eine feste Bindung im niedrigen nanomolaren Bereich handelt.

1.4.1 Thermodynamik der CD4-gp120-Wechselwirkung

Kürzlich wurden Daten präsentiert, die die CD4-gp120-Wechselwirkung von thermodynamischer Seite her betrachten⁷⁸. Dabei wurde zum einen vollständiges gp120 vom Stamm BH10 benutzt, aber auch das gp120-*core* (siehe Abbildung 7), welches in der Röntgenstruktur von Kwong *et al.*²¹ verwendet wurde. Als Grundlage der Untersuchungen wurde durch MALDI und analytische Ultrazentrifugation gezeigt, daß gp120 und CD4 alleine in den untersuchten Konzentrationen in monomerer Form vorliegen und zusammen einen 1:1-Komplex ausbilden. Die Thermodynamik der gp120-CD4-Wechselwirkung wurde mittels Titrations-Mikrokalorimetrie ermittelt. Beim Vergleich der beiden gp120 Arten ergaben sich 5 nM für das vollständige gp120 und 190 nM für das gp120-*core*. Der Unterschied zwischen gp120 und gp120-*core* erscheint mit Faktor 40 auf den ersten Blick sehr hoch. Dies entspricht den ΔG° Werten die -11.8 und -9.5 kcal/mol betragen. Beachtenswert ist der sehr hohe ΔH° (~ -63 kcal/mol) und der große $-T\Delta S^\circ$ (~ 52 kcal/mol) Wert der CD4-gp120-Bindung. Der große Wert für die Enthalpie spricht für eine Vielzahl von Bindungs-Interaktionen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen usw.), die während der Bindung auftreten. Es wird vermutet, daß ca. 100 Reste während der Bindung reorganisiert werden, ein Wert, der im Vergleich mit bekannten Protein-Protein-Wechselwirkungen zu den größten gehört⁷⁹. Der hohe Wert der Bindungsentropie spricht für einen erheblichen Verlust an Freiheitsgraden durch die Bindung von gp120 an CD4. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bindung des gp120 an das CD4 mit einer erheblichen

Konformationsänderung des gp120 einhergeht und somit ein *induced fit*- Mechanismus angenommen wird. Dies steht in Übereinstimmung mit der langsamen Kinetik der Assoziation. Eine Ermittlung der K_D -Werte über BIACORE-Experimente mittels Analyse der k_a - und k_d -Werte ergab 22 nM für das vollständige gp120 und 220 nM für das gp120-*core*. Diese Werte liegen in einem vergleichbaren Bereich mit denen aus der Mikrokalorimetrie. Der Vergleich der Kinetik ergab nahezu identische k_a -Werte für die untersuchten gp120 Sorten (Vollständiges BH10 gp120, gp120-*core* aber glycosyliert, gp120-*core* wie in der Röntgenstruktur²¹). Allerdings ist der k_d -Werte des gp120-*core* im Vergleich mit dem vollständigen gp120 um eine Größenordnung größer, woraus der Unterschied im K_D resultiert. Zwischen gp120-*core* (glycosyliert) und gp120-*core* (aus der Röntgenstruktur) gibt es dagegen keine Unterschiede im k_d . Anscheinend hat die Glycosylierung wenig Einfluß auf die Bindung des gp120 an das CD4. Aus der Röntgenstruktur war ersichtlich, daß sich in der CD4-Bindungsregion kaum Zuckerreste befinden. Nur ein Zuckerrest lag in der Nähe des Bindungsbereiches, so daß eine Wechselwirkung denkbar wäre.

1.5 ARZNEIMITTELFORSCHUNG

Der Erfolg der Medizin in diesem Jahrhundert ist größtenteils den Arzneimitteln zu verdanken. Die Entwicklung eines neuen Arzneimittels ist mit ca 600 Millionen US\$ ein sehr kostenintensiver und langwieriger (12 bis 15 Jahre) Prozeß. Bis zur Markteinführung muß das Produkt eine Vielzahl von Testverfahren durchlaufen. In *screening*-Verfahren prüft die pharmazeutische Industrie sowohl Substanzbibliotheken aus natürlichen Quellen als auch synthetischen Ursprungs, die mit Hilfe der kombinatorischen Chemie erzeugt worden sind, auf biologische Aktivität. Zum Einsatz kommen meist Hochdurchsatz-Screening-Methoden (HTS), die mittlerweile 100000 Substanzen am Tag und mehr untersuchen können⁸⁰. Wird dabei eine aktive Komponente gefunden (ein *hit*) und kann sie identifiziert werden, so kann diese Komponente eine Leitstruktur für ein neues Medikament darstellen. Entscheidendes Merkmal einer Leitstruktur ist zum einen eine bestimmte biochemische oder pharmakologische Wirkung. Diese ist immer über ein Bindungsereignis definiert, z.B. die Bindung eines kleinen Moleküls an einen Rezeptor (Protein). Für einen therapeutischen Ansatz fehlt der Substanz aber in der Regel noch eine Reihe bestimmter Eigenschaften. Daher muß zum anderen eine chemische Modifizierung möglich sein, um ihre Eigenschaften zu optimieren.

Von Wirkstoffen, die oral verabreicht werden sollen, wird in der Pharmaindustrie erwartet, daß sie die *rule of five* einhalten:

- ◆ Molekulargewicht unter 500
- ◆ Wasserstoff-Akzeptoren (Anzahl Sauerstoff- und Stickstoffatome) kleiner 10
- ◆ clogP-Wert kleiner 5
- ◆ Wasserstoff-Donoren kleiner 5

Eine besonders wichtige, und zu optimierende Eigenschaft ist die Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort. Diese als Bioverfügbarkeit bezeichnete Eigenschaft wird im Wesentlichen durch vier Vorgänge im Körper beeinflusst. Als Akronym wird hierfür ADME benutzt. Es steht für *adsorption, distribution, metabolism and excretion*. Damit ist die Aufnahme, die Verteilung, die Metabolisierung und die Ausscheidung des Stoffes im Körper gemeint. Weitere zu optimierende Eigenschaften sind die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, aber auch die Toxizität. Sie alle müssen vorher an *in vitro*-Systemen und Tiermodellen geklärt werden. Erst dann wird daraus unter Umständen ein Medikament. Desweiteren muß auch die Möglichkeit des Upgrading bestehen, also die Produktion des Wirkstoffs im technischen Maßstab. Bis ein Medikament in die klinischen Phasen eintritt, vergehen in der Regel mehrere Jahre.

1.6 PEPTIDE ALS ARZNEIMITTEL

Für den menschlichen Organismus sind körpereigene Peptide für viele biologische Funktionen verantwortlich. Zum Beispiel Angiotensin II zur Blutdrucksteigerung, Gastrin für Säuresekretion oder die Enkephaline als Liganden des Morphin-Rezeptors (Analgetikum). Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, daß Peptide auch als Arzneimittel einsetzbar sind. Der Einsatz von Peptiden als Medikamente wird aber durch einige Faktoren stark eingeschränkt. Peptide werden sehr leicht durch Proteasen im Magen-Darm-Trakt oder im Serum gespalten und sind somit metabolisch nicht sehr stabil. Außerdem werden die Peptide nach oraler Gabe meist schlecht resorbiert, im wesentlichen bedingt durch das hohe Molekulargewicht und die hohe Polarität. Daher besteht ein großes Interesse, Wirkstoffe ohne diese für den Einsatz als Medikament negativen Eigenschaften zu entwickeln, die aber trotzdem am gleichen Rezeptor wie das Peptid binden. Diese als Peptidomimetika bezeichneten „optimierten Peptide“ müssen daher die gleiche räumliche Anordnung der für die Bindung verantwortlichen Gruppen und Bereiche wie im Peptid

aufweisen, ein geringeres Molekulargewicht zur Erhöhung der oralen Verfügbarkeit haben sowie möglichst keine spaltbaren Amidbindungen zur Erhöhung der metabolischen Stabilität besitzen. Der Weg bei der Entwicklung von Peptidomimetika startet mit dem biologisch aktiven Peptid, bei dem durch Variation der Seitenketten die für die Bindung wichtigen Gruppen gefunden werden. Eine hierfür häufig verwendete Methode ist der Alanin-Scan, bei dem jede Position des Peptids nacheinander durch die Aminosäure Alanin ersetzt wird. Ein Aktivitätsabfall ist dann ein Indiz dafür, daß die entfernte Seitenkette wichtig ist. Um die metabolische Stabilität des Peptids zu erhöhen werden Aminosäuren durch nicht-natürliche Aminosäuren ersetzt. Die Hauptkette des Peptids kann durch geeignete Gruppen dahin gehend verändert werden, daß keine spaltbaren Amidbindungen mehr vorhanden sind. Voraussetzung ist, daß die C=O- und die N-H-Gruppe keine bindungsentscheidenden Wasserstoffbrücken zum Rezeptor ausbilden. Da Peptide sehr flexible Moleküle sind, kann eine Cyclisierung und die damit verbundene Konformationsstabilisierung oder die Verwendung von Templaten, die eine bestimmte Sekundärstruktur erzwingen von Vorteil sein. Als typische Beispiele können die auf dem Markt befindlichen HIV-Protease-Inhibitoren genannt werden, die über einen peptidomimetischen Ansatz entwickelt worden sind. Auch wenn die Euphorie, die Mitte der achtziger Jahre in Bezug auf den rationalen Entwurf von Peptidomimetika verfliegen ist, so spielen diese Ansätze dennoch heute eine wichtige Rolle bei der Leitstrukturoptimierung.

1.7 MOLEKÜLE, DIE AN CD4 BINDEN

In der Literatur finden sich viele Beispiele für Moleküle die an das Glycoprotein CD4 zu binden vermögen. Anfang der neunziger Jahre wurde ein, von einem antimikrobiellen Peptid abgeleitetes, Peptid entdeckt, daß eine mit AZT vergleichbare hohe Anti-HIV-Aktivität besitzt⁸¹. Dieses 18er-Peptid, T22 genannt, ist sehr basisch (drei Lysine und fünf Arginine) und hat zwei intramolekulare Disulfidbrücken. Über Zellassays mit CD4⁺- und CD4⁻-Zellen konnte vermutet werden, daß T22 an das CD4-Protein bindet⁸². BIACORE-Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß T22 sowohl an CD4 als auch an gp120 bindet⁸³, beide mit vergleichbaren K_D -Werten von 101 bzw. 167 nM. In neuerer Literatur wird T22 jedoch als Inhibitor von CXCR4 angesehen^{84,85}.

Ramsdale *et al.* hatte 1993 mittels BIACORE aufgenommene Daten veröffentlicht, die belegen, daß zwei kurze Peptide (PeptideT, VIP5-12) an immobilisiertes CD4 zu binden vermögen. Die Dissoziationskonstante für PeptideT wurde mit 20 und 56 nM angegeben⁸⁶. PeptideT wurde aus

einer gp120 Sequenz vom HIV-Stamm ARV2 (*AIDS-associated retroviruses*) abgeleitet. VIP5-12 stammt aus dem *vasoactive intestinal peptide*, und zeigt eine hohe Sequenzidentität mit PeptideT. Cyclische 12er-Peptide, abgeleitet von einem Antikörper (ST40), gegen die CDR3 Domäne von CD4 zeigten im BIACORE-Experiment K_D -Werte im nanomolaren Bereich (1.6 bis 86.4 nM)⁸⁷. Ein Peptomer aus Peptiden der C4-Region des gp120 (KIKQIINMWQEVGKAMYA) zeigte im ELISA mit biotinyliertem CD4 einen K_D von 8.59 nM⁸⁸. Das Peptomer wurde durch bifunktionelles *crosslinking* der Peptide mit chloracetyliertem N-Terminus und Cystein als letzter Aminosäure des C-Terminus erzeugt. Im Vergleich zum einzelnen Peptid, daß nur zu 2 % α -helikal in wässriger Lösung vorliegt, zeigt das Peptomer einen Anteil von 53 % an α -helikaler Konformation⁸⁹. Es wird angenommen, daß nur durch die Präsentation der α -Helix die Bindung stattfinden kann. Es wurde außerdem vermutet, daß dieser Bereich im nativen gp120 als amphipatische α -Helix vorliegt. Das Peptid allein zeigt keine Bindung an CD4. Es war jedoch möglich, mit dem Peptid eine Blockierung der Bindung des CD4 an gp120 zu erreichen. Voraussetzung war die Anwesenheit von 0.03 % Brij 35 (Polyoxyethylene(23) dodecylether) in der Lösung. Unter diesen Voraussetzungen zeigt auch das Peptid 17 % α -Helix-Konformation. Aus menschlichem Seminal-Plasma gewonnenes Glycoprotein gp17 bindet an mit CD4 belegte Sepharose-*Beads* und an CD4⁺-Jurkat-Zellen⁹⁰. Im BIACORE-Experiment ergaben sich K_D -Werte im nanomolaren Bereich¹⁷⁰.

3-Hydroxyphthaloyl- β -lactoglobulin ist ein potenter Inhibitor der Infektion mit HIV-1 und HIV-2⁹¹, vermutlich weil es, durch BIACORE-Untersuchungen belegt, sehr fest ($K_D = 0.1$ nM) und mit einer sehr langsamen k_d von $2.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ an CD4 bindet⁹².

Ein γ -förmiges, verzweigtes 44er Peptid (Name: 3.7), welches sich aus drei Bereichen von gp120 ableitet (C3, C4 und V5), inhibiert die Infektion von Makrophagen mit M-tropen HIV-Stämmen. Es wird angenommen, daß es an die CDR2-Domäne von CD4 bindet, da es kompetitiv die Bindung von QS4120, einem Antikörper gegen die CDR2-Domäne, inhibiert⁹³. Durch ihre Bindung an CD4 können diese Substanzen unter Umständen als HIV-*entry*-Inhibitoren benutzt werden.

1.8 INHIBITOREN DES HIV-ENTRYS

Wenn schon die ersten Schritte der HIV-Infektion durch geeignete Inhibitoren unterbunden werden könnten, wäre ein Schutz vor HIV-Infektionen möglich. Im folgenden werden einige Moleküle vorgestellt, von denen sich jetzt einige in der klinischen Phase befinden⁹⁴. Da der

Versuch, CD4 als Medikament einzusetzen, in Phase I/II gescheitert ist⁹⁵, wurde rekombinant ein heterotetrameres CD4-IgG2-Protein konstruiert⁹⁶ (Progenics, NY, USA), welches eine deutlich verbesserte Pharmakokinetik zeigt und sich jetzt in Phase I/II befindet.

Lexigen Pharmaceuticals Corp. MA, USA untersucht derzeit ein Makromolekül (aus sieben Benzolringen, mehrfachsulfatiert und mit zwei bis-azo Gruppen), in der klinischen Phase II. Es zeigt Konkurrenz mit einem V3-Antikörper, so daß eine Virus-Entry-Inhibition angenommen wird⁹⁷. Ebenfalls in der klinischen Phase II befindet sich ein von der V3-Domäne abgeleitetes Peptid (CoColumbia Labs, FL, USA)⁹⁸. Dieses MAP (*multiple antigen peptide*) präsentiert achtmal das GPGRAF-Motiv, ein relativ konservierter Bereich auf dem V3-Loop, und zeigt potente Inhibition (EC_{50} : ~ 50 nM) der HIV-1- und HIV-2-Infektion bei $CD4^+$ -T-Zellen⁹⁹.

Peptidische Inhibitoren der Corezeptor-Bindung sind z.B. T22 und T134 (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan)^{100,101,102}. AMD3100 (AnorMED, Langley, BC, Canada), ein Bis-tetraazamakrozyklus, ist als potenter HIV-Entry-Inhibitor ($IC_{50} = 1 - 10$ ng/ml) in der klinischen Phase II. Er inhibiert die Infektion von X4 HIV-1- und HIV-2-Stämmen, also den T-tropen, Syncicium bildenden, in der späten Phase auftretenden Stämmen, die hauptsächlich CXCR4 als Corezeptor nutzen, während die früh auftretenden M-tropen R5-Stämme nicht inhibiert werden^{103,104}. Alle oben beschriebenen HIV-Entry-Inhibitoren beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen gp120 und CD4 oder dem Corezeptor.

Im Verlauf der Infektion erfolgt nach den Wechselwirkungen mit den Rezeptoren die Fusion der Membranen, so daß die ssRNA des Virus in die Zelle gelangt. Diesen Prozeß zu inhibieren, könnte eine neue Gruppe von Wirkstoffen, die Fusions-Inhibitoren, hervorbringen. Ein 38er Peptid des N-terminalen Bereiches (42 - 79) von gp41 verhindert die Infektion in Zellkulturen^{105,106}. Dieses Peptid DP107 (oder T21) ist das erste Mitglied dieser neuen Wirkstoffgruppe der Fusions-Inhibitoren, jedoch liegt die Inhibition nur im mikromolaren Bereich. Ein zweites Peptid (DP178, T20 oder Pentafuside) zeigte höhere antivirale Aktivität ($EC_{50} \sim 1$ ng/ml)¹⁰⁶. Dieses 36er Peptid entspricht dem C-terminalen Bereich (126-161) von gp41 (blaue Helix in Abbildung 3).

Trimeris (Durham, NC, USA) untersucht dieses Peptid seit Anfang 2001 in Phase III der klinischen Prüfung. Es wird angenommen, daß das Peptid an die N-Helix (grau in Abbildung 3) bindet und somit *kein Trimer-of-Hairpins* mehr gebildet werden kann. Diese Bündel aus sechs Helices ist die Voraussetzung für die Membranfusion. Ein *Trimer-of-Hairpins* ist ein Strukturelement, welches häufig in Fusionsprozesse von Viren involviert ist^{107,108,109}.

In Zusammenarbeit mit Hoffman-La-Roche hat Trimeris im Januar 2001 erste positive Ergebnisse der Untersuchungen von T20, aber auch von einem neueren, potenteren und auf mehrere klinische Isolate wirkenden, peptidischen Fusions-Inhibitor T1249 präsentiert¹¹⁰.

Ein kürzlich veröffentlichter reverser Ansatz führt ebenfalls zu einem nanomolaren Inhibitor¹¹¹. Da das an die C-Helix bindende Peptid T21 nur im mikromolaren Bereich inhibierte, wurde der *Trimer-of-Hairpin* nachgebildet, wobei aber eine C-Helix fehlt. Dieses 5-Helix genannte Protein inhibiert im nanomolaren Bereich die Infektion.

Trotz der in Kapitel 1.6 angesprochenen Probleme mit Peptiden als Wirkstoffe, zeigen die Beispiele oben, daß sich dennoch eine ganze Reihe von ihnen in klinischen Phasen befinden. Die Pharmaunternehmen nehmen also die negativen Seiten der peptidischen Wirkstoffe hin, sofern die Peptide eine ausreichende Wirkung besitzen. Dennoch werden sicherlich parallel Versuche unternommen, daraus nicht-peptidische Wirkstoffe zu generieren.

2 Methoden

2.1 DIE PEPTID-FESTPHASENSYNTHESE

Peptide (griech.: *peptos* = verdaulich) sind Makromoleküle, bestehend aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen entsprechend der Primärstruktur verknüpft sind¹¹². Für die Peptidsynthese können prinzipiell drei Methoden angewendet werden:

- ◆ Chemische Methoden (Peptid-Festphasensynthese, Synthese in Lösung)
- ◆ Enzymatische Methoden unter Verwendung von Peptidasen
- ◆ Gentechnologische Synthese mit Expressionssystemen

Die rein chemische Peptid-Festphasensynthese wurde ganz entscheidend durch die Entwicklung von R. B. Merrifield geprägt, dessen Leistungen zur Entwicklung der Festphasen-Technik (Merrifield-Technik) 1984 mit dem Nobelpreis bedacht wurden¹¹³.

Dabei erfolgt die Synthese an einer festen Phase entgegen der biologischen Syntheserichtung vom C- zum N-Terminus. Diese Fixierung ermöglicht den Einsatz hoher Überschüße und durch zwischengeschaltete Waschzyklen die problemlose, verlustarme Entfernung von nicht reagierten Komponenten. Die jeweils angeknüpfte Aminosäure trägt an ihrer Aminofunktion eine Schutzgruppe. Aus der Vielzahl von existierenden Schutzgruppen hat sich hierfür im Laufe der Zeit die Fmoc-Gruppe aufgrund vieler Vorteile etabliert. Das Harz besitzt an der Oberfläche Ankergruppen (*Linker*), an der die Peptidkette wächst. Die Bindung zwischen *Linker* und Peptidkette muß während der Synthese fest, aber nach Beendigung der Synthese leicht zu spalten sein. Es gibt heute eine ganze Reihe unterschiedlicher *Linker*, die entweder Peptide mit Carboxamid oder mit freier Carboxy-Gruppe entstehen lassen. Weiterhin entscheiden die *Linker*, ob die Abspaltbedingungen so gewählt werden können, daß die Seitenkettenschutzgruppen während der Abspaltung vom *Linker* am Peptid bleiben oder mit abgespalten werden. Als Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäuren kommen in dieser Arbeit ausschließlich die Trityl-, Pbf-, *t*Bu- und Boc-Schutzgruppen zum Einsatz, die sich in wasserhaltiger TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan¹¹⁴ als *scavenger* problemlos abspalten lassen. Das Triisopropylsilan wirkt als Hydrid-Ionen-Donor und reagiert sehr schnell mit den während der Abspaltung gebildeten Carbokationen, bevor diese mit dem Peptid reagieren¹¹⁵.

Die Seitenketten-Funktionen der eingesetzten Aminosäuren müssen über den gesamten Syntheseverlauf stabil geschützt bleiben, während für die α -Aminogruppen nur ein temporärer

Schutz in Form einer basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe¹¹⁶ gewählt wird. Für die Knüpfung der Peptidbindung existieren eine Reihe unterschiedlicher Reagenzien (Aktivatoren), die die Aktivierung der Carboxylfunktion realisieren. Als Aktivatoren zur Bildung der erforderlichen Aminosäureaktivester haben sich aufgrund der bei ihrem Einsatz verringerten Racemisierungsgefahr¹¹⁷ HATU¹¹⁸ und TBTU¹¹⁹ (Strukturformeln siehe Abbildung 10) etabliert. Der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU ist in Abbildung 11 zu sehen.

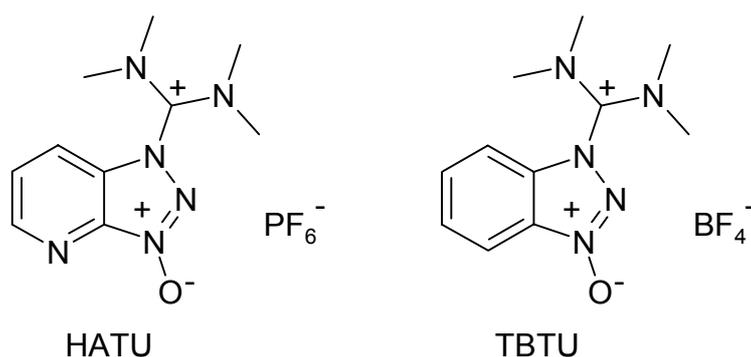


Abbildung 10 Die Aktivatoren HATU und TBTU.

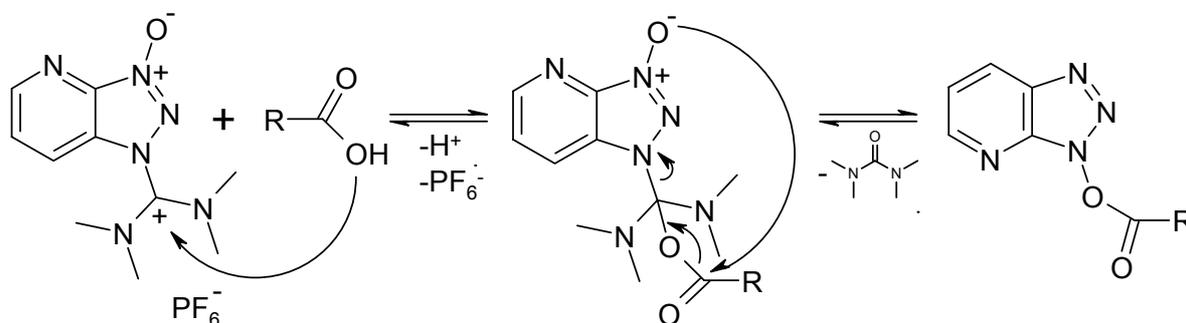


Abbildung 11 Vorgeschlagener Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU.

Einige weitere Vorteile von HATU sind hohe Ausbeuten, kurze Kupplungszeiten und gute Kupplungseffektivität bei sterisch gehinderten Aminosäuren. Das Prinzip der Peptid-Festphasensynthese ist in Abbildung 12 schematisch gezeigt. Die C-terminal im Zielpeptid erste Aminosäure wird über ihre aktivierte α -Carboxylfunktion an einem mit dem Harz verknüpften Linker gebunden. Anschließend wird durch Behandlung mit Piperidin die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Entsprechend der Primärsequenz kann nun die Kupplung und Fmoc-Abspaltung der nächsten Aminosäuren erfolgen und so die Kette aufgebaut werden. Zur Vermeidung von Peptiden mit Deletionsstellen, ist es ratsam, jeweils nach der Aminosäure-Kupplung einen

Blockierungsschritt durch Acetylierung (*capping*) aller nicht umgesetzten, noch freien Aminofunktionen durchzuführen.

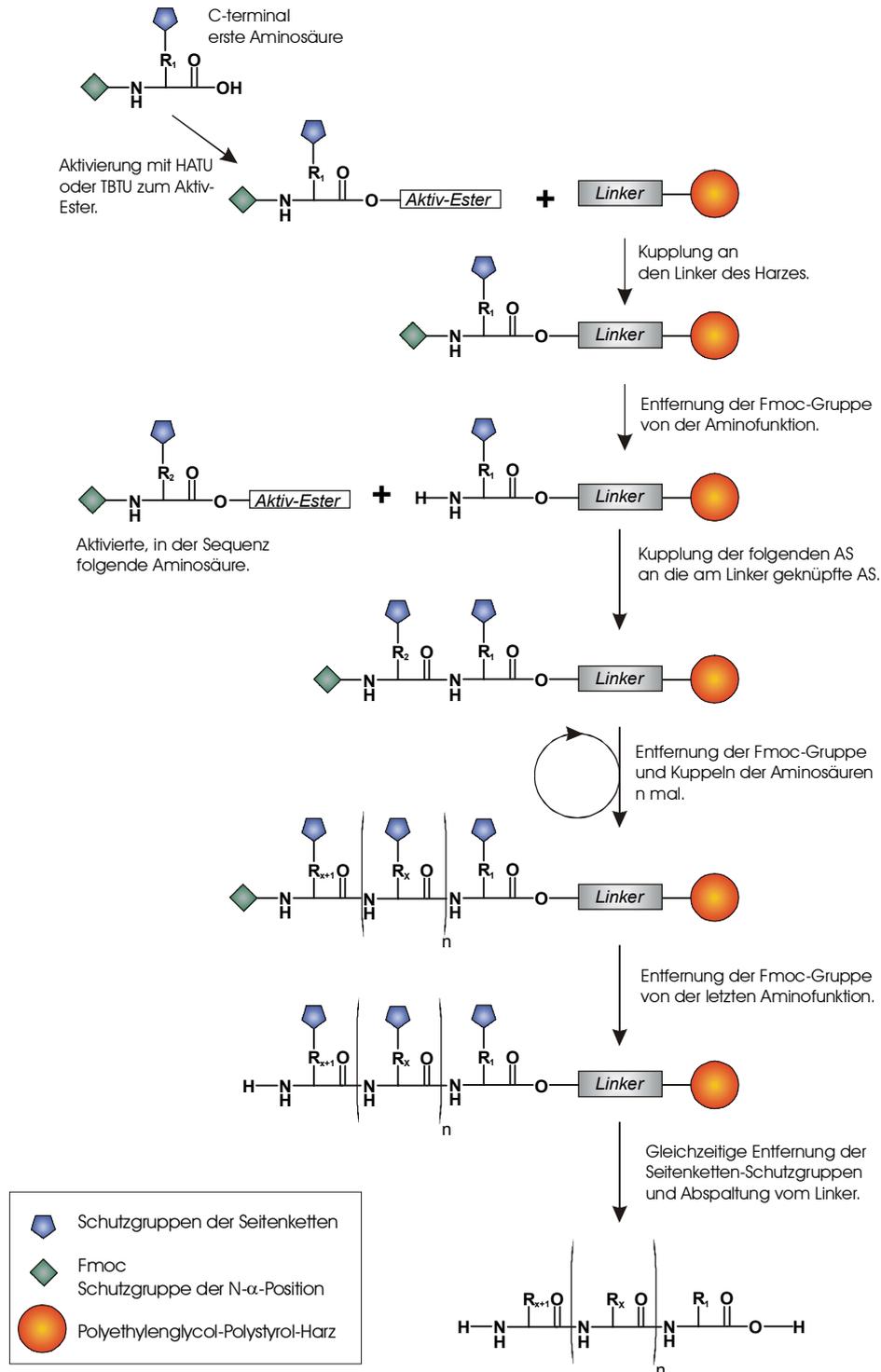


Abbildung 12 Allgemeines Schema der Peptid-Festphasensynthese.

Abschließend wird das Zielpeptid vom Harz abgespalten; dabei werden seine Seitenketten-Schutzgruppen entfernt. Nachfolgend wird das Rohprodukt aufgereinigt, wobei in den meisten Fällen auf die Methode der RP-HPLC zurückgegriffen wird.

2.2 STD-NMR-SPEKTROSKOPIE

Mit der STD-NMR-Spektroskopie (*saturation-transfer-difference*) ist eine Methode etabliert worden, mit der die Bindungsaktivität niedermolekularer Substanzbibliotheken an makromolekulare Rezeptoren, wie z.B. Proteinen, untersucht werden kann^{120,121}. Im Gegensatz zu andere Verfahren, wie FACScan-Analysen, ELISAs, RIAs, BIACORE oder auch Fluoreszenzassays liefert STD-NMR nicht nur eine Antwort bezüglich der Bindungsstärke des Liganden, sondern auch strukturelle Eigenschaften der Protein-Ligand-Wechselwirkungen. STD-NMR-Spektroskopie erlaubt die direkte Identifizierung und Charakterisierung von kleinen Molekülen mit Bindungsaffinität gegenüber Proteinen. Dabei können bindungsaktive Substanzen aus Substanzbibliotheken gefunden werden (*screening*). Allgemeine Vorteile der NMR-Spektroskopie sind, daß es eine zerstörungsfreie Methode ist und daß die Substanzen unter annähernd physiologischen Bedingungen untersucht werden können.

Im folgenden werden das STD-NMR-Experiment und die wichtigen Bedingungen des Experimentes erläutert: Große Biomoleküle, z.B. Proteine, befinden sich im Spin-Diffusions-Limit. Das heißt, eine selektive Sättigung einiger Proteinresonanzen führt zu einer schnellen Verteilung der Magnetisierung über das gesamte Makromolekül, und zwar um so schneller, je größer das Protein ist¹²². Die Proteingröße bedeutet also keine Einschränkung für dieses NMR-Experiment. Die einzige zu erfüllende Voraussetzung ist, daß sich das Molekül im Spin-Diffusions-Limit befindet, welches ab ca. 10 kDa erreicht ist. Aufgrund der sehr großen Linienbreite der ¹H-NMR Proteinspektren weisen Proteine selbst im negativen ppm-Bereich sowie im Bereich jenseits der 10 ppm noch Signalintensität auf. Daher besteht die Möglichkeit, selektiv Proteinresonanzen außerhalb des spektralen Fensters der Ligandresonanzen, die im Bereich von ca. 0 – 9 ppm liegen, zu sättigen. Der Einstrahlpunkt kann z.B. bei –1 ppm liegen. Die NMR-Spektren, bei denen der Rezeptor vorgesättigt wird, werden im folgenden als *On-Resonance*-Spektren bezeichnet. Durch die Sättigung erfolgt eine Gleichverteilung der α - und β -Spins, so daß im NMR-Experiment nichts detektiert werden kann. Die Proteinresonanzen haben dann im NMR-Spektrum keine sichtbare Intensität (siehe Abbildung 13). Für ein Referenz- oder *Off-Resonance*-NMR-Experiment findet der selektive Vorsättigungspuls außerhalb des spektralen

Fensters des Proteins, z.B. bei 40 ppm, statt. Das Protein wird in diesem Experiment nicht gesättigt und behält seine normale Intensität ¹²³. Das STD-NMR-Spektrum ist nun die Differenz zwischen dem *Off-Resonance*- und dem *On-Resonance*-Spektrum.

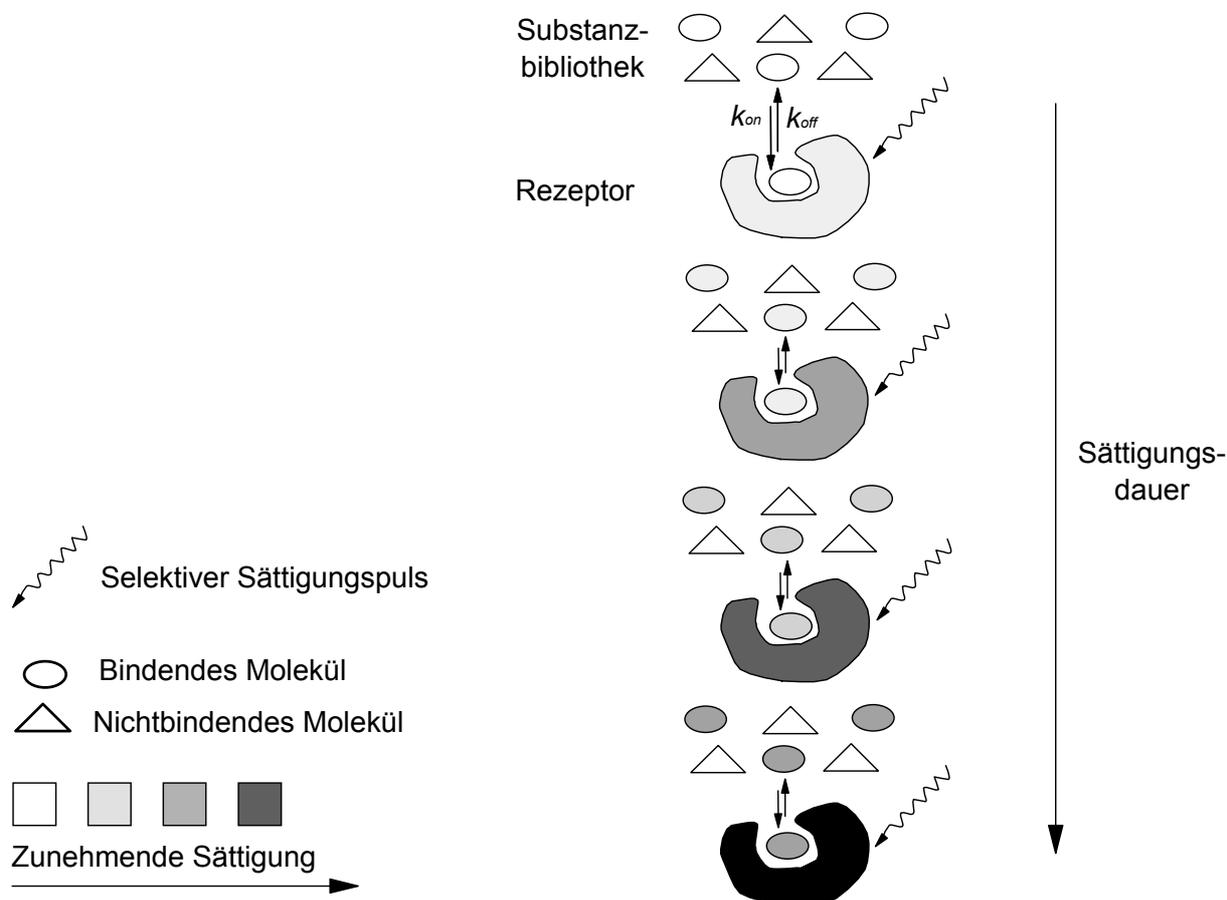


Abbildung 13 Schema der STD-NMR zur Bestimmung von bindenden Komponenten. Der selektive Puls sättigt nur einige Proteinresonanzen. Über Spin-Diffusion wird die Sättigung über das gesamte Protein verteilt. Die ellipsenförmig dargestellten bindenden Moleküle haben direkten Kontakt zur Proteinoberfläche. Ihre Signale werden daher über den intermolekularen Sättigungstransfer ebenfalls gesättigt. Die Signale der hier dreieckig dargestellten nicht-bindenden Moleküle werden nicht gesättigt, und ihre Signale werden daher durch die Differenzbildung ausgelöscht.

Bindet ein Ligand an ein gesättigtes Protein, so werden die Protonensignale des Liganden, durch den Sättigungstransfer in ihrer Intensität erniedrigt. Aber nur von denjenigen Protonen des Liganden, die mit dem Protein interagieren, sich also in räumlicher Nähe zur Proteinoberfläche befinden. Durch die Differenzbildung sind dann nur Signale im STD-Spektrum sichtbar, die durch die Interaktion erniedrigt wurden. Bei Substanzbibliotheken werden alle Signale nicht-bindender Liganden folglich nicht auftauchen. Für einfache Liganden läßt sich also mit einem 1D STD-NMR-Spektrum aus Mischungen das bindende Molekül identifizieren. Für komplexere Moleküle können auch n-dimensionale STD-NMR-Verfahren (z.B. TOCSY, HSQC¹²⁴) benutzt

werden. Die Bestimmung des Bindungssepitops eines Liganden ist ebenfalls aus STD-NMR-Spektren möglich. Es besteht eine Abhängigkeit zwischen der Signalintensität im STD-Spektrum und dem Abstand zwischen Protein und den Ligandenprotonen.

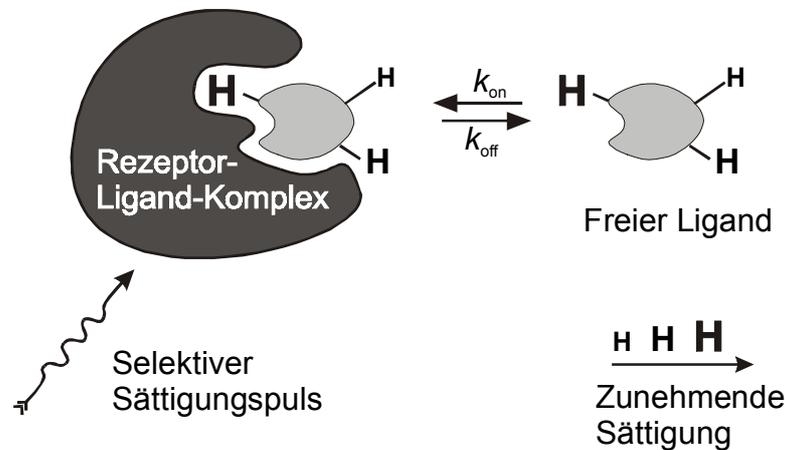


Abbildung 14 Ermittlung des Bindungssepitops aus STD-Experimenten. Protonen, die sich nahe am Rezeptor befinden, erhalten viel Sättigung und sind hier mit einem großen H gekennzeichnet. Weiter entfernt liegen Protonen erhalten nur wenig Sättigung; im Bild sind diese Protonen durch ein kleines h gekennzeichnet.

Aufgrund der Abstandsabhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate werden Ligandenprotonen, die nahe an der Proteinoberfläche liegen, stärker gesättigt, als Ligandenprotonen, die weiter entfernt liegen oder keinen Kontakt haben. Da die Kreuzrelaxation zwischen Protein- und Ligandenprotonen im gebundenen Zustand die Sättigung überträgt, können STD-NMR-Spektren auch dazu verwendet werden, das Bindungssepitop des Liganden zu bestimmen. Je größer die Intensität einer Resonanz im STD-Spektrum, desto näher liegt das entsprechende Proton am Protein. Dadurch lassen sich die für die Bindung entscheidenden Bereiche des Liganden direkt bestimmen.

2.3 SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR)

Als ein Schlüsselereignis in der belebten Natur kann die Wechselwirkung von Proteinen mit anderen Molekülen angesehen werden. Dabei kann eine Interaktion mit anderen Proteinen, Peptiden, Lipiden, Zuckern oder auch anderen kleinen Molekülen (z.B. Pharmaka) auftreten.

Durch die Bindung der beiden Moleküle kann dann eine Wirkung eintreten. Die Wechselwirkung steht aufgrund ihrer Universalität im besonderen Interesse der Wissenschaft. Seit etwa zehn Jahren gibt es eine neue Methode, um die Bindung von Molekülen in Echtzeit zu messen. Sie hat

sich außergewöhnlich schnell entwickelt und gehört heute in pharmazeutischen Unternehmen zu einer Standardmethode. Von den verschiedenen Herstellern dieser Geräte hat sich die Firma BIACORE AB, Uppsala, Schweden als Marktführer etabliert. Ihr gelang es 1990 das erste kommerzielle Gerät auf den Markt zu bringen¹²⁵. Die im BIACORE-Instrument benutzte SPR-Technik (*surface plasmon resonance*) ist eine optische Methode und dadurch sehr empfindlich. Das Phänomen wurde schon 1959 von Turbadar beschrieben¹²⁶ und maßgeblich weitergeführt durch Otto^{127,128} und Kretschmann & Raether¹²⁹. Der Hauptvorteil von SPR basierten Biosensoren ist, daß die Moleküle kein *label* benötigen (wie z.B. fluoreszenz- oder radioaktive *label*) und somit keine Moleküleigenschaft verändert wird. Ein weiterer großer Vorteil ist, daß für die Untersuchungen nur sehr wenig von dem häufig schwer zugänglichen biologischen Material benötigt wird. Außerdem können fast alle wäßrigen Puffersysteme benutzt werden. Auch ein kleiner Anteil an organischem Lösungsmittel ist möglich. Dies ist gerade bei schlecht wasserlöslichen, hydrophoben Proben von Vorteil.

2.3.1 Theorie

Tritt ein Lichtstrahl unter Totalreflektion an einer Grenzfläche von hohem zu niedrigem Refraktionsindex auf, so tritt eine evaneszierende Welle in den dahinter befindlichen Raum. Beim BIACORE wird p-polarisiertes Licht ($p = \textit{plane}$, in der Ebene des einfallenden Lichtstrahls) mit einer Wellenlänge von 760 nm, die von einer Diode emittiert wird, verwendet. Die Amplitude nimmt hinter der Grenzfläche exponentiell ab. Durch die Wechselwirkung der evaneszierenden Welle mit einer Metallschicht (Goldschicht: 50 nm) entsteht eine *enhanced evanescent wave* mit einem deutlich verstärkten elektrischen Feld, die bis ungefähr 760 nm hinter die Goldschicht reicht, und dabei exponentiell abfällt. Die Wechselwirkung der evaneszierenden Welle mit den Oberflächenplasmonen der Goldschicht tritt nur bei einem bestimmten Winkel auf. Das meßbare Resonanzphänomen kann als *dip* in der Intensität des Lichtes bei einem bestimmten Winkel detektiert werden, (siehe Abbildung 15 rechts oben; Auftragung der Intensität des reflektierten Lichtes gegen den Winkel). Zur Messung des Lichtes wird ein Dioden-Array-Detektor benutzt. Eine Änderung im Brechungsindex von $1 \cdot 10^{-3}$ erzeugt eine Verschiebung um 0.1° im Resonanz-Winkel. Die gemessene Veränderung im Resonanz-Winkel wird als Resonanz-Unit Einheit: RU angegeben. Die aktuellen BIACORE-Geräte sind in der Lage, SPR-Winkel von 0.0001° zu messen. Dieses entspricht einer Änderung des Brechungsindex von $1 \cdot 10^{-6}$. Stenberg *et al.* konnten zeigen, daß für Proteine Änderungen im Brechungsindex proportional zur Zunahme an

Masse sind¹³⁰. Dies gilt annähernd auch für andere biologischen Makromoleküle wie DNA, Lipide oder Zucker. Daher kann SPR zur Messung von Massendifferenzen benutzt werden. 1000 RU entsprechen 0.1° und 1 ng/mm^2 .

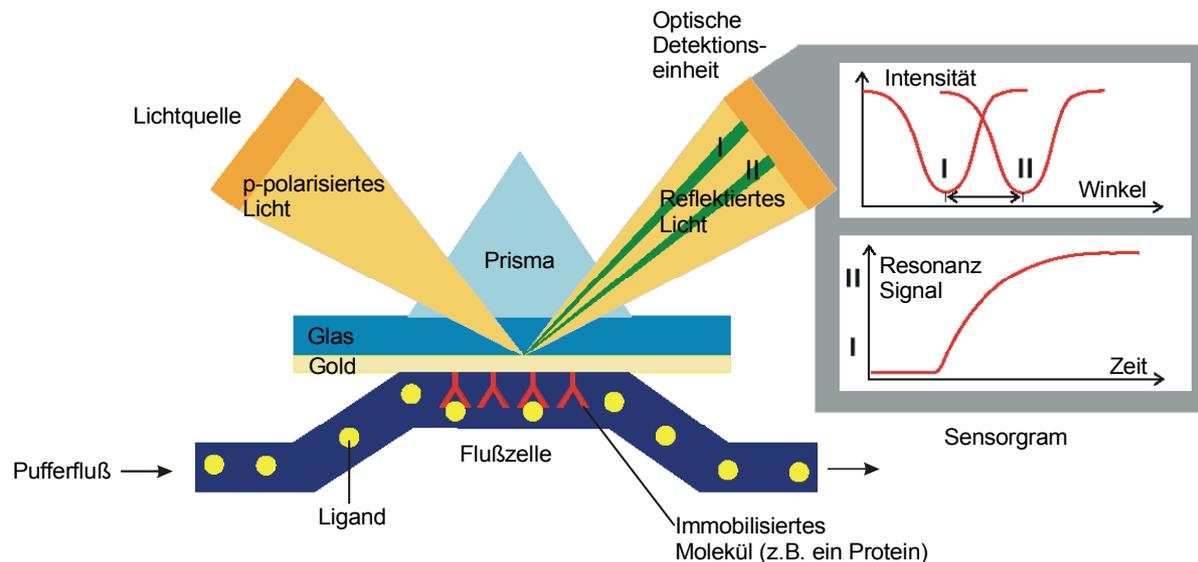


Abbildung 15 SPR-Detektions-System¹³¹.

Im BIACORE-Gerät wird ein Bindungspartner immobilisiert, während der andere Bindungspartner (Ligand), an ihm vorbeiströmt. (siehe Abbildung 15).

Der immobilisierte Bindungspartner kann dabei sowohl der makromolekulare Rezeptor (z.B. das Protein) als auch ein niedermolekularer Bindungspartner sein. Zu Beginn der BIACORE-Untersuchungen Anfang der neunziger Jahre wurde aufgrund der Empfindlichkeit immer der Bindungspartner mit dem niedrigeren Molekulargewicht immobilisiert, um maximale Antwort zu erhalten. Mit dem heute erhältlichen BIACORE 3000 lassen sich auch Liganden, die kleiner als 500 Da sind, untersuchen¹³². Die Standard-Immobilisierung (Belegung) erfolgt über eine Amin-Kupplung auf einem Chip (CM5-Chip) mit einer Glas- und einer Goldschicht, auf der eine, carboxymethylierte DEXTRAN-Matrix (Dicke: $\sim 100 \text{ nm}$) aufgebracht ist. Für unterschiedliche Anwendungen sind jedoch verschiedene Chips kommerziell erhältlich: z.B. der SA Chip mit immobilisierten Streptavidin zur Bindung biotinylierter Liganden, NTA für *bis-tagged* Liganden, F1 mit einer sehr kurzen Dextranschicht, um Wechselwirkungen mit der Dextranschicht zu minimieren, B1 mit einer niedrigen Carboxyl-Dichte, HPA mit einer Thioalkanschicht oder J1 mit einer reinen Goldschicht. Eine interessante Anwendung stellt die Belegung eines Chips mit Liposomen^{133,134,135} dar, weil dadurch auch sonst nur schlecht untersuchbare membranständige Proteine eingesetzt werden können. Beim CM5-Chip wird normalerweise die Amin-Kupplung

(siehe Abbildung 16) eingesetzt. Dabei werden die Carboxyl-Funktionen der Dextran-Schicht in Aktivester überführt und das Protein (oder ein anderes Molekül mit freier Amino-Funktion) kovalent über eine Amidbindung gebunden. Anschließend werden alle nicht belegten, aber aktivierten Carboxylfunktionen mit einem Überschuß Ethanolamins umgesetzt und so inaktiviert. Für die Belegung einer Oberfläche mit Protein werden nur einige μg benötigt. Ein Chip hat vier gleiche Zellen (Fc1 bis Fc4) mit einer Oberfläche von etwa $\sim 1 \text{ mm}^2$, und einem Volumen von je $\sim 21 \text{ nL}$. Eine der Zellen wird normalerweise nicht, oder mit einem nichtaktiven Protein belegt, um sie als Referenzzelle zu nutzen. Dies ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit (1 pg entspricht 1 RU, das Basislinienrauschen ist kleiner 0.1 RU) zum einen nötig, um die spezifische Wechselwirkung der beiden Bindungspartner von der nicht-spezifischen Wechselwirkung der Liganden mit der Chip-Oberfläche zu unterscheiden. Zum anderen dient es zur Unterscheidung von durch *bulk*-Effekte hervorgerufenen Änderungen im Brechungsindex während der Injektionen. Als *bulk*-Effekt werden Differenzen im Brechungsindex zwischen Laufpuffer und der Injektionslösung bezeichnet. Der Brechungsindex variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Konzentration an gelösten Molekülen (Biomoleküle, Salze, Puffersubstanzen usw.). Daher wird bei der Auswertung das Signal der Referenzzelle von dem Signal der mit dem Protein belegten Meßzelle abgezogen.

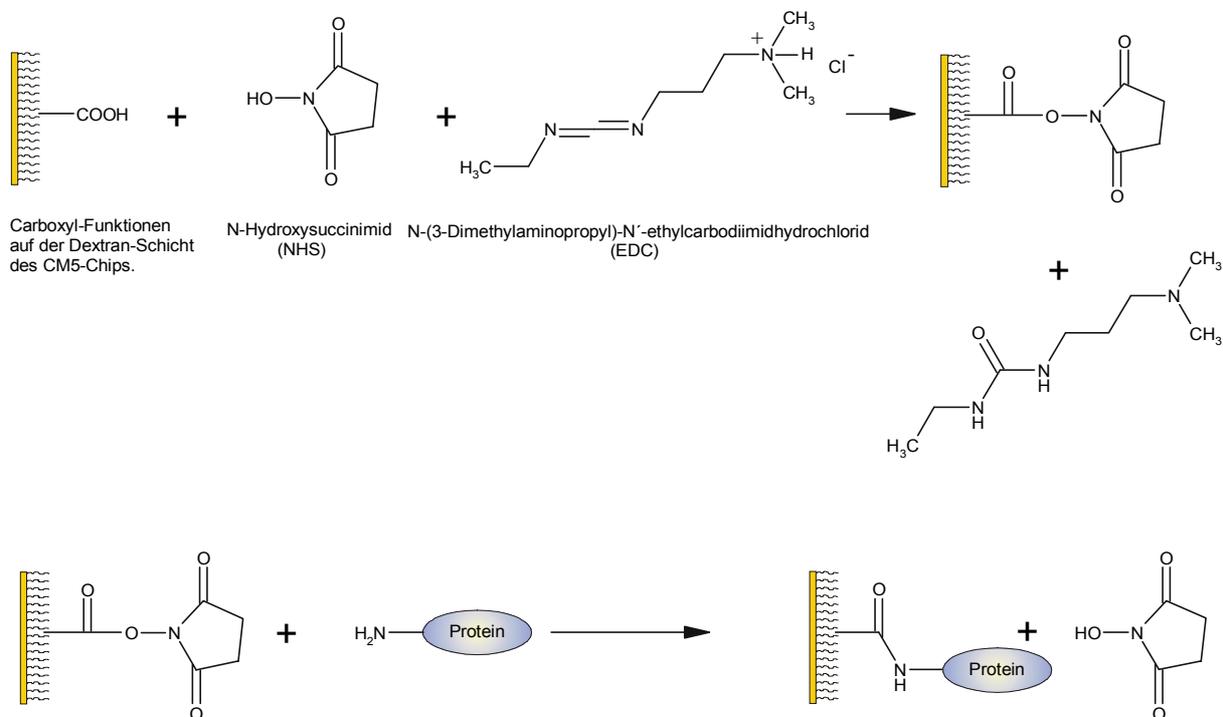


Abbildung 16 Amin-Kupplung zur Immobilisierung von Proteinen (oder anderen Molekülen) an den CM5-Chip.

In Abbildung 17 ist der Verlauf eines typischen SPR-Experiments in Form des Sensorgramms dargestellt. Am Anfang (0 - 100 s) fließt der Laufpuffer kontinuierlich über den Chip (Flußraten: 5 bis 100 $\mu\text{L}/\text{min}$). In den kleinen Ausschnitten ist das immobilisierte Molekül als schwarzes Y dargestellt. Es folgt die Assoziationsphase, in der der Ligand zugegeben wird. Es findet eine Wechselwirkung mit den immobilisierten Molekülen statt und das Resonanzsignal nimmt zu, da sich der Brechungsindex im meßbaren Bereich durch Massezunahme am immobilisierte Molekül ändert. Die Steigung des Signals wird nach einiger Zeit geringer, da die Bindungsstellen auf der Chipoberfläche kontinuierlich mit Ligand belegt werden, daß System erreicht ein Gleichgewicht. Die Steigung und die Dauer bis zum Erreichen eines Plateaus hängt von der Konzentration des Liganden und der Kinetik des Systems ab. Die Geschwindigkeitskonstante der Hin-Reaktion k_a kann unter Umständen direkt aus der Kurvenform erhalten werden kann. Wichtig hierbei ist, daß man bei verschiedenen Flußraten mißt, um sicherzustellen, daß keine Massen-Transport-Limitierung besteht. In diesem Falle würde nicht die wahre Geschwindigkeitskonstante gemessen werden, sondern eine zu geringe, da der Hin-Transport des Liganden zur Matrixoberfläche langsamer ist. Erhält man bei verschiedenen Flußraten die gleichen Kurven, so kann davon ausgegangen werden, daß kein Massen-Transport vorliegt.

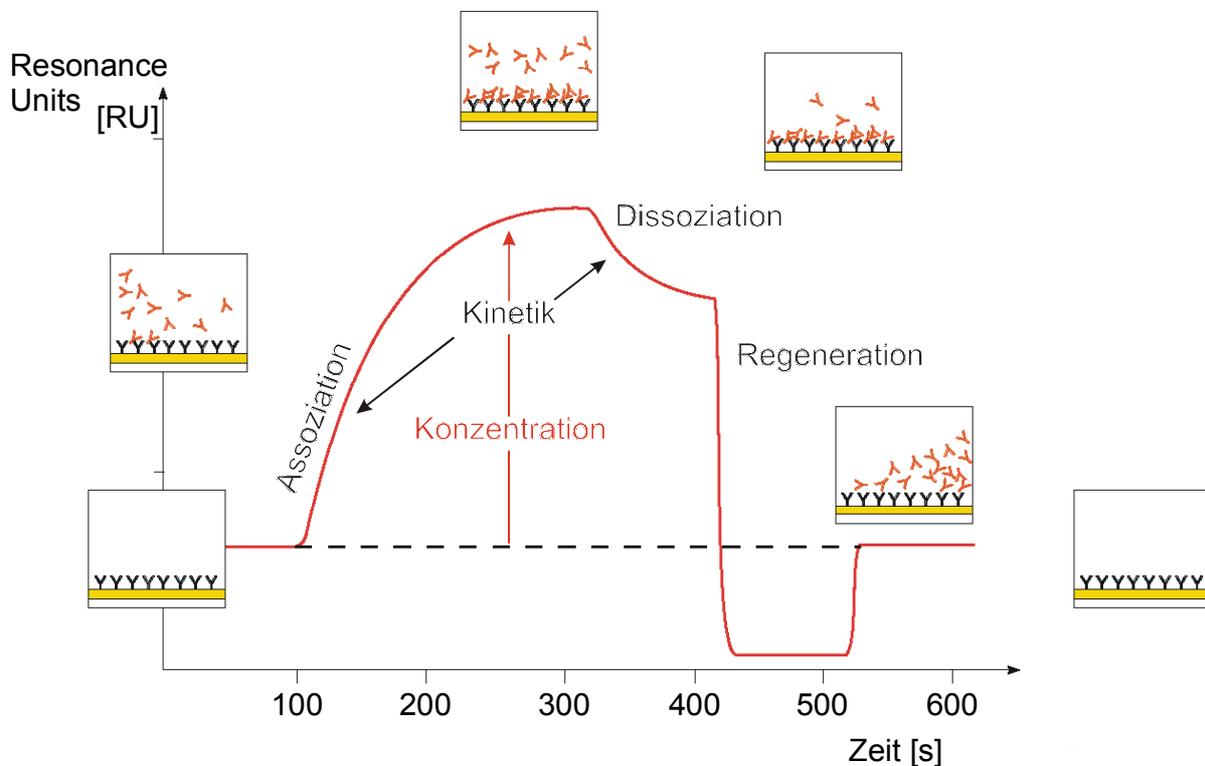


Abbildung 17 Typisches Sensorgramm eines SPR-Experimentes¹³¹.

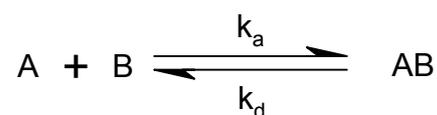
In der folgenden Dissoziationsphase wird auf Laufpuffer umgestellt, und der gebundene Ligand dissoziiert wieder ab. Durch den Verlust an gebundenem Ligand verringert sich der Brechungsindex, und das Resonanzsignal erniedrigt sich. Solange kein *rebinding*, also das erneute Binden des Liganden an immobilisierte Moleküle, auftritt kann aus dieser Kurvenform analog zur Assoziation die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_d bestimmt werden. Aus diesen beiden kinetischen Daten k_a und k_d kann dann die thermodynamische Gleichgewichtskonstante (Dissoziationskonstante: K_D) ermittelt werden (siehe 2.3.2).

Sehr schnelle Austauschprozesse sind jedoch über diesen kinetischen Weg nicht mehr auswertbar. In solchen Fällen läßt sich die Dissoziationskonstante nur über Konzentrationsreihen bestimmen und nicht mehr aus den Austauschkinetiken^{136,137,138}.

Ein großer Vorteil des BIACORE-Gerätes ist, daß die Messungen nicht auf Moleküle beschränkt sind. Es können auch größere Systeme, wie Bakterien,¹³⁹ Zellen¹⁴⁰ oder Viren,¹⁴¹ erfolgreich untersucht werden. Von besonderem wissenschaftlichen Interesse sind aber auch Untersuchungen an membranständigen Rezeptoren, da sie an in der Natur häufig vorkommenden Interaktionen beteiligt sind. Auch dieses ist mit BIACORE möglich¹⁴². Kürzlich wurde eine neue Methode zur Immobilisierung von 7TM-Proteinen (z.B. der Chemokin-Rezeptor CCR5)¹⁴³ auf einem Chip und zur Detektierung der Wechselwirkung mit dem Bindungspartner vorgestellt. Dabei wurde CXCR4 oder CCR5 in *murine leukemia virus* (MLV) Partikel eingebaut und an spezielle BIACORE-Chips gebunden, um so die Wechselwirkung von einem CD4-unabhängigen Stamm mit gp120 zu messen. Der gemessene K_D lag bei 506 nM. Außerdem konnte noch das gp120 eines CD4-abhängigen Stammes gemessen werden. Dabei war die Anwesenheit von CD4 im Laufpuffer nötig, um die Bindung zu messen. Dies sind Ergebnisse, die die bestehenden Modelle der Infektion gut unterstützen.

2.3.2 Kinetik

Als einfaches Modell der Wechselwirkung zweier Moleküle (z.B. Ligand A, Protein B und Komplex Protein-Ligand AB) kann ein 1:1 System angenommen werden. Dann gilt:



Gleichung 1

Für die Assoziation des Liganden A zum Protein B gilt dann:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B]$$

Gleichung 2

[AB] ist die Konzentration des Komplexes.

Für die Trennung des Protein-Ligand Komplexes AB gilt:

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_d \cdot [AB]$$

Gleichung 3

Die Gleichgewichtskonstanten sind dann wie folgt definiert:

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]}$$

Gleichung 4

als die Gleichgewichtskonstante der Assoziation und

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]}$$

Gleichung 5

die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation.

Im Falle der BIACORE-Messung kann nun die Netto-Gleichung aufgestellt werden.

$$\begin{aligned} \frac{d[AB]}{dt} &= k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB] \\ \frac{dR}{dt} &= k_a \cdot C \cdot [R_{\max} - R] - k_d \cdot R \end{aligned}$$

Gleichung 6

[AB] entspricht dann dem meßbaren RU-Wert

[A] entspricht der Konzentration C von dem injizierten Liganden

Die untere Gleichung beschreibt die Assoziationsphase und erlaubt die Bestimmung von k_a , jedoch unter Kenntnis von k_d .

Die Dissoziation wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{dR}{dt} = -k_d \cdot R$$

Gleichung 7

Im Gleichgewichtszustand gilt:

$$R_{eq} = \frac{C \cdot R_{max}}{C + K_D}$$

Gleichung 8

Bei der Auswertung nach dem „*steady-state-affinity*-Ansatz“ wird nun R_{eq} gegen C aufgetragen und die Gleichung 8 angepasst. Man erhält R_{max} und die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D .

3 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von peptidischen Inhibitoren der CD4-gp120-Wechselwirkung. CD4 ist ein stabförmiges Oberflächen-Glycoprotein, das auf bestimmten Leukozytensorten vorkommt. Gp120 ist ein Glycoprotein, welches sich auf der Oberfläche des HI-Virus befindet und für die Einschleusung des Virus in die Zielzelle verantwortlich ist. Durch eine Inhibition dieser Wechselwirkung wäre eine Infektion mit dem pandemisch auftretenden HIV unter Umständen zu verhindern. Dies wäre in Anbetracht von weltweit 36.1 Millionen infizierten Menschen und 21.8 Millionen daran Gestorbener mehr als erstrebenswert.

Anhand einer 1998 veröffentlichten Röntgenstruktur von einem gp120-CD4-Komplex sollten die auf der gp120-Seite involvierten Bereiche identifiziert werden, und daraus ein Satz geeigneter Peptide abgeleitet und synthetisiert werden. Anschließend sollte das Bindungsverhalten der Peptide an den humanen CD4-Rezeptor mittels BIACORE- Untersuchungen verifiziert werden. Potentielle Binder sollten modifiziert und die Bindungsfähigkeit dadurch verbessert werden. Weiterhin sollte die neuentwickelte Methode der STD-NMR-Spektroskopie, insbesondere der Einsatz von mehrdimensionaler STD-NMR-Spektroskopie zur Bestimmung des Bindungsepitops von Liganden, auf das System Peptid-CD4 angewendet werden. Mit der Entdeckung eines an CD4-bindenden Moleküls wäre eine Grundlage geschaffen, um die gegenwärtig eingesetzten Therapeutika, die nur eine begrenzte Zeit helfen, durch einen HIV-*Entry*-Inhibitor zu erweitern und somit die Behandlungsmöglichkeit von HIV-Infizierten zu verbessern.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 DIE KRISTALLSTRUKTUREN VON CD4

Um mehr strukturelle Informationen über das wichtigste Protein dieser Arbeit zu erhalten, wurde eine Suche nach der Proteinstruktur von CD4 in der *Protein Data Bank* (PDB™)¹⁴⁴ durchgeführt (Tabelle 1). Daraus ergab sich, daß bis 1996 immer nur D1-D2- oder D3-D4-Fragmente zu publizierten Kristalldaten geführt hatten, aber niemals der komplette extrazelluläre Teil D1-D4. Es wurde angenommen, daß die Verknüpfung dieser beiden Teile durch ein bewegliches Stück erfolgt und dieses die Kristallisation erschwert. Erst 1997 konnten Wu *et al.* dann komplettes CD4 in drei verschiedenen Kristallformen veröffentlichen. Ein Vergleich der Struktur D1-D2 von 1994 mit dem D1-D2 aus der Kristallstruktur des gesamten CD4 (D1-D4, 1997), zeigte kaum Unterschiede in der Konformation.

Tabelle 1 Röntgenkristallstrukturen des Glycoproteins CD4 aus der Protein Data Bank (PDB™).

PDB™-ID	Autor	Jahr	Bereiche
1CD4	Ryu ¹⁴⁵	1990	Humanes CD4 1-182 (D1-D2) Ersetzt durch 1CDH
2CD4	Wang ¹⁴⁶	1990	Humanes CD4 1-182 (D1-D2) Ersetzt durch 3CD4
3CD4	Garrett ¹⁴⁷	1993	Humanes CD4 1-182 (D1-D2)
1CID	Brady ¹⁴⁸	1993	Ratten CD4 182-361 (D3-D4)
1CDH	Ryu ¹⁴⁹	1994	Humanes CD4 1-178 (D1-D2) Type I Crystal Form
1CDI			Humanes CD4 0-178 (D1-D2) Type II Crystal Form 0=Thr
1CDJ	Wu ⁷⁶	1996	Humanes CD4 1-178 (D1-D2)
1CDU			Humanes CD4 1-178 (D1-D2) Phe43 gegen Val getauscht
1CDY			Humanes CD4 1-178 (D1-D2) Gly47 gegen Ser getauscht
1WBR	Willbold ¹⁵⁰	1996	Humanes CD4 403-419 (Chemisch synthetisiert)
1WIO	Wu ¹⁵¹	1997	1-363 (D1-D4) Tetragonal Crystal Form
1WIP			1-363 (D1-D4) Monoclinic Crystal Form
1WIQ			1-363 (D1-D4) Trigonal Crystal Form

Im Juni 1998 veröffentlichten Kwong *et al.* eine Röntgenstruktur in 2.5 Å-Auflösung von einem HIV-1 gp120-*core*-Komplex mit einem D1-D2-Fragment vom humanen CD4 und einem Antigen bindenden Fragment eines neutralisierenden CD4i-Antikörpers, der die Chemokin-Rezeptor Bindung blockiert (PDB™-Code: 1GC1). Diese Röntgenstruktur ist die Basis dieser Arbeit und wird im folgenden Kapitel genauer untersucht.

4.2 CD4-BINDUNGSBEREICHE AUF GP120

Um zu ermitteln, welche Aminosäuren auf der gp120-Seite in die Bindung involviert sind, wurden mit dem Programm Sybyl (Tripos, Inc.) alle Aminosäuren von CD4 ausgewählt. Innerhalb eines 5 Å großen Radius um die enthaltenen Atome wurde festgestellt, welche Aminosäuren auf der gp120 Seite in diesem Volumen enthalten sind. Dabei zeigte sich, daß der CD4-Bindungsbereich auf dem Glycoprotein gp120 über die gesamte Sequenz verteilt ist, er bildet ein sogenanntes diskontinuierliches Epitop. Man kann sechs Bindungsepitope definieren, von denen vier in konstanten Bereichen (C1, C2, C3 und C4), eines in einem variablen Bereich (V5) und eines in beiden Bereichen (V5/C5) liegt.

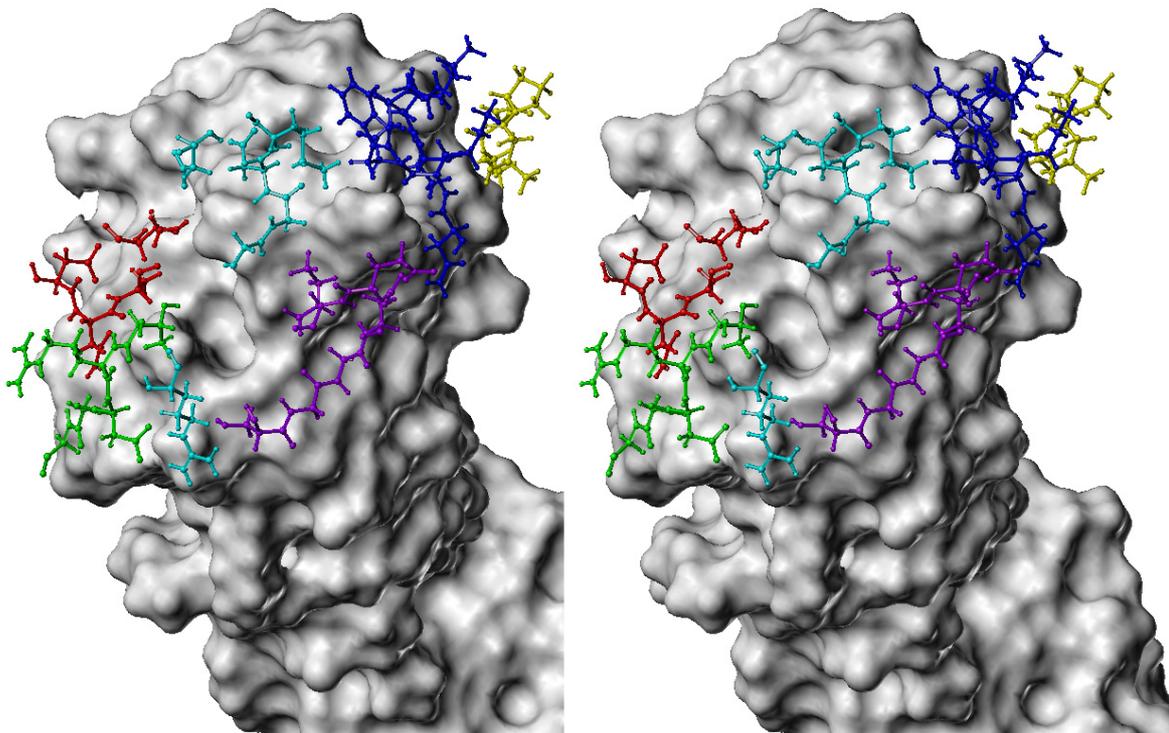


Abbildung 18 *Crossed* Stereodarstellung einer *connolly surface* von CD4 und den auf der gp120-Seite beteiligten Aminosäuren. Die Farbkodierung der Peptidsegmente ist: gelb C1, rot C2, violett C3, blau C4, grün V5 und cyan V5/C5.

Gefunden wurden die Aminosäuren Thr-123, Pro-124, Leu-125 (C1); Asp-279, Asn-280, Ala-281, Thr-283 (C2); Ser-365, Gly-366, Gly-367, Asp-368, Glu-370, Ile-371 (C3); Asn-425, Met-426, Trp-427, Gln-428, Lys-429, Val-430 (C4); Thr-455, Arg-456, Asp-457, Gly-458, Gly-459 (V5); Arg-469, Gly-472, Gly-473, Asp-474, Met-475, Asp-477 (V5/C5); Außerdem noch N-Acetylglucosamin (776), welches an Asn-276 gebunden ist. Der vorher beschrittene Weg, nur die an der Bindung beteiligten Aminosäuren auf der CD4-Seite „von Hand“ zu markieren und dann mit einem 5 Å-Radius das Volumen zu definieren, führte zum selben Ergebnis. Auf der CD4-

Seite sind die folgenden Aminosäuren an der Bindung beteiligt: Ser-23, Gln-25, His-27, Lys-29, Asn-32, Gln-33, Ile-34, Lys-35, Gln-40, Gly-41, Ser-42, Phe-43, Leu-44, Thr-45, Lys-46, Gly-47, Pro-48, Ser-49, Asn-52, Arg-59, Ser-60, Leu-61, Trp-62, Asp-63, Gln-64, Glu-85. Nach Arthos *et al.* sind die in der D1-Domäne von CD4 auftretenden CDRs als CDR1 (AS 16-27), CDR2 (AS 42-49) und CDR3 (AS 85-97) definiert. Demnach ist die gp120-Bindungsstelle eindeutig die CDR2, wobei auch eine leichte Beteiligung der anderen beiden Regionen gefunden wird¹⁵². Durch Mutationsexperimente wurde die Beteiligung von CDR2 schon in den späten achtziger Jahren belegt^{55,153,154}.

Da CD4 *in vitro* in der Lage ist, die Infektion von HIV-Isolaten diverser Stämme zu blockieren, wurde schon früher vermutet, daß der CD4-Bindungsbereich eher in den konservierten Abschnitten liegen muß und sich dabei diskontinuierlich auf die konstanten Regionen verteilt^{157,155}. Aminosäuren, die sich in Mutationstests als wichtig für die CD4-gp120-Bindung erwiesen haben, sind auch in dieser Röntgenstruktur an der Bindung beteiligt.

Im folgenden werden die Wechselwirkungen der sechs bindenden Bereiche des gp120 mit dem CD4-Molekül, wie sie sich aus der Röntgenstruktur ergeben, einzeln beschrieben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei allen Vergleichen mit der Literatur die Nummerierung des gp120 aus der Röntgenstruktur verwendet (siehe 10.1.2).

Im Bereich C1 (Thr-123, Pro-124, Leu-125) liegt eine kurze (2.8 Å, typisch¹⁵⁶ 3.0 Å) Wasserstoffbrücke unter Beteiligung der NH-Gruppe des Leu-125 und dem Sauerstoff der Carboxamid-Gruppe des Gln-64 vor. Zusätzlich liegen die Alkyl-Gruppen des Leu-125 in einem hydrophoben Bereich auf der CD4-Oberfläche. An diesem Bereich sind die drei Gruppen Leu-61-β, -γ und -δ, Gln-64-γ und Ser-60-β des CD4 Moleküls beteiligt. Außerdem gibt es van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Leu-61, Ser-60 und Gln-64 sowie eine vdW-Wechselwirkung zwischen dem am Asn-197 gebundenen N-Acetylglucosamin und dem Pro-124-γ und -δ.

In der C2-Region (Asp-279, Asn-280, Ala-281, Thr-283) bildet die Carboxyl-Funktion von Asp-279 eine ionische Wechselwirkung zur ε-Aminofunktion des Lys-29. Von einem NH der Carboxamid-Gruppe vom Asn-280 existiert eine Wasserstoffbrücke zur Carboxyl-Gruppe des Gln-33. Zusätzlich bestehen noch vdW-Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Ile-34, His-27, Gln-40, Lys-35 und Gln-85 sowie zum NAG-776.

Der Bereich C3 (Ser-365, Gly-366, Gly-367, Asp-368, Glu-370, Ile-371) ist durch eine ganze Reihe von Wechselwirkungen mit dem CD4 gekennzeichnet: Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxy-Sauerstoffen von Ser-365 und Gly-366 zu einem Carboxamid-Proton vom Asn-52 bzw. zur NH-Gruppe des Lys-46, außerdem von der

Carboxylat-Gruppe des Asp-368 zur NH-Gruppe des Leu-44. Zusätzlich existiert noch die sehr wichtige ionische Wechselwirkung von der Carboxylat-Gruppe des Asp-368 zur Guanidino-Gruppe des Lysin-59. Die Alkyl-Kette des Ile-371 liegt in einer hydrophoben Tasche auf der Proteinoberfläche, die aus den Phe-43- β , Gln-40- β und - γ und aus den Thr-45- γ Atomen gebildet wird. Die β - und γ -Protonen des Glu-370 zeigen noch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ring des Phe-43. VdW-Interaktionen bestehen zu den Aminosäuren Thr-45, Gln-47, Pro-48 und Lys-35. Die Wichtigkeit des Bereiches C3 wurde schon Ende der Achtziger und Anfang der Neunziger Jahre von mehreren Gruppen beschrieben. Kowalsky *et al.* konnten schon 1987 zeigen, daß eine Mutation der AS 365 (Ser \rightarrow Lys) im gp120, die Fähigkeit der CD4 Bindung stört¹⁵⁷. 1991 wurden bei Mutations-Untersuchungen mit einem neutralisierenden monoklonalen Antikörper (F105), der auch die gp120-CD4-Interaktion blockiert, gefunden, daß die Aminosäuren Asp-368, Pro-369 und Glu-370 essentiell für die Bindung des Antikörpers, und damit für die Bindung von CD4 sind¹⁵⁸. In anderen Untersuchungen wurden ebenfalls die Aminosäuren Asp-368 und Glu-370 als relevant für die CD4-Bindung gefunden^{159,160}. Die Röntgenstruktur bestätigt die Ergebnisse aus früheren Mutationstest sehr gut.

Der Carboxyl-Sauerstoff der Aminosäure Lys-429 des C4-Bereiches (Asn-425, Met-426, Trp-427, Gln-428, Lys-429, Val-430) bildet eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxyl-Gruppe des Ser-42. Die Alkyl-Ketten vom Val-430 liegt auf einem hydrophoben Bereich des Proteins, welcher durch einen Teil des Trp-62 Ringes und die β -Atome den Arg-59 gebildet wird. Die Trp-427- α - und Trp-427- β -Atome zeigen hydrophobe vdW-Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ring vom Phe-43. Außerdem gibt es in der C4-Region noch vdW-Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Ser-23, Ser-60 und Asp-63. Der Indol-Ring des Trp-427 liegt zwar in räumlicher Nähe zum Phe-43-Ring, jedoch liegen die Ringe so weit voneinander entfernt, daß keinerlei Wechselwirkungen zum Beispiel der beiden π -Systeme möglich erscheinen. Interessanterweise ist der C-Terminus der letzten Aminosäure des C4-Bereiches (Val-430) in räumlicher Nähe ($\sim 4 \text{ \AA}$) zum N-Terminus der ersten Aminosäure (Thr-123) des C1-Bereiches. Dieses wurde später als Grundlage für das Design eines kombinierten Peptids benutzt.

Die Wichtigkeit des Bereiches C4 für die CD4-Bindung findet sich in einer ganzen Reihe von Veröffentlichungen seit Ende der Achtziger Jahre. Lasky *et al.* konnten 1987 zeigen, daß es sich bei dem erkannten Epitop eines Antikörpers der in der Lage ist, die Interaktion zwischen CD4 und gp120 zu unterbinden um den Bereich 413 bis 455 handelt. Eine gp120-Mutante mit einer Deletion von 12 Aminosäuren (MWGEVKGAMPPI) führte zu einem kompletten Verlust an CD4-Bindungsfähigkeit. Sun *et al.* benutzten 1989 sieben mAb, die gegen die CD4-Bindungsstelle des gp120 erzeugt worden waren. Diese Antikörper waren in der Lage, die Infektionen von

CD4⁺-Zellen durch zwei verschiedene HIV-Stämme zu verhindern. Beim *mappen* des Bindungssepitop der Antikörper mit Peptiden wurde das Peptid „I15P“ (Aminosäure 423-437, IINMWQKVGKAMYAP) erhalten¹⁶¹. Cordonnier *et al.* hatten 1989 überprüft, welche Mutationen im gp120 die Bindung an CD4 und die Infizierbarkeit verschiedener Zellsorten mit diesen Mutanten beeinflusst¹⁶². Die durchgeführten Einzelmutationen zeigten zum einen, daß die Mutationen der Aminosäure Ile-420 gegen Threonin, Aminosäure Lys-421 gegen Threonin oder Arginin, Aminosäure Gln-422 gegen Threonin und Aminosäure Asn-425 gegen Tyrosin oder Histidin möglich sind, ohne daß die Bindung zu CD4 verändert wird. Als sehr kritisch hingegen erweist sich das Tryptophan an der Position 427. Während die Mutationen gegen Tyrosin und Phenylalanin zu einem 80 %igen Verlust der Bindungsfähigkeit an CD4 führen, kommt es durch die Mutationen Trp-427 gegen Serin, Glycin, Valin oder Arginin zum völligen Verlust der Bindung. Außerdem sind Mutanten Trp-427 gegen Phenylalanin oder Serin nicht mehr in der Lage, die SUP-T1- und U937-Zellen zu infizieren. Diese Viren haben ihre Infektiosität verloren. Eine Mutante mit einer 9 AS großen Deletion (RIKQFINMW) zeigte ebenfalls keine CD4-Bindung mehr und war auch nicht mehr infektiös gegenüber SUP-T1- und U937-Zellen. Bestätigt wurde die Aussage, daß Mutationen der Aminosäuren Trp-427 zu einem signifikanten Verlust an CD4-Bindungsfähigkeit führten, 1990 von Olshevsky *et al.*¹⁶⁰. 1991 konnte von Reed *et al.* gezeigt werden, daß 15er Peptide, abgeleitet aus der C4-Region zweier unterschiedlicher HIV-1 Stämme (AS 416-430 LPCRIKQFINMWQEV, Stamm: LAV, und LPCRIKQVVRTWQGV, Stamm: Z3) an HeLa T4 Zellen (CD4 auf der Oberfläche exprimiert) binden¹⁶³.

Im V5-Bereich (Thr-455, Arg-456, Asp-457, Gly-458, Gly-459) sind weder ionische Wechselwirkungen noch Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein hin erkennbar. Aber es bestehen vdW-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Asn-32, Gln-33, Ile-34, Lys-35 und Pro-48. Es konnte schon früher gezeigt werden, daß Mutationen der Aminosäuren Asp-457 zu einem Verlust an CD4-Bindungsfähigkeit führen¹⁶⁰.

Die V5/C5-Region (Arg-469, Gly-472, Gly-473, Asp-474, Met-475, Asp-477) zeigt ebenfalls ausschließlich vdW-Wechselwirkungen, und zwar zu den Aminosäuren Gln-25, Lys-35, Gln-40, Gly-41, Phe-43, Thr-45, Gly-47 und Pro-48. Die Wichtigkeit dieses Bereiches war schon 1987 entdeckt worden. Ein Fehlen des carboxyterminalen Bereiches von gp120 (AS 472-511) führte zu einem starken Verlust an Bindungsfähigkeit an CD4⁺-Zellen¹⁵⁷.

4.3 AUS DER RÖNTGENSTRUKTUR ABGELEITETE PEPTIDE

Von den auf der gp120-Seite an der Bindung beteiligten Aminosäuren wurden nun Peptide abgeleitet (siehe Abbildung 19), um ihre Bindungseigenschaften mit BIACORE und NMR zu messen.

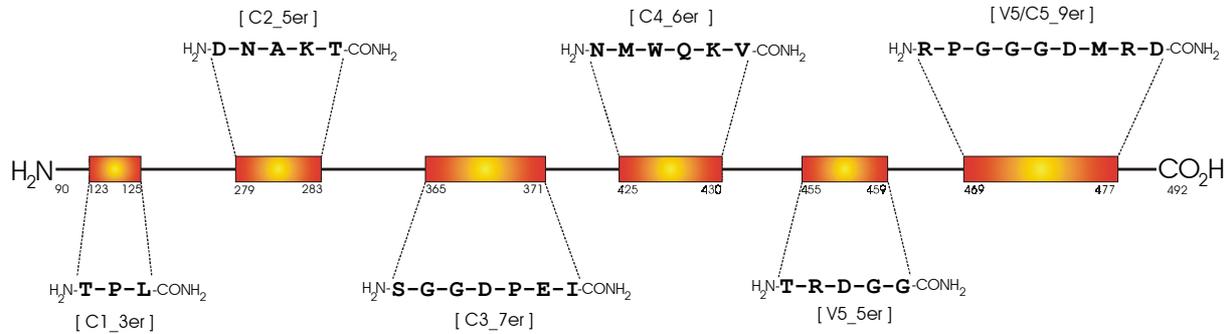


Abbildung 19 Lineare Anordnung von gp120 (HXBc2 Stamm von HIV-1) mit den an der Bindung an CD4 beteiligten Bereichen und den davon abgeleiteten Peptiden.

Bei allen Peptiden wurden die C-termini amidiert, um den Gegebenheiten innerhalb des nativen Proteins besser zu entsprechen. Die N-termini sind frei und nicht acetyliert.

Bei der Betrachtung der Bindungsepitope des gp120 war aufgefallen, daß die zwei Bereiche C1 und C4, die in der Primärsequenz deutlich voneinander getrennt sind, in der Bindungskonformation benachbart liegen (siehe Abbildung 20). Da der C-Terminus des C4-Bereiches nahe am N-Terminus des C1-Bereiches liegt, war die Idee, die beiden durch eine Aminosäure zu überbrücken.

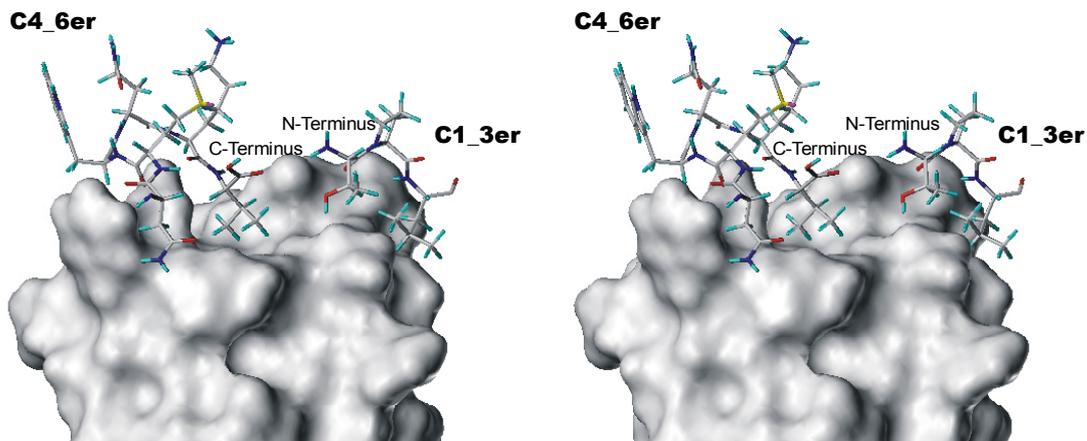


Abbildung 20 Crossed Stereodarstellung der Lage der beiden gp120 Peptide C4_6er und C1_3er, wie sie aus der Röntgenstruktur erhältlich ist, auf einer *connolly surface* des CD4. Gezeichnet sind die für das Hybrid-Peptid C4_C1_10er genutzten Enden der jeweiligen Peptide.

Als Aminosäure wurde aufgrund der hohen Beweglichkeit und der geringen Einschränkung der Konformation Glycin gewählt. Das Hybrid-Peptid wurde analog zur Benennung der anderen Peptide als C4_C1_10er bezeichnet. Im Abstand von drei Aminosäuren in Richtung N-Terminus vom Bindungsbereich C2 (DNAKT) befindet sich ein Asparagin mit einer N-Acetylglucosamingruppe (NAG-776), die in Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche steht. Vermutlich ist im nativen gp120-Molekül dort ein Zucker des Komplex-Typs gebunden. Um zu prüfen, ob der Zucker eine Rolle bei der Bindung von gp120 an CD4 spielt, wurde ein Glycopeptid synthetisiert (C2_10er_CHI) mit den fünf Aminosäuren vor der C2-Region (SVNFTDNAKT) und einem Chitobiose-Rest am Asn-276 sowie das nicht-glycosylierte Peptid C2_10er. Zusätzlich wurden noch einige reverse Peptide (Rev_C2_5er + Rev_C3_7er) als nicht bindende Liganden hergestellt. Um für die Untersuchungen auch Positiv-Kontrollen zu haben, wurden zwei kurze Peptide (PeptideT, VIP5-12) synthetisiert. PeptideT wurde aus einer gp120-Sequenz vom HIV-Stamm ARV2 abgeleitet. VIP5-12 stammt aus dem *vasoactive intestinal peptide* und zeigt eine hohe Sequenzidentität mit PeptideT. Beide hatten in BIACORE-Untersuchungen gezeigt, daß sie an immobilisiertes CD4 zu binden vermögen. Die Dissoziationskonstante für PeptideT wurde mit 20 und 56 nM angegeben⁸⁶. Von einer verkürzten (PeptideT4-8) und einer verlängerten (VIP1-12) Version dieser beiden Peptide wurde in der Literatur beschrieben, daß sie als Liganden für den CD4-Rezeptor fungieren¹⁶⁴.

4.4 PEPTIDSYNTHESEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an zwei unterschiedlichen Geräten Festphasen-Peptidsynthese durchgeführt.

Bei dem MOS 496 Ω erfolgen in einem Teflon-Block im *Batch*-Verfahren 96 Parallel-Synthesen. Der Block kann gerüttelt werden, um während der Synthesen die notwendige Durchmischung der Komponenten zu gewährleisten. Es können auch sehr kleine Ansätze von 10 μ mol mit dem Gerät durchgeführt werden. Da dieses System in der Lage ist, sehr kleine Volumina genau zu pipettieren, und das Totvolumen klein ist, können konzentrierte Lösungen zum Anknüpfen der Aminosäure benutzt werden. Daher wird das Gerät auch für Glycopeptidsynthesen benutzt, bei denen häufig sehr teure Eddukte eingesetzt werden. Üblicherweise reicht ein Überschuß an Aminosäure von Faktor 2.5 aus. Gerade bei Untersuchungen, bei denen mehrere ähnliche Peptide benötigt werden, bietet sich die Synthese mit dem Gerät an. Zum Beispiel im Rahmen eines *Alanin-Scan* - siehe Kapitel 1.6 - wo Peptide benötigt werden, die sich nur in einzelnen

Aminosäuren unterscheiden. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Optimierung eines Peptids (*positional scanning*) entsprach solch einer Fragestellung und wurde deshalb mit diesem Roboter durchgeführt. In dem einen Ansatz wurden neun Peptide, bestehend aus je zehn Aminosäuren, im 10 μmol -Ansatz synthetisiert. Die neun Peptide wurden im Rahmen dieser Arbeit für BIACORE-Untersuchungen benutzt. Nach der Aufreinigung über RP-HPLC lag die Durchschnittsausbeute der erhaltenen Peptide bei 29 %. Dabei reichten die Ausbeuten von 8.4 bis 39 %. Dieses Ergebnis kann als befriedigend angesehen werden. Es ist bekannt, daß bei der Festphasen-Peptidsynthese Probleme bei bestimmten Sequenzen auftreten können. Diese problematischen Sequenzen sind aber nur sehr schwer vorhersehbar. Insbesondere oberhalb von sechs Aminosäuren können sich Sekundärstrukturen ausbilden, die zu deutlichen Verlusten bei der Synthese führen können. Von allen Peptiden war jedoch für die BIACORE-Untersuchungen ausreichend Substanz aufgereinigt worden. Eine Optimierung der Synthesen war in diesem Fall also nicht von Interesse. Bei dem zweiten Ansatz wurden zwei Peptide, bestehend aus je elf Aminosäuren, synthetisiert. Die Ausbeuten der beiden Peptide für diese Arbeit waren 33 und 39 % und liegen in einem ähnlichen Bereich wie bei dem anderen Ansatz.

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden im *continuous-flow*-Verfahren auf einem Pioneer Peptid Synthesizer der Firma PerSeptive synthetisiert. Der große Vorteil des Verfahrens ist, daß die Reaktionslösung kontinuierlich über das Harz gepumpt wird und somit eine ideale Durchmischung gewährleistet wird. Die kleinste Ansatzgröße beträgt 50 μmol und ist um Faktor fünf größer als beim MOS 496 Ω . Bei Bedarf kann die Ansatzgröße auf bis zu 2 mmol erhöht werden. Von Nachteil ist das relativ große Totvolumen des Systems. Um ähnlich konzentrierte Lösungen zu erzeugen, muß mit einem höherem Überschuß an Aminosäure von Faktor-vier, bezogen auf aktive Gruppen am Harz, gekuppelt werden. Die synthetisierten Peptide hatten Längen von drei bis zwölf Aminosäuren. Die Ausbeuten lagen im Bereich von 32 bis 78 % und sind somit höher als bei dem MOS 496 Ω .

4.5 REINHEIT DER VERSCHIEDENEN CD4-SORTEN

Es wurde humanes CD4 von zwei verschiedenen Bezugsquellen benutzt. Das NIBSC stellte 100 μg CD4 (Baculovirus-Expression-System) in PBS Puffer pH: 7.2 zur Verfügung. Das Protein sollte ein Molekulargewicht von 55 kDa haben. Die Reinheit war mit größer 95 % angegeben. Im durchgeführten SDS-Gel ist nur eine relativ scharfe Bande bei 50 kDa sichtbar. Andere Proteinverunreinigungen sind nicht erkennbar.

Das NIH (*National Institute of Health*) lieferte mehrere Chargen von jeweils 1 mg CD4 in Histidin-Puffer, pH: 7. Dabei handelte es sich um die D1-D4-Domänen des CD4 (Aminosäure 1-369), welche in CHO-Zellen exprimiert wurden. Die Reinheit war mit größer 95 % angegeben. In einem SDS-Gel erscheint eine dicke Bande bei 54 kDa, obwohl der Hersteller einen Wert von 45 kDa angibt. Außerdem sind noch Verunreinigungen bei 31 kDa sichtbar (Abbildung 21). Beide Proteine sind ausreichend sauber, zeigen jedoch unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Gel. Dieses ist durch unterschiedliche Glycosylierungsmuster der entsprechenden Expressionssysteme erklärbar.

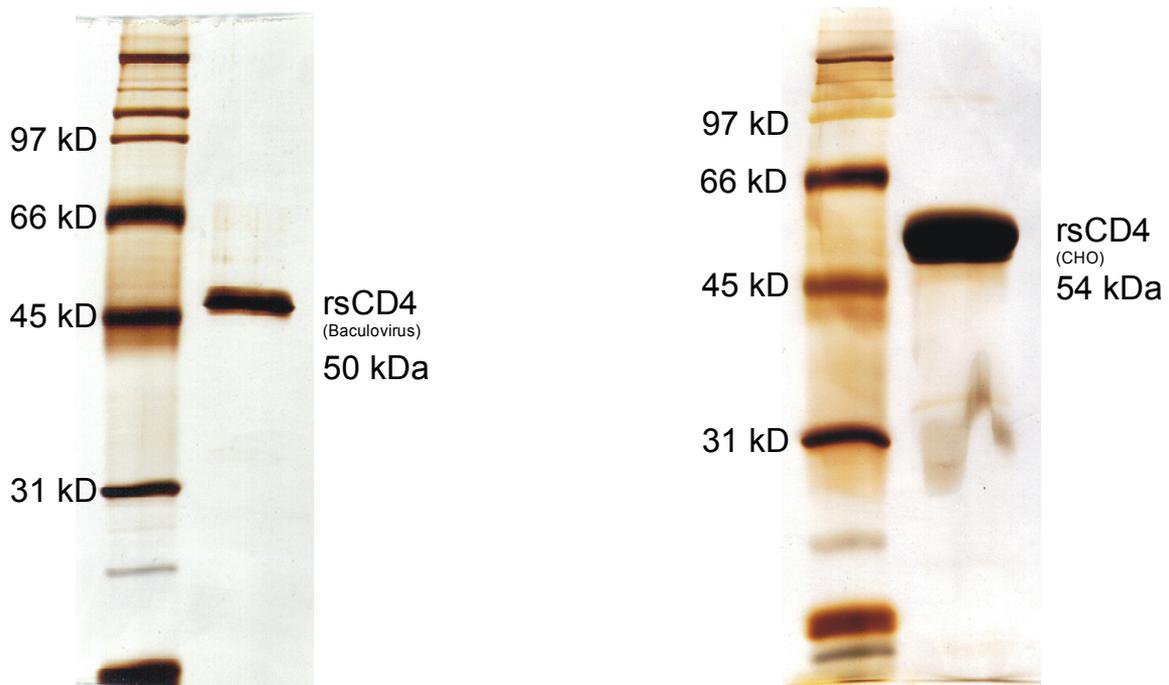


Abbildung 21 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (reduzierende Bedingungen) der beiden verwendeten CD4-Sorten. Detektiert wurde mittels Silberfärbung.

4.6 ERMITTLUNG DES PI-WERTES VOM CD4

Allgemein muß für BIACORE-Untersuchungen ein Molekül an einem Chip immobilisiert und der andere Bindungspartner in Lösung vorbeigeleitet werden. Um das CD4 an der negativ geladenen carboxymethylierten Matrix des BIACORE-Chips zu immobilisieren, ist es nötig, es durch Protonierung positiv zu laden. Durch die elektrostatische Anziehung gelangt das Protein besser in die Matrix, so daß die folgende Aminkupplung mit dem N-Terminus bzw. freien Aminen von Lysinseitenketten leichter abläuft. Hierzu mußte der pI-Wert des CD4-Moleküls

bestimmt werden. Da keine Literaturangaben gefunden wurden, erfolgte die Bestimmung über eine Vorhersage mit einem Programm *Compute pI/Mw* auf dem Proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)¹⁶⁵. Hierfür wurde die Proteinsequenz (PDBTM-ID: 1WIO) CD4 1-363 (D1-D4) benutzt, und es ergab sich ein pI von 9.40. Das in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Protein CD4 hatte noch sechs Aminosäure mehr am C-Terminus (AS 1-369). Um zu klären, ob diese sechs Aminosäuren den pI-Wert stark beeinträchtigen, wurden vergleichende Untersuchungen mit der Sequenz CD4_HUMAN (P01730) aus der Protein-Sequenz-Datenbank SWISS-PROT durchgeführt. Es ergab sich für den Bereich 1-433, also das gesamte CD4, ein pI-Wert von 9.60 und für den Bereich von 1-371 ein Wert von 9.24. Alle drei Werte liegen sehr dicht beieinander, und es kann davon ausgegangen werden, daß der pI-Wert für das vorliegende Protein CD4 um 9 liegen wird. Daraus resultierend wird als Puffer für die Anbindung des Proteins an die Matrix ein 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 4.5 benutzt.

4.7 LYSINE IM CD4

Die Kupplung des CD4 an die Matrix erfolgt mit den freien Aminen von Lysinseitenketten oder dem freien N-Terminus. Daher ist es wichtig, sich die Verteilung der Lysine im Protein anzusehen. Dazu wird die Röntgenstruktur 1WIO¹⁵¹ benutzt, die die Domänen D1-D4 umfaßt. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich verteilen sich die Lysine komplett über das gesamte Protein. Von den 363 Aminosäuren sind 39 Lysine, also 11 %. Davon liegen neun unmittelbar im gp120-Bindungsbereich von D1 und weitere neun in einem Bereich, die falls darüber verknüpft wird, die Wechselwirkung mit Molekülen wie gp120 beeinflussen würden. Bei einer statistischen Verteilung würden also ca. 50 % der CD4-Moleküle nur aufgrund der Verknüpfungsstelle inaktiv sein. Da die Dextran-Ketten, an denen sich die CD4-Moleküle befinden, relativ gut beweglich ist, wäre es auch denkbar, daß es zu einer Quervernetzung während der Aminkupplung kommt, wodurch die Anzahl an aktiven Proteinmolekülen noch weiter verringert würde. Eine Lösung dieses Problems wäre die Verknüpfung über die Zuckerreste an D3 oder D4. Hierzu müßte erst eine Aldehydfunktion im Zucker über eine Periodat-Oxidation erzeugt werden, die anschließend mit Hydraziden auf der Chip-Oberfläche reagiert¹⁶⁶. Dadurch wäre sichergestellt, daß die Verknüpfungsstelle weit entfernt von der Bindungsstelle liegt und keine Quervernetzung auftritt.

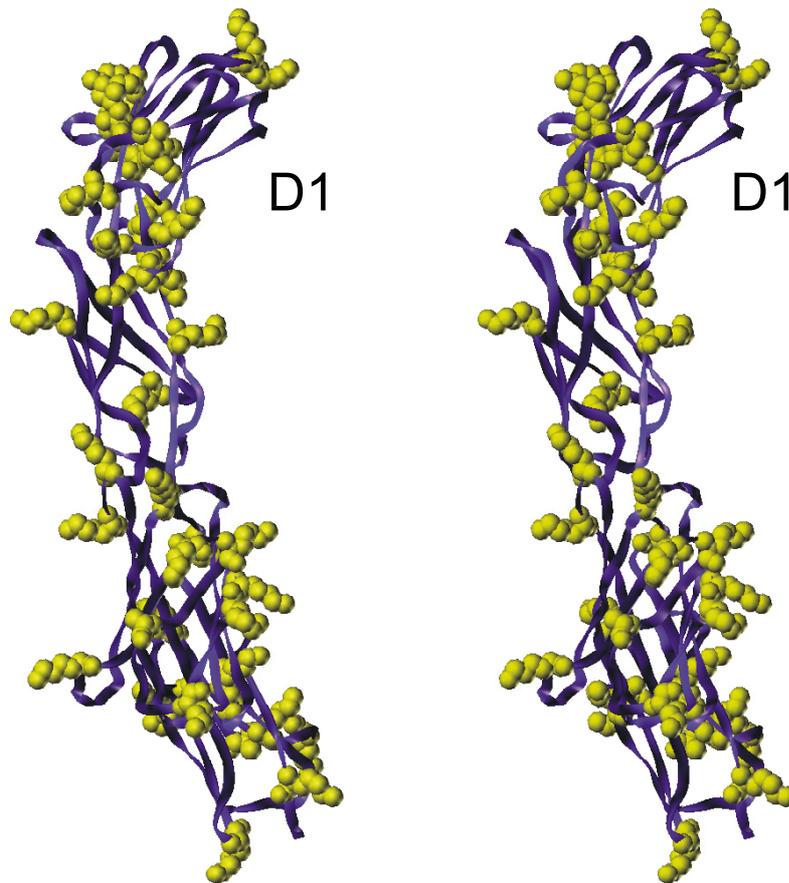


Abbildung 22

*Crossed Stereodarstellung von CD4 mit Aufsicht auf die gp120-Bindungsdomäne in D1. Das Protein-backbone ist als violettes *ribbon* dargestellt. Die Lysinseitenketten sind in gelb als *space fill* abgebildet. Von den 363 Aminosäuren sind 39 Lysine (11 %), wobei neun direkt im Bindungsbereich von gp120 liegen.*

4.8 BIACORE-BINDUNGSSTUDIEN

Da in dem Puffer, in dem das CD4 (CHO, 7.2.2) vorlag noch Histidin enthalten war, mußte die Probe vorher ultrafiltriert werden. Für die folgenden BIACORE-Untersuchungen wurde ein CM5-Chip mit Proteinen belegt. Ein CM-5 Chip wurde mit 1620 RU Anti-Myoglobin-Antikörper auf Fc2, 4115 RU CD4 (CHO) auf Fc3 und 423 RU CD4 (CHO) auf Fc4 belegt. Es ist es auf diesem Chip möglich, die nicht belegte Fc1 mit der mit dem Antikörper belegten Fc2 auf ihre Eignung als Referenzzelle hin zu untersuchen. Desweiteren wurden die beiden anderen Zellen mit unterschiedlicher Menge an CD4 belegt, um eine geeignete Belegung für die erwarteten Binder zu finden. Die in Konzentrationen von 200 μ M eingesetzten Peptidlösungen C1_3er, C2_5er, PeptideT4-8, HM7er, C4_6er, PeptideT, VIP5-12, C2_10er und VIP1-12 zeigten alle keinerlei Bindung. Das Peptid HM7er wurde von H. Möller zur Verfügung gestellt und diente bei

diesen Experimenten als Negativ-Kontrolle. In Abbildung 23 ist exemplarisch für alle nicht-bindenden Peptide das Sensorgramm von der Injektion des Peptids HM7er dargestellt. Die Kurven liegen alle auf gleichem Niveau mit einer Differenz von ~ 2 RU, wobei die höchste Kurve zur Fc1 gehört. Nur das Peptid C4_C1_10er zeigte Bindung.

Resonance

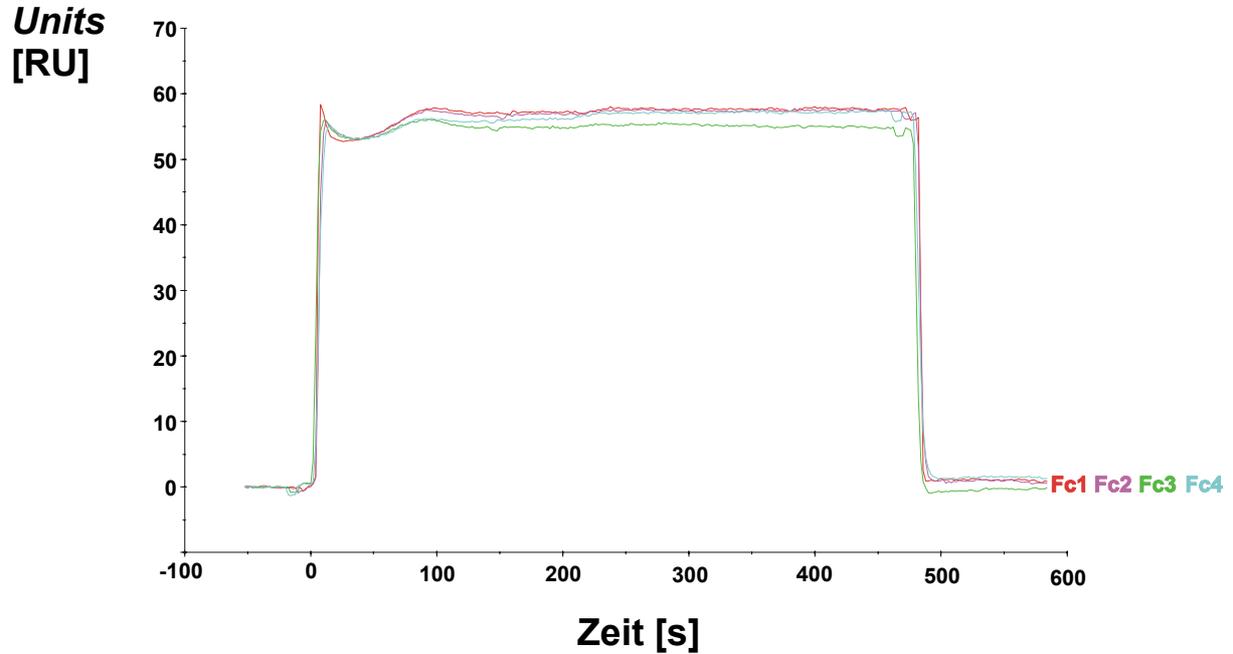


Abbildung 23 Sensorgramm von HM7er (200 μ M). Exemplarisch für die nicht-bindenden Peptide. Fc3 mit 4115 RU und Fc4 mit 423 RU CD4. Fc1 ist nicht belegt, Fc2 mit 1619 RU Anti-Myoglobin-Antikörper.

Resonance

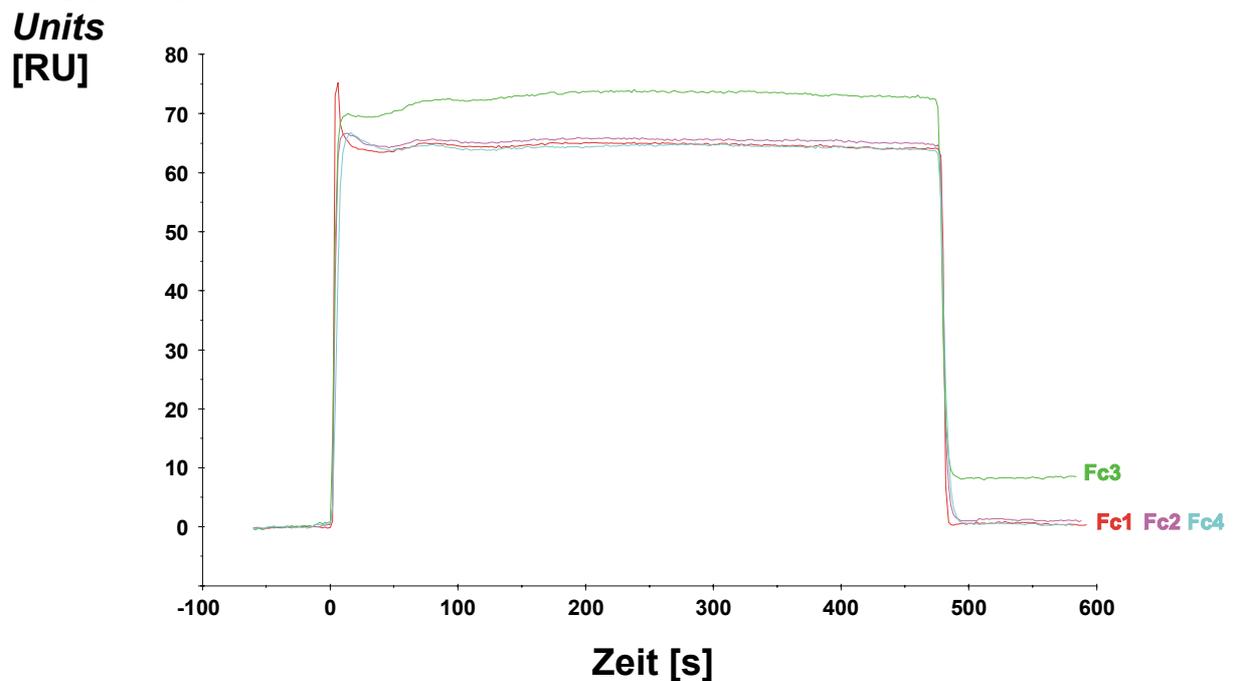


Abbildung 24 Sensorgramm der Injektion von einer 200 μ M C4_C1_10er-Lösung. Belegung wie bei Abbildung 23.

Man erkennt in der Abbildung 24, daß die mit dem CD4 belegte Fc3 eindeutig höher liegt als die drei anderen. Die nicht belegte Fc1 und die mit dem AB belegte Fc2 sind fast identisch, so daß auch eine Referenzierung über beide möglich ist. Die Differenz von Fc3-Fc1 ist in Abbildung 25 dargestellt.

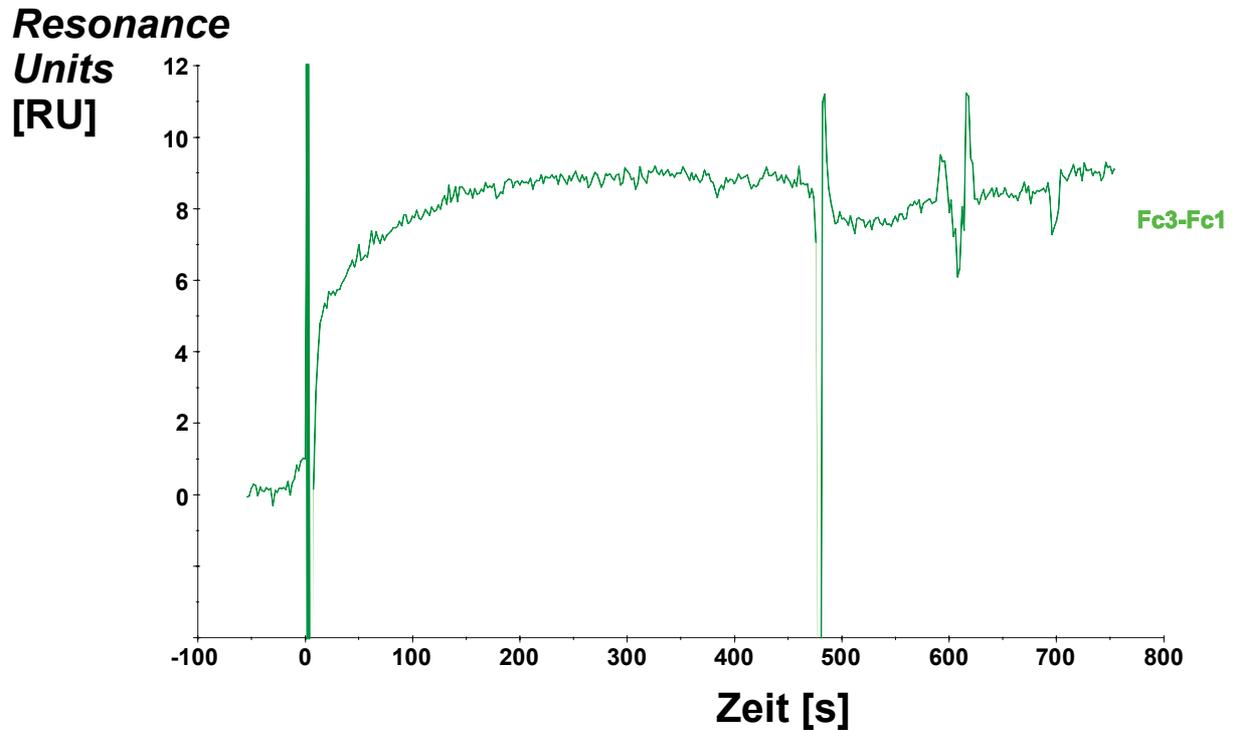


Abbildung 25 Sensorgramm der Injektion von einer 200 µM C4_C1_10er-Lösung als Differenz der Sensorgramme von Fc3 und Fc1. Belegung wie bei Abbildung 23.

Die Differenz zwischen den beiden Zellen beträgt 9 RU. Außerdem ist die Dissoziationsrate sehr langsam ist. Bei der Fc4 mit der 1/10 so niedrigen Belegung an CD4 hätte ein 1/10 so hoher Wert von knapp 1 RU sichtbar sein müssen. Die Erfahrung zeigt aber, daß solch kleine Differenzen unter normalen Umständen nicht detektierbar sind. Puffer-Injektionen allein zeigen teilweise schon größere Differenzen. Direkt im Anschluß an die Peptid-Injektionen wurde als Positiv-Kontrolle eine Injektion mit gp120 (KI 40 µL, 1 µM) durchgeführt. Während die Kurven für die Fc1 und Fc2 als Referenzzellen kaum unterschiedlich verlaufen, zeigt die Fc4 eine niedrige *Response* entsprechend der niedrigen Belegung, während die Fc3 eine Bindungskurve mit hohen RU-Werten liefert (Abbildung 26).

Resonance

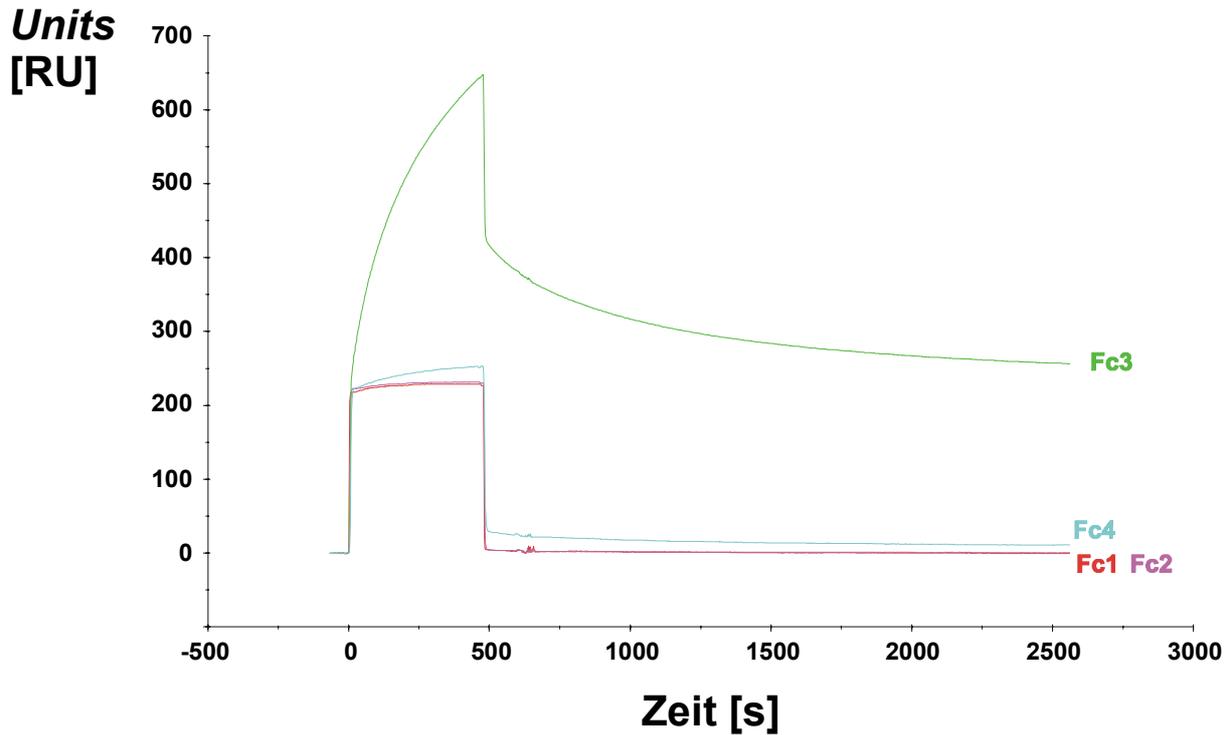


Abbildung 26 Sensorgramm einer gp120 Injektion (Konzentration: 1 μM). Belegung wie bei Abbildung 23.

Somit ist eindeutig belegt, daß sich das an die Dextranmatrix gebunde CD4 und das gelieferte gp120 in einem funktionsfähigen Zustand befinden.

Bei der Injektion lag die Ligand-Konzentration (gp120: 1 μM) um den Faktor 50 über dem K_D -Wert des Systems CD4-gp120. Daher muß von einer Sättigung von 98 % ausgegangen werden. Die erwartete theoretische Sättigungs-Antwort liegt bei 10973 RU bei einem 1:1 Komplex (Gleichung 9). (Die angenommene Stöchiometrie wurde durch Gradienten-Sedimentation¹⁶⁷ bzw. MALDI-TOF¹⁶⁸ belegt.)

$$\text{Sättigungs-Antwort} = \frac{\text{Molmasse Analyt (CD4)}}{\text{Molmasse Ligand (gp120)}} \cdot \text{Ligand Bindigkeit} \cdot \text{CD4 [RU]}$$

Gleichung 9

Wie in Abbildung 26 ersichtlich ist, noch keine Sättigung eingetreten und die erreichten 480 RU sind nicht mit der theoretischen Sättigungs-Antwort vergleichbar. Nimmt man die Assoziationskurve und passt eine 4-Parameter Gleichung an, so ergibt sich ein Sättigungs-Wert von 894 RU. Aber auch dieser ist noch um Faktor zwölf zu klein im Vergleich mit der theoretischen Antwort. Demnach liegen noch ca. 8 % der CD4-Moleküle aktiv an der Matrix

gebunden vor. Interessant in diesem Kontext ist eine Untersuchung der Bestimmung der aktiven Konzentration von Proteinen über BIACORE durch Zeder-Lutz *et al.*¹⁶⁹. Dabei wurde CD4 und ein monoklonaler Antikörper gegen gp120 benutzt, um die aktive gp120-Konzentration zu messen und gp120 und anti-CD4 mAb L120 zur Bestimmung der aktiven CD4-Konzentration. Die aktive CD4-Konzentration, gemessen mit einem mit gp120 belegten Chip, lag bei 1 % für das CD4 von INTRACELL, 14 % für das CD4 vom NIBSC (7.2.1) und 30 % für das CD4 vom NIH (7.2.2). Für die aktive Konzentration des gp120 ergab sich ein Wert von 1.7 % mit einem CD4 belegten Chip bzw. ~ 3 % für Chips mit zwei verschiedenen Anti-gp120 Antikörper belegten Chips. Mit diesen Informationen ist es möglich, die recht niedrigen RU-Werte zu erklären. Jedoch sind die genauen aktiven Konzentrationen der beiden Proteine in dieser Arbeit nicht bekannt. Auch Autiero *et al.* hatten bei ihren Untersuchungen der Bindungseigenschaften von gp17 (K_D im nanomolaren Bereich), einem Glycoprotein aus Seminalplasma, an CD4 unterschiedlicher Hersteller (aber gleichem Expression-System (CHO)) deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten festgestellt¹⁷⁰.

Anschließend wurde noch mit dem gleichen Chip eine gp120 Verdünnungsreihe gemessen. Ausgewertet wurde die Differenz von Fc3 und Fc1. Wie in Tabelle 2 ersichtlich sind die χ^2 -Werte des Fits in einem „vernünftigen“ Bereich. Laut *BLAevaluation Software Handbook* sind Fits mit einem χ^2 -Wert kleiner als 10 als vernünftig anzusehen¹⁷¹. Daraus ergibt sich ein K_D -Wert von 152 nM.

Tabelle 2 Auswertung der gp120-Verdünnungsreihe.

c [μ M]	k_a [$\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [nM]	χ^2
1	3600	$5.23 \cdot 10^{-4}$	145	2.38
0.6	3550	$6.36 \cdot 10^{-4}$	179	0.113
0.3	4590	$7.47 \cdot 10^{-4}$	163	0.027
0.1	6170	$7.45 \cdot 10^{-4}$	121	0.0396
Mittelwert	4477.5	$6.63 \cdot 10^{-4}$	152	0.640
Standardabweichung	1061.54	$9.23 \cdot 10^{-5}$	21.56	1.01

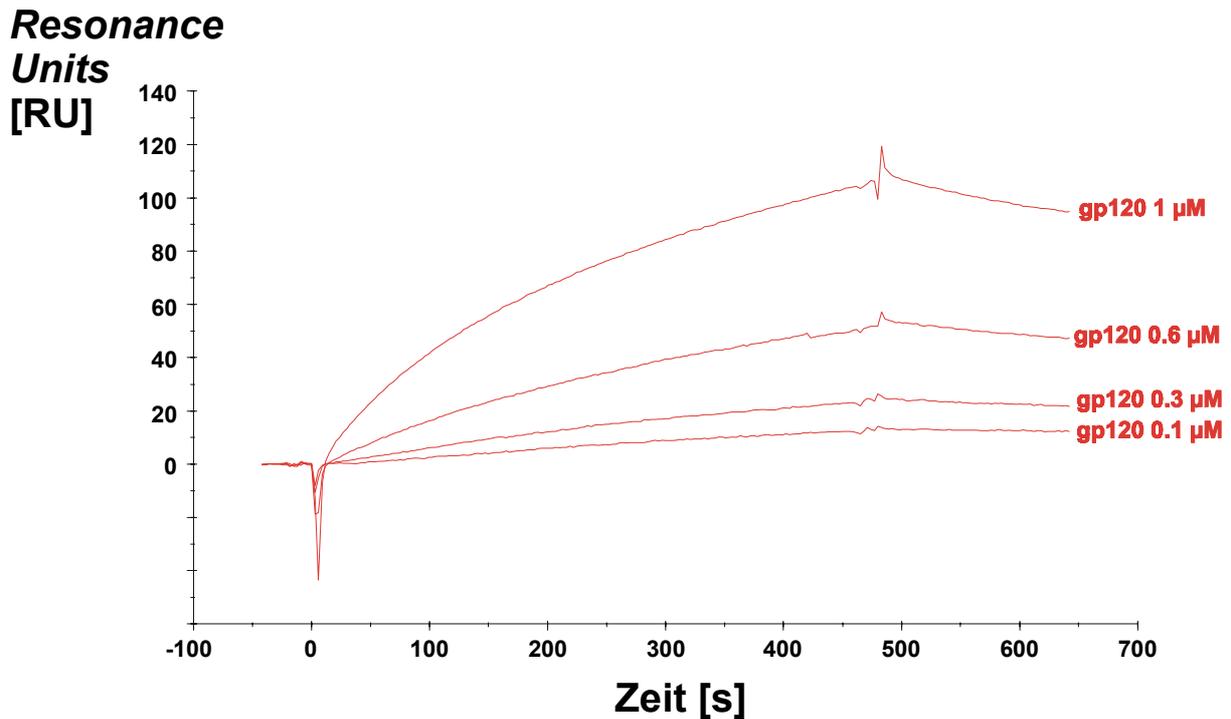


Abbildung 27 Gp120-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 1, 0.6, 0.3 und 0.1 μM . Abgebildet ist die Differenz von Fc3 und Fc1.

Auf einem weiterem Chip war auf den drei Flußzellen Fc2, Fc3 und Fc4 CD4 (CHO) und auf Fc1 nichts immobilisiert. Der Chip mit dem anti-Myoglobin-Antikörper hatte gezeigt, daß die Referenzierung über eine nicht belegte Zelle (Fc1) oder über eine mit anti-Myoglobin-Antikörper belegte Zelle möglich ist. Daher wurde eine nicht belegte Zelle als Referenzzelle (Fc1) gewählt und im folgenden die Differenz zwischen Fc2 und Fc1 ausgewertet. Die Flußzellen Fc2 und Fc3 hatten gleiches Verhalten gezeigt. Die Fc4 zeigte durch die niedrigere Belegung auch immer eine niedrigere RU-Antwort. Die Auswertung der Konzentrationsreihe mit dem *steady-state-affinity*-Ansatz zeigt die folgende Abbildung. Dazu werden die ermittelten RU-Werte gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen und mit dem Programm BIAevaluation ausgewertet (Gleichung 8).

Resonance

Units
[RU]

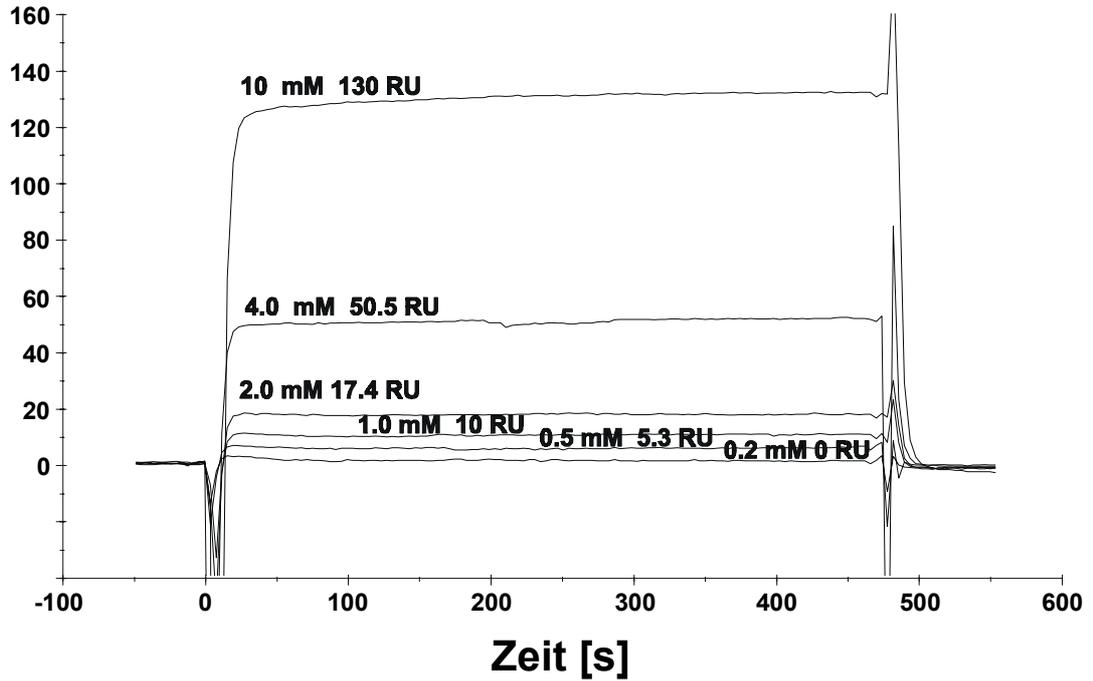


Abbildung 28

Peptid C4_C1_10er Verdünnungsreihe. Konzentrationen 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 und 10 mM. Abgebildet sind die Differenzen zwischen Fc2 und der Referenzzelle Fc1.

Resonance

Units
[RU]

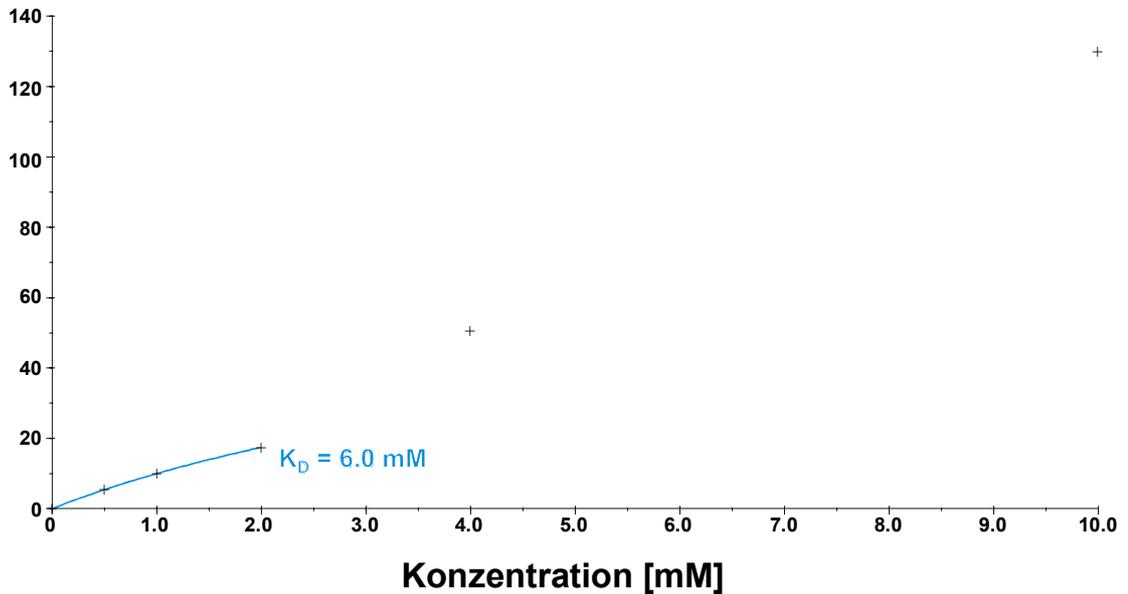


Abbildung 29

Ermittlung des K_D -Wertes vom Peptid C4_C1_10er über den *steady-state-affinity*-Ansatz. Aufgetragen ist die jeweilige RU-Antwort gegen die Konzentration. Die Gleichung zur Bestimmung von K_D wurden nur auf die ersten drei Konzentrationen angepaßt.

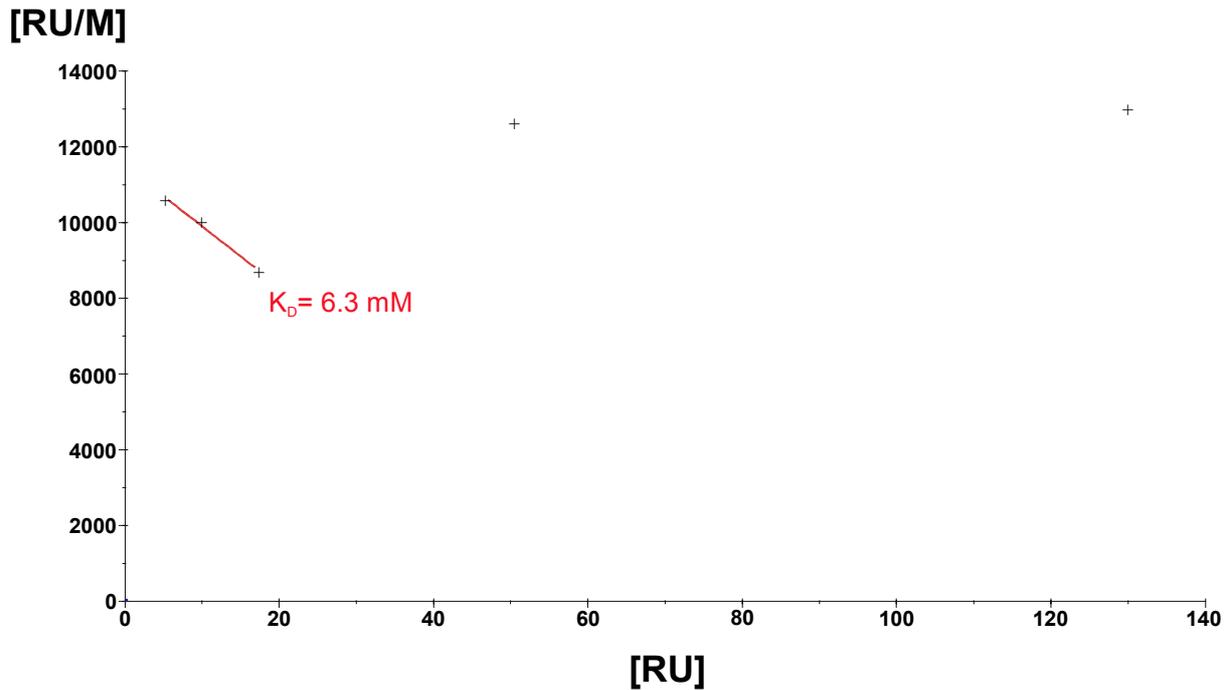


Abbildung 30 Scatchard-Auftragung der Daten aus Abbildung 29. Es ergibt sich ein K_D -Wert von 6.3 mM.

Bei dem Fit wurden nur die niedrigsten drei Konzentrationen benutzt, um den K_D -Wert zu ermitteln. Die in Abbildung 30 gezeigte Scatchard-Auftragung zeigt die Linearität der Datenpunkte in diesem Bereich, eine Voraussetzung, um sinnvoll auswerten zu können.

Bei den höheren Konzentrationen kommen vermutlich weitere Bindungsprozesse dazu, die eher im schwach-affinen K_D -Bereich liegen. Ob es sich dabei um eine nicht-spezifische Wechselwirkung des Peptids mit der Proteinoberfläche handelt oder um eine spezifische Wechselwirkung, die nun schwächer ist, kann nicht geklärt werden. Diese schwach-affinen Bindungsstellen könnten als wichtiger Schritt für die Bindung fungieren. Da Peptide in Lösung normalerweise nur wenig strukturiert vorliegen, ist es gut möglich, daß durch die schwache Bindung das Peptid am Protein in seiner Konformation verändert wird oder in Richtung der Bindungsstelle dirigiert wird. Anschließend erfolgt die millimolaren Bindung des Peptids an das Protein.

Zusätzlich wurden noch weitere Substanzlösungen mit diesem Chip gemessen (Tabelle 3).

Tabelle 3 Auf dem zweiten Chip eingesetzte Substanzlösungen

Peptid	Konzentration	Resonance Units (Fc2 – Fc1)	Bemerkung
VIP5-12	1 mM	20 RU	Bindung
Lactose	10 mM	0 RU	Keine Bindung.
HM7er	0.5 mM	0 RU	Keine Bindung.
HM7er	1.0 mM	0 RU	Keine Bindung.
VIP1-12	1.0 mM	--	Auf der Referenzzelle sind während der Injektion ca. 700 RU geblieben.

Das Peptid VIP5-12 zeigte dort mit 20 RU eine ähnliche Antwort wie C4_C1_10er. Als Negativ-Proben wurde zum einen hochkonzentrierte Lactoselösung (10 mM) benutzt und zum anderen das Peptid HM7er von H. Möller. Beide Proben zeigten keinerlei Wechselwirkung mit den Chip-Oberflächen. Die Sensorgramme zeigten einen Verlauf wie in Abbildung 23. Bei der Injektion des VIP1-12 blieben ca. 700 RU auf der Referenzzelle haften. Vermutlich durch kolloidale Partikel, die aufgrund der Reihenfolge des Durchströmens beim BIACORE (Fc1→Fc2→Fc3→Fc4) alle auf der ersten Flußzelle geblieben sind. Zur Reinigung wurde über 17 Stunden mit Puffer gespült. Danach waren die vier Flußzellen wieder auf gleichem Niveau wie vorher. Zur Aktivitätskontrolle wurde 100 nM gp120 eingesetzt. Die Kinetik der Wechselwirkung entsprach den Werten der ersten Messungen mit einem K_D von ~ 150 nM. Anschließend wurden noch die in Tabelle 4 aufgeführten Peptidlösungen untersucht.

Tabelle 4 Auf dem zweiten Chip gemessene Peptidlösungen.

Peptid	Konzentration	Resonance Units (Fc2 – Fc1)	Bemerkung
C1_3er	2 mM	4 RU	Bindung
C2_5er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
HM7er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
PeptidT4-8	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
C4_C1_10er	1 mM	24 RU	Bindung
PeptideT	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
C2_10er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
C2_10erCHI	20 μ M	0 RU	Keine Bindung.
VIP5-12	1 mM	15 RU	Bindung

Neben dem C4_C1_10er Peptid zeigt das Peptid C1_3er sowie das Peptid VIP5-12 einen Bindungs-Effekt. Zur Kontrolle der Aktivität wurde abermals 100 nM gp120 eingesetzt und die Aktivität bestätigt. Über Nacht wurde mit einem *Flow* von 5 μ L/min gespült, wobei die Basislinien nur um ± 5 RU schwankten. Zur Bestätigung wurden nochmals die Peptidlösungen vermessen.

Tabelle 5 Auf dem zweiten Chip gemessene Peptidlösungen.

Peptid	Konzentration	Resonance Units (Fc2 – Fc1)	Bemerkung
C4_C1_10er	1 mM	23 RU	Bindung
VIP5-12	1 mM	13 RU	Bindung
VIP5-12	2 mM	30 RU	Bindung
C1_3er	2 mM	4 RU	Bindung

Die letzten Ergebnisse hatten gezeigt, daß das Peptid C4_C1_10er eine relativ hohe Antwort auf den mit CD4 belegten Zellen erzeugt. Zur Überprüfung, ob es möglich ist, gebundenes gp120 aus der Bindungstasche mit diesem Peptid zu verdrängen, wurde ein Verdrängungs-Experiment

durchgeführt. Hierzu wurde direkt im Anschluß an eine 200 µM gp120-Injektion eine Injektion einer 10 mM Lösung von C4_C1_10er durchgeführt. Wie in Abbildung 31 ersichtlich, ist der Verlauf der Dissoziation nach der gp120-Injektion durch die Injektion des C4_C1_10er zwar unterbrochen und zeigt während der Injektion einen Wert von über 100 RU, zeigt danach aber einen erwarteten Verlauf. Die gp120-Moleküle werden unter diesen Bedingungen folglich nicht durch das Peptid verdrängt, sondern entsprechend ihres k_d vom CD4 gelöst und mit dem Laufpuffer entfernt.

Resonance

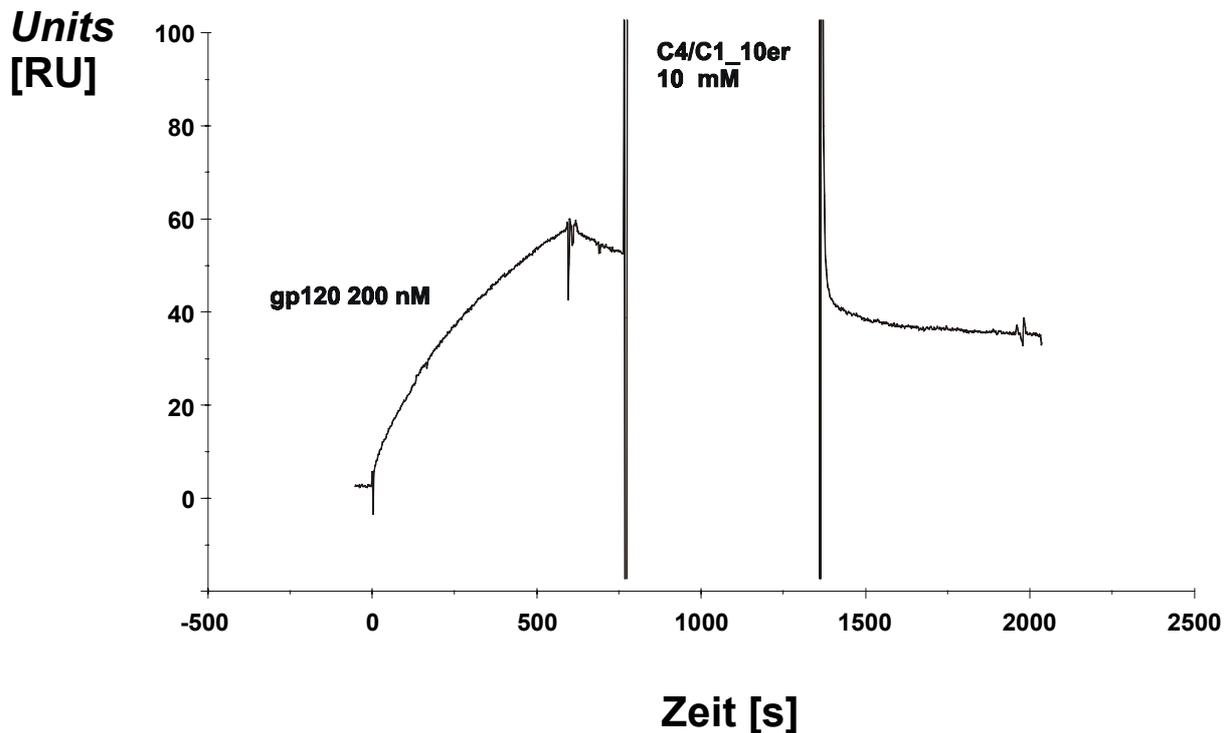


Abbildung 31 Verdrängungsexperiment gp120 mit C4_C1_10er. In die Dissoziations-Zeit einer Injektion mit einer 200 nM gp120-Lösung wurde eine Injektion einer 10 mM Lösung des Peptids C4_C1_10er gesetzt.

Anschließend wurden weitere Peptide hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität untersucht (Tabelle 6).

Tabelle 6 Auf dem zweiten Chip gemessene Peptidlösungen.

Peptid	Konzentration	Resonance Units (Fc2 – Fc1)	Bemerkung
HM7er	1 mM	0 RU	Negativ-Kontrolle.
T4-8	1 mM	0 RU	Negativ-Kontrolle.
Lactose	1 mM	0 RU	Negativ-Kontrolle.
V5_5er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
Rev_C3_7er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
C2_7er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
V5/C5_9er	1 mM	0 RU	Keine Bindung.
C2_10er_NAC	1 mM	0 RU	Keine Bindung.

4.9 VARIATION DES PEPTIDS C4_C1_10ER

Die BIACORE-Untersuchungen führten zu einem an CD4 bindendes Peptid. Dieses aus zwei Bereichen fusionierte Peptid C4_C1_10er sollte nun durch rationales Design in einem kombinatorischen Ansatz variiert werden, um so ein besser bindendes Peptid zu generieren (*positional scanning*). In Tabelle 7 auf Seite 69 sind die in diesem Kapitel entwickelten Peptide mit Bezeichnung und Sequenz aufgeführt.

Da noch keine genauen Informationen über die Bindungsepitope zur Verfügung standen, wurden als Grundlage die Informationen aus der Röntgenstruktur benutzt. Dieses waren die einzigen Anhaltspunkte, um durch Austausch von einzelnen Aminosäuren eine Verbesserung der Bindung zu erreichen. Die Aminosäure Asn-425 zeigte in der Kristallstruktur zwar eine räumliche Nähe zur Proteinoberfläche, jedoch keine weiteren Interaktions-möglichkeiten, wie Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen. Würde man das Asn-425 durch Glutamat ersetzen, so wäre eine Wasserstoffbrücke mit dem Arg-59 des CD4 möglich. Die weitere Methylengruppe bringt die erforderliche Länge, um die Guanidinogruppe auf der Proteinoberfläche zu erreichen. Dadurch wäre eine verstärkte Bindung denkbar (siehe Abbildung 32). Bezeichnet wird dieses Peptid mit C4_C1_10er_N1E.

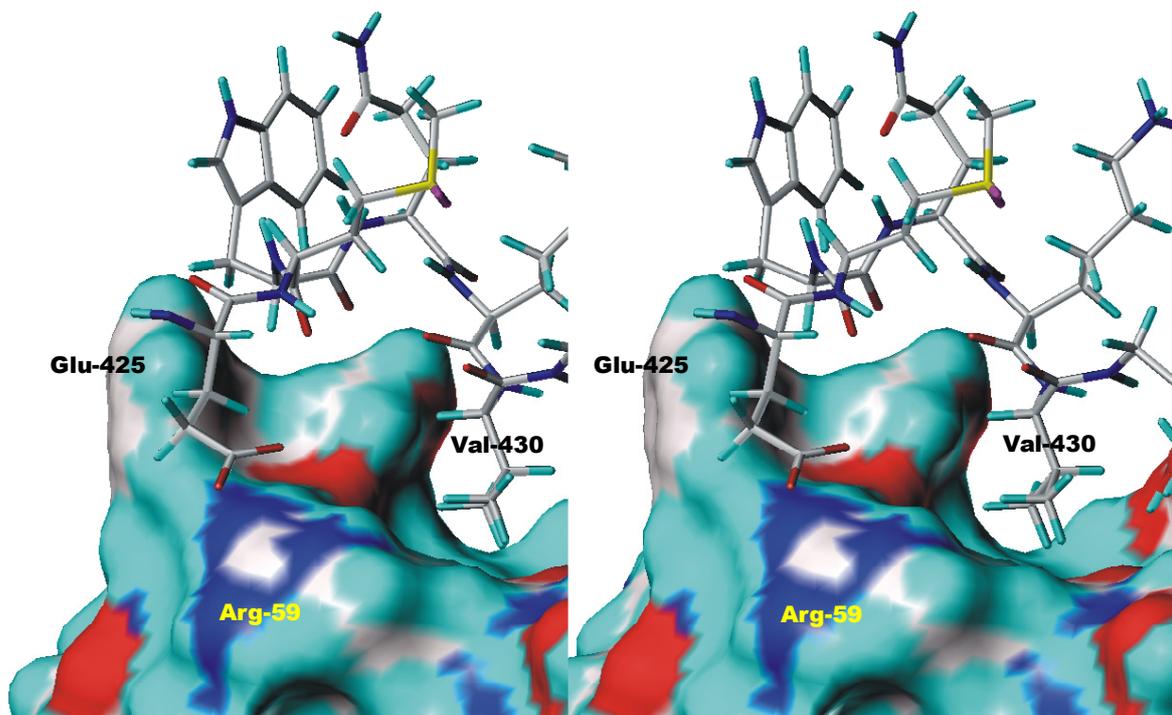


Abbildung 32 *Crossed Stereodarstellung einer möglichen Wechselwirkung zwischen der Guanidinogruppe des Arg-59 vom CD4 und der Carboxylat-Gruppe vom Glu-425. Das CD4 ist als connolly surface dargestellt und nach Atomfarben eingefärbt.*

Die Seitenkette des Met-426 zeigt in der Röntgenstruktur keinerlei Beteiligung an der Bindung zum Protein. Sie steht weggerichtet vom Peptid-*backbone* in die normalerweise wäßrige Umgebung (siehe Abbildung 33). Eine Ersetzung des Met-426 gegen eine hydrophile Aminosäure, wie z.B. Serin, sollte die Bindung nicht beeinflussen, die Hydroxygruppe kann jedoch eher mit dem umgebenden Wasser wechselwirken. Das Trp-427 liegt in der Kristallstruktur in enger Nähe zum Phe-43 des CD4. Jedoch ragt der Indol-Ring in die Umgebung, ohne nennenswerte Kontakte zum Aromaten aufzuweisen. Dies erscheint nicht so sinnvoll, und es kann angenommen werden, daß sich der Tryptophan-Ring in Lösung eher in der Nähe des Phenylalanin-Ringes aufhält und sich so z.B. π - π -Wechselwirkungen ausbilden können. Durch eine Mutation des Trp-427 gegen ein Tyrosin könnte eine verstärkte Interaktion der beiden Benzolringe erreicht werden. Aufgrund der Wichtigkeit des Trp-427 für die Bindungsfähigkeit, wäre es auch denkbar, daß eine Veränderung dieser Aminosäure zu einer Verringerung der Bindung führt.

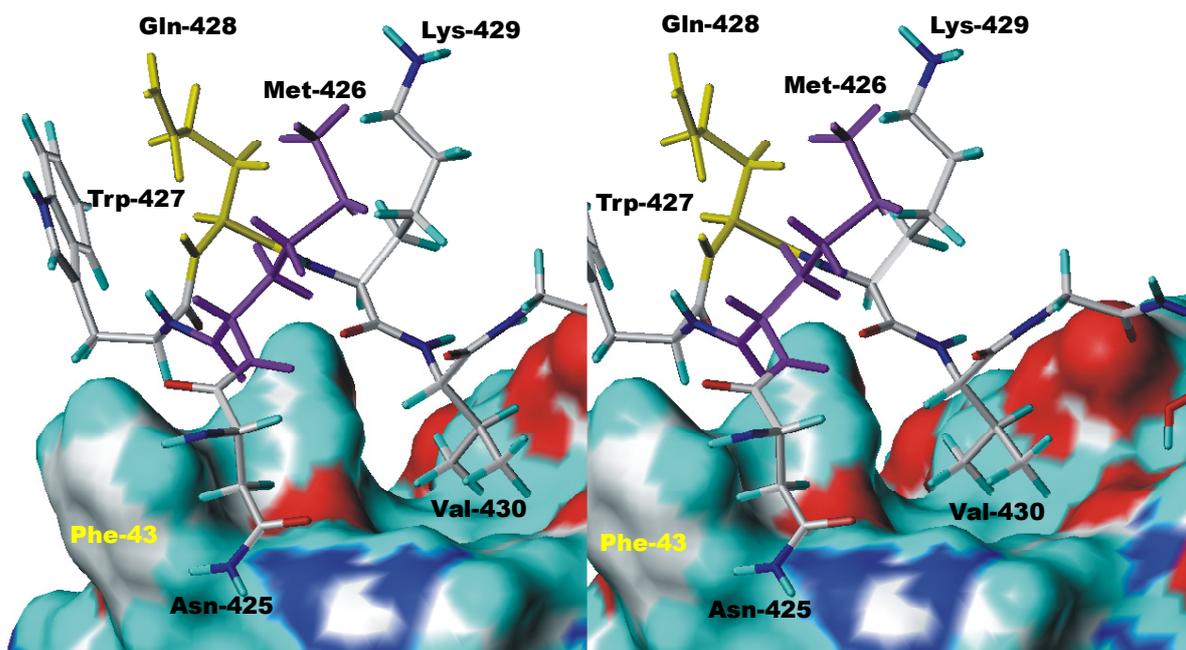


Abbildung 33 *Crossed Stereodarstellung* des Bereiches Asn-425 bis Val-430 vom Peptid C4_C1_10er. Das CD4 ist als *connolly surface* dargestellt und nach Atomfarben eingefärbt. Das Gln-428 ist gelb eingefärbt, das Met-426 ist lila eingefärbt.

Für das Gln-428 (gelb eingefärbt) gilt die analoge Argumentation wie für das Met-426. Auch hier könnte ein Austausch gegen Serin eine interessante Veränderung bringen. Die zu synthetisierenden Peptide bekommen die Bezeichnungen C4_C1_10er_M2S, C4_C1_10er_W3Y und C4_C1_10er_Q4S.

Das Lys-429 ragt in der Röntgenstruktur von der CD4-Oberfläche weg. (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34) Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß sich eine Wasserstoffbrücke zu dem Asp-63 auf der CD4-Oberfläche ausbildet. Würde man das Lysin gegen das längere Arginin tauschen, so wäre diese Wechselwirkung noch erleichtert und man könnte eine starke Bindung erwarten. Dies Peptid bekommt die Bezeichnung C4_C1_10er_K5R.

Das Val-430 liegt in einer hydrophoben Tasche des Proteins (siehe Abbildung 32, Abbildung 33 und Abbildung 34). Dieser hydrophobe Bereich sollte groß genug sein, um auch das um eine Methylengruppe längere Isoleucin aufzunehmen. Dadurch wären mehr hydrophobe Wechselwirkungen möglich und unter Umständen eine bessere Bindung des Peptids erreicht. Dieses Peptid wird als C4_C1_10er_V6I bezeichnet.

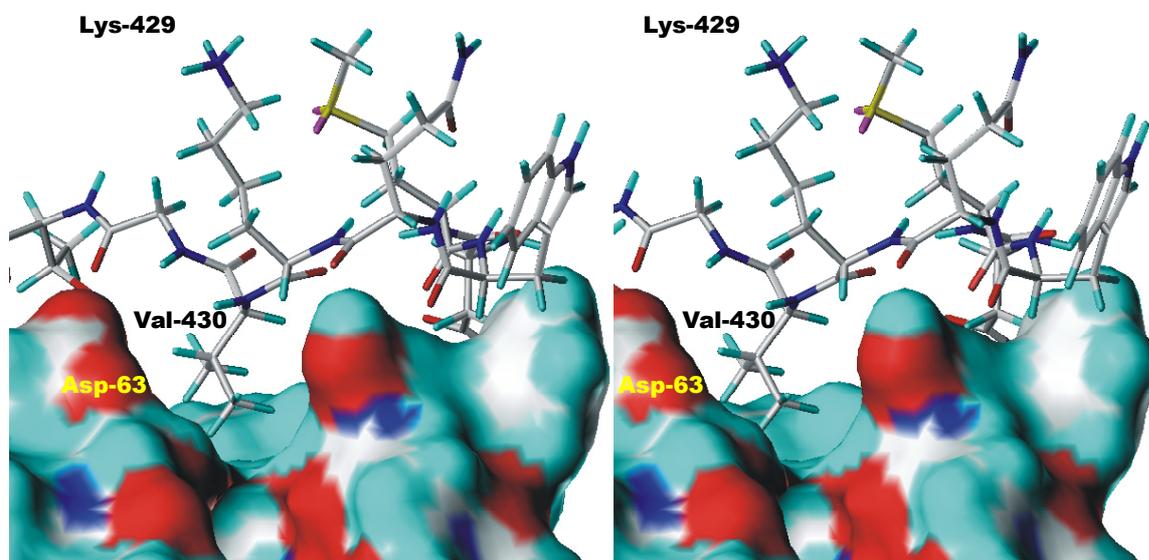


Abbildung 34 *Crossed* Stereodarstellung einer möglichen Wechselwirkung zwischen der Carboxylat-Gruppe des Asp-63 vom CD4 und der Aminogruppe vom Lys-429 vom Peptid C4_C1_10er. Eine Mutation des Lysins gegen ein Arginin könnte aufgrund der Länge des Arginins Vorteile bei der Ausbildung der Wasserstoffbrücke haben. Das CD4 ist als *connolly surface* dargestellt und nach Atomfarben eingefärbt.

Das Glycin-431 besitzt eine hohe Beweglichkeit, und ein großer Bereich an Torsionswinkeln ist erlaubt. Durch ein Alanin an dieser Position wäre diese Beweglichkeit schon deutlich eingeschränkt. Noch weiter wäre sie durch ein Prolin begrenzt. Diese rigidere Struktur könnte vielleicht auf Grund von Vorteilen bei der Bindungsentropie besser binden. Die resultierenden Peptide werden C4_C1_10er_G7A und C4_C1_10er_G7P genannt.

In der Sequenz liegt vor der letzten in die Bindung involvierten Aminosäure, dem Asn-425, ein Isoleucin ohne Wechselwirkung mit dem Protein. Jedoch wäre es denkbar, daß eine aromatische Aminosäure an dieser Position im Peptid (siehe Abbildung 35) eine π - π -Wechselwirkung mit

dem Phe-43 des CD4 eingeht und die Bindung des Peptids dadurch verstärkt wird. Dies Peptid wird im folgenden C4_C1_11er_I(-1)F genannt.

Zum Vergleich wurde auch das nicht mutierte C4_C1_11er und ein als Rev_C4_C1_10er bezeichnetes Peptid mit umgedrehter Sequenz zum Referenzpeptid synthetisiert.

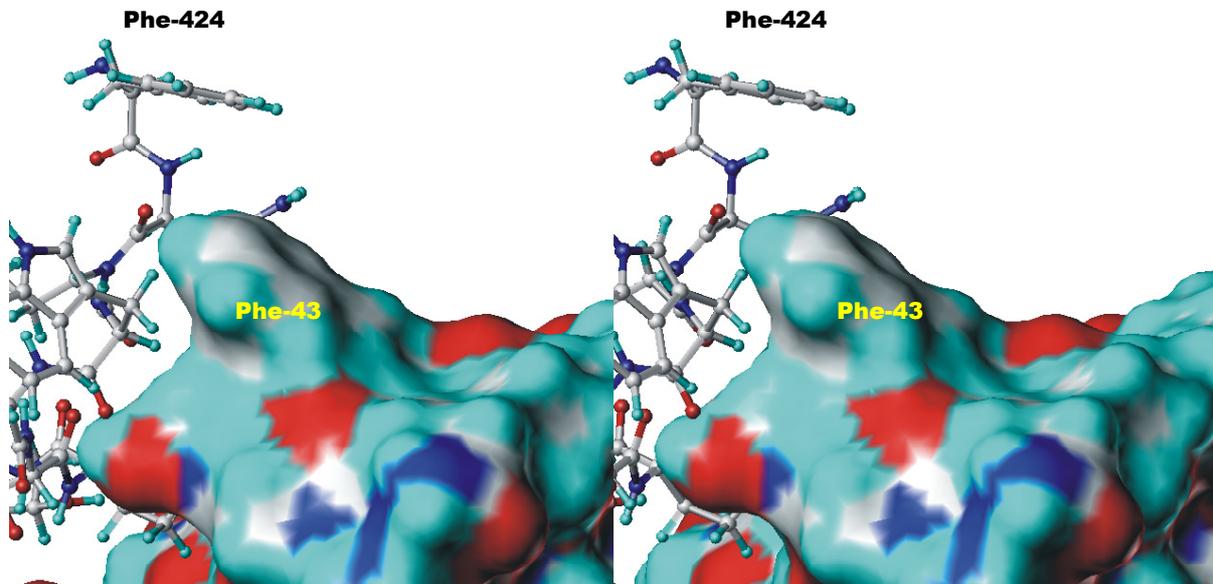


Abbildung 35 *Crossed Stereodarstellung einer möglichen Wechselwirkung zwischen dem Benzolring des Phe-43 vom CD4 und dem Benzolring vom Phe-424 vom Peptid C4_C1_10er. Das CD4 ist als *connolly surface* dargestellt und nach Atomfarben eingefärbt.*

Zur Überprüfung, ob bei den Peptiden, die keine Bindung bei den bis jetzt durchgeführten Messungen gezeigt haben, bei höheren Konzentrationen Bindung auftritt, wurden Verdünnungsreihen bis zu einer Konzentration von 10 mM durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei dem Peptid HM7er ab ~ 5 mM eine zusätzliche Wechselwirkung auftritt. Außerdem wurden die optimierten Peptide im Vergleich zum Peptid C4_C1_10er gemessen. Da die Peptide unterschiedliche Molmassen haben, werden die erhaltenen RU-Werte auf eine Molmasse von 1000 g/mol normiert und hierfür die Einheit RU* eingeführt. Nur die RU*-Werte lassen sich sinnvoll vergleichen, da sie unabhängig von der Molmasse sind.

Tabelle 7 BIACORE-Ergebnisse des Bindungsverhaltens von Varianten des Leitpeptids C4_C1_10er. RU*: Auf 1000 g/mol normierte *Resonance Units*. In Rot sind die gegenüber dem Leitpeptid veränderten Aminosäuren kenntlich gemacht. n.g. = nicht gelöst. Peptidkonzentration 1 mM.

Peptidbezeichnung	Sequenz	M _w	RU	RU*	Bemerkung
C4_C1_10er	N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L	1172.455	18 RU	15 RU	Referenz
C4_C1_11er	I-N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L	1285.610	n.g.	--	--
C4_C1_11er_I(-1)F	F -N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L	1319.620	n.g.	--	--
C4_C1_10er_G7A	N-M-W-Q-K-V- A -T-P-L	1186.465	15 RU	13 RU	- 17 %
C4_C1_10er_G7P	N-M-W-Q-K-V- P -T-P-L	1212.505	13 RU	11 RU	- 30 %
C4_C1_10er_V6I	N-M-W-Q-K- I -G-T-P-L	1186.465	25 RU	21 RU	+ 37 %
C4_C1_10er_K5R	N-M-W-Q- R -V-G-T-P-L	1200.455	29 RU	24 RU	+ 57 %
C4_C1_10er_Q4S	N-M-W- S -K-V-G-T-P-L	1131.385	20 RU	18 RU	+ 15 %
C4_C1_10er_W3Y	N-M- Y -Q-K-V-G-T-P-L	1149.405	7 RU	6 RU	- 60 %
C4_C1_10er_M2S	N- S -W-Q-K-V-G-T-P-L	1128.325	13 RU	12 RU	- 24 %
C4_C1_10er_N1E	E -M-W-Q-K-V-G-T-P-L	1187.455	15 RU	13 RU	- 18 %
Rev_C4_C1_10er	L-P-T-G-V-K-Q-W-M-N	1172.445	n.g.	--	--

Diese Ergebnisse zeigen eine Bestätigung des aus der Röntgenstruktur abgeleiteten Bindungsmodells. Insbesondere die Relevanz des Tryptophans wurde durch den Austausch mit Tyrosin und die damit verknüpfte Verringerung der Antwort um 60 % belegt.

Cordonnier *et al.* hatten 1989 überprüft, welche Mutationen im gp120 die Bindung an CD4 mit diesen Mutanten beeinflusst. Die durchgeführten Mutationen des Tryptophan gegen Tyrosin und Phenylalanin führen zu einem 80 %igen Verlust der Bindungsfähigkeit an CD4¹⁶². Der Austausch des Lysins gegen Arginin ergibt eine deutliche Verbesserung um 57 %. Eine 37 %ige Erhöhung der Antwort ergibt sich durch den Austausch von Valin gegen Isoleucin. Durch das Ersetzen des Glutamins, das nicht an der Bindung beteiligt ist, gegen ein Serin ergibt sich eine schwache Erhöhung von 15 %. Der Austausch des Glycins gegen Alanin oder Prolin ergibt dagegen eine leichte Verschlechterung der Bindung. Das gleiche gilt für den Austausch von Methionin gegen Serin und Asparagin gegen Glutamat. Leider konnten die Peptide C4_C1_11er_I(-1)F, C4_C1_11er und Rev_C4_C1_10er aufgrund von sehr schlechter Löslichkeit für den Vergleich nicht benutzt werden. Insbesondere das Peptid Rev_C4_C1_10er wäre ein interessantes Peptid für eine Negativ-Kontrolle gewesen.

Von den drei aktivsten Peptiden wurden Konzentrationsreihen gemessen. Die Konzentrationsreihen der Peptide C4_C1_10er_Q4S, C4_C1_10er_K5R und C4_C1_10er_V6I zeigen alle sehr ähnliche Kurvenverläufe (Abbildung 36). Dabei zeigen sie keine Sättigung, sondern ansteigende Kurven, aus denen keine Informationen wie K_D-Werte gewonnen werden können.

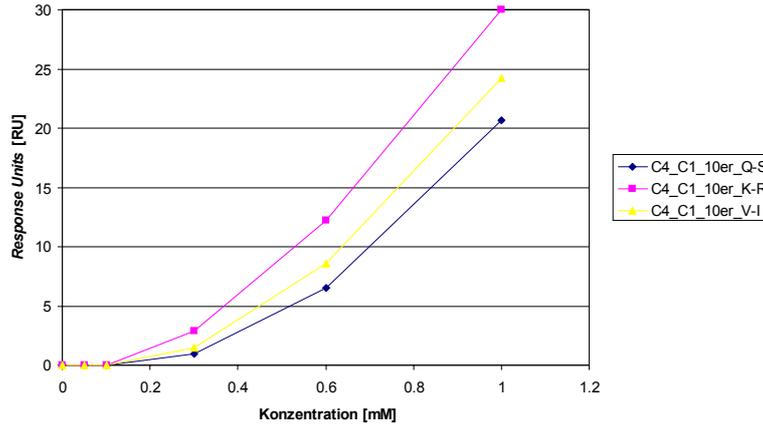


Abbildung 36 Konzentrationsreihen der drei Peptide C4_C1_10er_Q4S, C4_C1_10er_K5R und C4_C1_10er_V6I. Aufgetragen sind die RU-Werte der Differenz von Fc2 minus Fc1 gegen die Konzentration.

Es hatte sich gezeigt, daß drei Mutationen zu Peptiden mit erhöhten RU-Antworten geführt hatten. Mit diesen Informationen wurden nun zwei weitere Peptide konstruiert und synthetisiert. Die beiden Peptide zeigten eine noch größere RU-Antwort als die einzelmutierten Peptiden und zwar von 161 und 174 %.

Tabelle 8 BIACORE-Ergebnisse des Bindungsverhaltens von Varianten des Leitpeptids C4_C1_10er. RU*: Auf 1000 g/mol normierte *Resonance Units*. In Rot sind die gegenüber dem Leitpeptid veränderten Aminosäuren kenntlich gemacht. Die Peptidkonzentration ist 1 mM.

Peptidbezeichnung	Sequenz	M _w	RU	RU*	Bemerkung
C4_C1_10er	N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L	1172.455	18	15	Referenz
C4_C1_10er_K5R_V6I	N-M-W-Q- R - I -G-T-P-L	1214.475	51	42	+ 174 %
C4_C1_10er_Q4S_K5R_V6I	N-M-W- S - R - I -G-T-P-L	1173.415	47	40	+ 161 %

Es war möglich, durch den rationalen Austausch von einzelnen Aminosäuren des Peptids C4_C1_10er unter Annahme des Bindungsmodells, die Bindungseigenschaft um 174 % zu erhöhen.

4.10 BIACORE-BINDUNGSSTUDIEN MIT IMMOBILISIERTEM C4_C1_10ER

Um die Interaktion zwischen dem Protein CD4 und dem Peptid C4_C1_10er durch weitere Experimente zu belegen wurde in anderem Experiment biotinyliertes C4_C1_10er an einem mit

Streptavidin belegten Chip immobilisiert. Das Leitpeptid C4_C1_10er wurde n-terminal um vier Glycinresten verlängert synthetisiert. Durch den beweglichen Glycin-Spacer soll auch eine Wechselwirkung mit dem für die Bindung wichtigen N-Terminus möglich sein.

Auf der Referenzzelle wurde Biotin immobilisiert. Anschließend wurde verschiedene Konzentrationen CD4-Lösung vorbeigeleitet. In Abbildung 37 sind die Differenzkurven von sechs Lösungen CD4 in Konzentrationen zwischen 50 nM und 1600 nM gezeigt. Man erkennt, daß das CD4 nach der Bindung an das Peptid daran gebunden bleibt und nach dem Ende der Injektion (erkennbar an dem *Spike* in der Kurve) nur sehr langsam abdissoziiert. Eine sehr ähnliches Bild zeigte auch schon die Bindung von gp120 an immobilisiertes CD4 (siehe Abbildung 27). Um daraus die Dissoziationskonstante zu erhalten, trägt man die RU-Werte gegen die Konzentration auf (*steady-state-affinity-Ansatz*). In Abbildung 37 ist der Plot der Konzentration gegen den RU-Wert abgebildet. Man erkennt, daß es zu einer Sättigung kommt. Jedoch läßt sich durch alle Meßpunkte (rote Kurve) nur mäßig eine Funktion anpassen läßt. Wird der Wert der höchsten Konzentration nicht mitbenutzt, so ergibt sich ein besserer Fit (blaue Kurve).

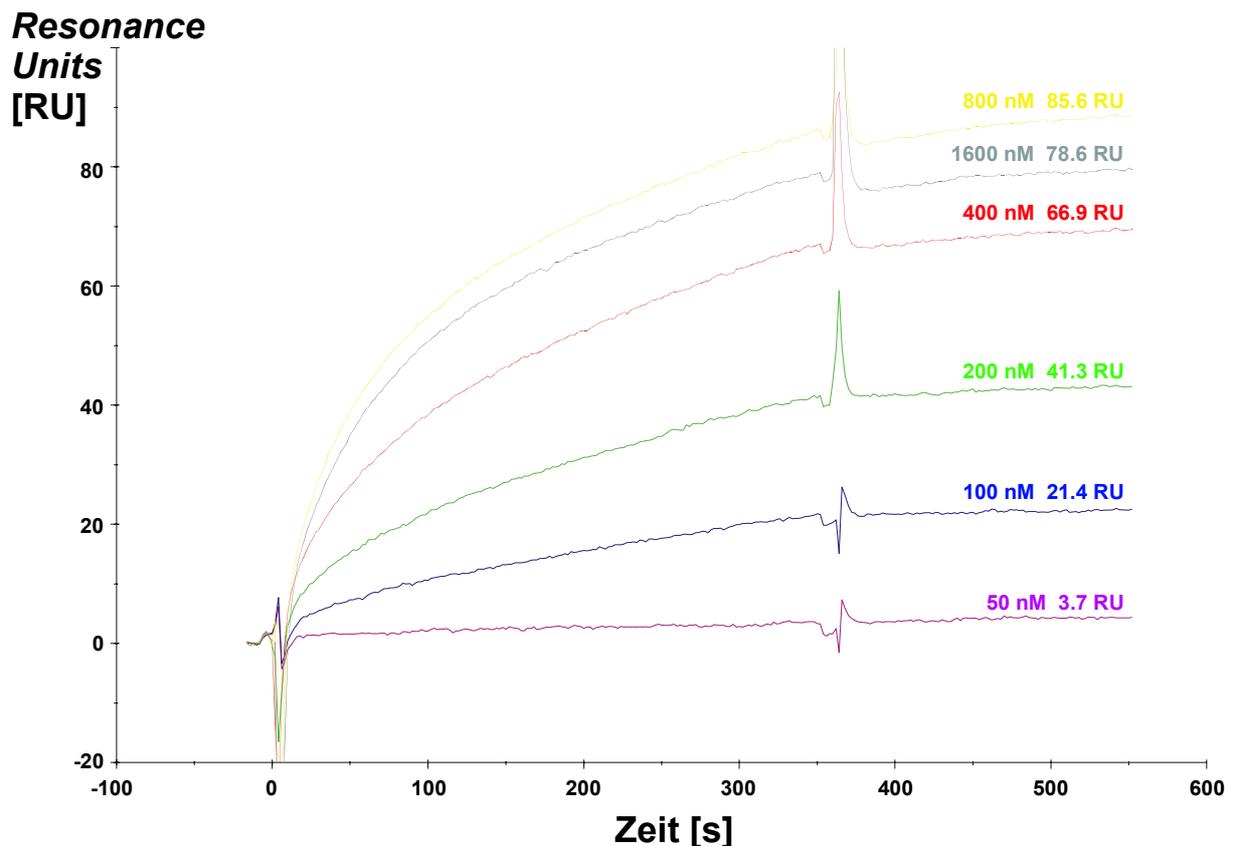


Abbildung 37 Sensorgramm der Injektionen von unterschiedlich konzentrierten CD4-Lösungen über einen mit 870 RU Biotin-GGGG-C4_C1_10er belegten Streptavidin-Chip. Abgebildet sind die Differenzen zu einer Referenzzelle, die nur mit Biotin belegt war.

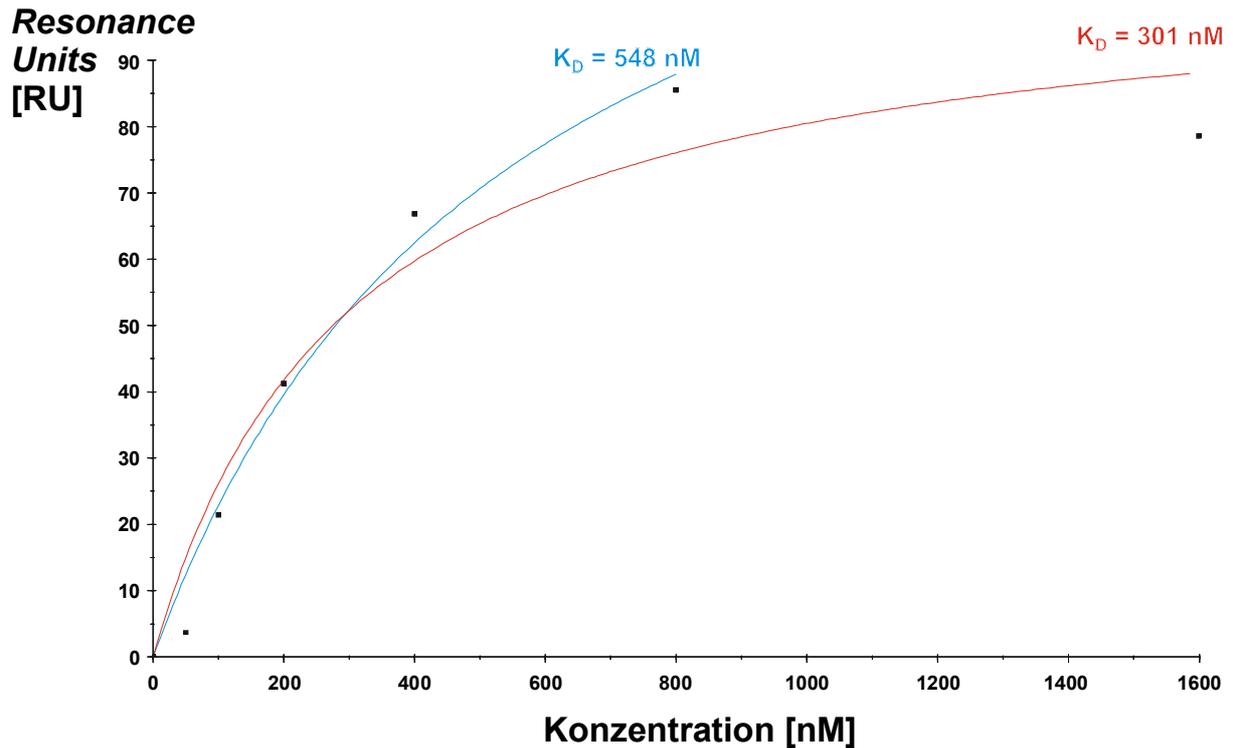


Abbildung 38 Auftragung der RU-Werte gegen die Konzentration von der Messung der Injektionen von unterschiedlich konzentrierten CD4-Lösungen über einen mit Biotin-GGGG-C4_C1_10er belegten Streptavidin-Chip.

Die daraus ermittelten K_D -Werte von 301 bzw. 548 nM liegen recht nah beieinander. Bemerkenswert ist die große Abweichung zu dem ermittelten Wert von 6 mM und der Unterschied von Faktor ~ 10000 . Dabei muß jedoch angenommen werden, daß der K_D -Wert im nanomolaren Bereich zu klein ist. Erklärbar ist dies durch eine „Rückbindung“ des CD4s während der k_{off} -Bestimmung, so daß der bestimmte k_{off} -Wert zu klein ist, ein bekanntes Problem bei BIACORE-Messungen^{172,173} oder durch auftretende polyvalente Wechselwirkungen. Zusätzlich erfolgte noch eine Auswertung der Kinetiken der verschiedenen Läufe. Dabei blieb außer acht, daß eigentlich auf Massen-Transport-Probleme hätte geprüft werden müssen. Diese Daten mit unterschiedlichen Flußraten lagen aber nicht vor, so daß nur die mit $5 \mu\text{L}/\text{min}$ benutzt wurden. Als Fitting Modell wurde "*binding with drifting baseline*" gewählt. Die Daten lassen sich sehr gut mit diesem Modell anpassen, und es ergeben sich optisch sehr gute Fits mit sehr niedrigen Chi^2 -Werten. Der aus den verschiedenen Konzentrationen hervorgegangene Mittelwert für K_D von $84 \pm 27 \text{ nM}$ liegt um Faktor vier unter dem aus dem *steady-state-affinity*-Ansatz gewonnenen Wert.

Tabelle 9 Auswertung der Messung der Injektionen von unterschiedlich konzentrierten CD4-Lösungen über einen mit Biotin-GGGG-C4_C1_10er belegten Streptavidin-Chip. Gefittet wurde mit dem Modell "*binding with drifting baseline*".

c [μM] CD4	k_a [mol ⁻¹ · s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [nM]	Chi ²
1600	9660	$1.31 \cdot 10^{-3}$	135	0.312
800	21800	$1.54 \cdot 10^{-3}$	70.5	0.448
400	33000	$2.65 \cdot 10^{-3}$	80.2	0.205
200	66700	$5.12 \cdot 10^{-3}$	76.7	0.128
100	128000	$7.4 \cdot 10^{-3}$	57.8	0.0824
Mittelwert	51800	$3.6 \cdot 10^{-3}$	84.0	0.235
Standardabweichung	42600	$2.3 \cdot 10^{-3}$	26.6	0.13

Durch diese neuen Daten wird die gewonnene Erkenntnis der Bindungsfähigkeit des Peptids C4_C1_10er an CD4 eindrucksvoll unterstützt.

4.11 NMR-EXPERIMENTE

4.11.1 Vorversuche

Mit 100 μg CD4 (2.2 nmol) wurde eine NMR-Probe in PBS H₂O/D₂O 9:1 angesetzt. Als Ligand wurde das Peptid C2_5er im Verhältnis 1:50 bzw. 1:150 zugesetzt. Die gemessenen STD-NMR-Spektren ließen keine Aussage bezüglich des Bindungsverhaltens zu. Die weiteren Untersuchungen werden mit größeren Mengen Protein durchgeführt.

Eine CD4-Charge vom NIH mit 1 mg/mL in Histidin-Mannitol-Puffer wurde geteilt und mit D₂O auf ein Verhältnis von H₂O/D₂O 9:1 eingestellt. In Abbildung 39 ist das 1D ¹H-NMR-Spektren mit WATERGATE-Wasserunterdrückung abgebildet.

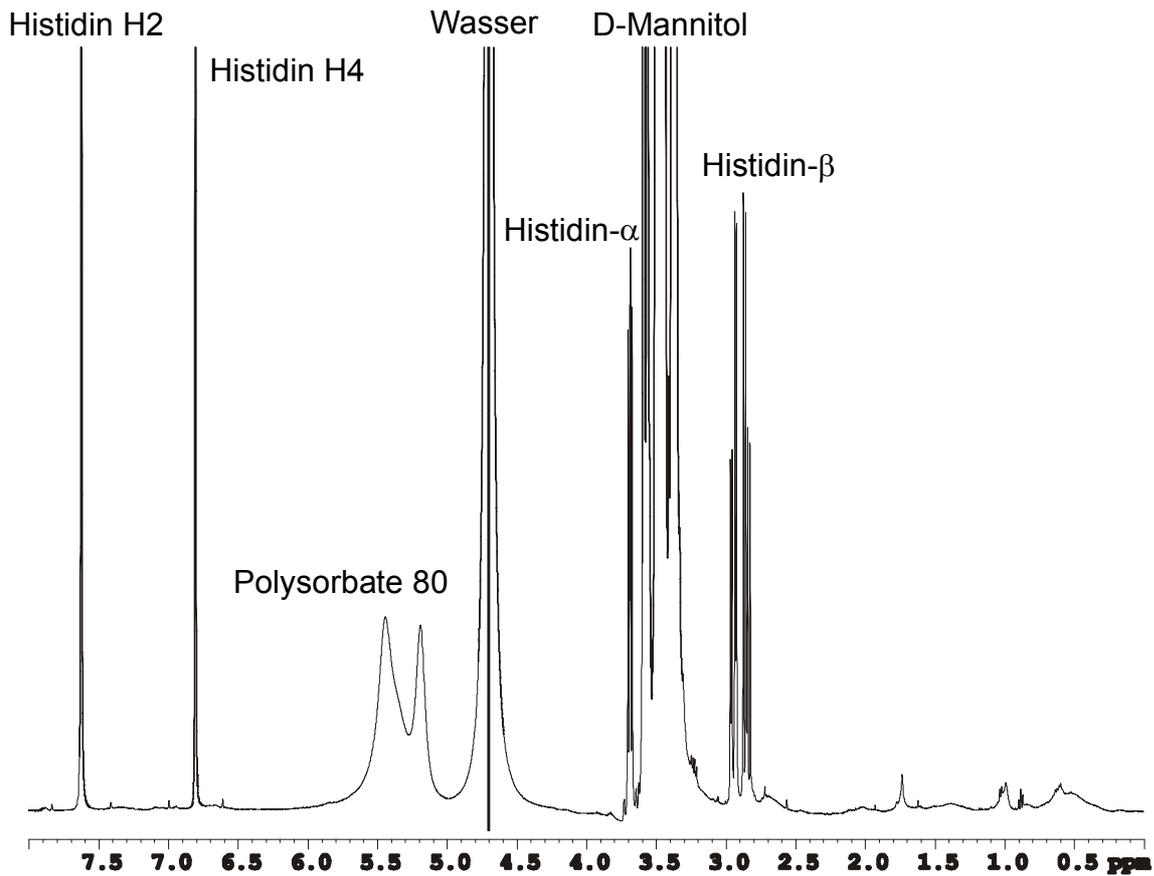


Abbildung 39 1D ^1H WATERGATE NMR von 500 μg CD4 (NIH). Eingesetzt wurde die gelieferte Probe in Histidin-Mannitol-Puffer, die nur mit D_2O auf $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 eingestellt worden ist. pH: 6.5, T: 280 K. $n_s = 1.5$ k.

Man erkennt sehr gut die einzelnen Pufferkomponenten. D-Mannitol (50 mM) zeigt ein großes Multipllett bei 3.5 ppm, Polysorbate-80 ein breites Dublett bei 5.4 ppm und Histidin (10 mM) das H2-Proton bei 6.8 ppm, das H4-Proton bei 7.6 ppm, das α -Proton bei 3.7 ppm und seine β -Protonen bei 2.9 ppm. Außerdem sieht man noch das sehr breite Protein-Spektrum. In STD-Spektren war ersichtlich, daß keine saubere Differenzbildung erfolgt war. Daher wurde für die folgenden Auswertungen 1 mg CD4 mit Phosphat-Puffer in D_2O ultrafiltriert. Zum einen wurden dadurch alle Puffer-Bestandteile entfernt, zum anderen wird auch das H_2O durch D_2O ausgetauscht. Die STD-NMR-Spektren wurden mit einem $T_{1\rho}$ -Filter aufgenommen, der aus einem 10 ms Spin-Lock-Puls bei 15 dB Abschwächung besteht, um die schnell relaxierenden Proteinresonanzen zu eliminieren¹⁷⁴. Vorher wurde über eine Reihenmessung (10 bis 40 ms) mit dem Pulsprogramm zgs.lmm die richtige Pulsdauer und die passende Abschwächung (10 bis 15 dB) bestimmt. Durch den $T_{1\rho}$ -Filter sind keine Proteinresonanzen beobachtbar, da sie während des 10 ms Spin-Lock-Pulses relaxiert sind – und somit keine sichtbaren Signale mehr

liefern. Alle nun folgenden 1D STD-NMR-Spektren wurden mit diesem Relaxationsfilter aufgenommen, da die Analyse der Spektren deutlich vereinfacht werden.

4.11.2 1D-1H-STD-Titrationsexperimente

Bei den hier durchgeführten STD-Titrationsexperimenten wurde 22 nmol CD4 in D₂O vorgelegt, und eine hochkonzentrierte Lösung an C4_C1_10er zugegeben. Auftretende Verdünnungseffekte wurden vernachlässigt. Die Sättigungszeit, die On-Resonance Frequenz und die Anzahl der Scans war bei allen Spektren gleich. Da das Wassersignal nicht so klein war wurde mit dem WATERGATE-Pulsprogramm aus der Standard Bruker Pulsprogramm Bibliothek gearbeitet^{175,176,177}. Es wurde in mehreren Schritten bis zu einer Peptidkonzentration von 10 mM, was einem Überschuß von 1:300 (Protein:Peptid) entspricht, titriert. In Abbildung 40 ist gut erkennbar, daß bei dem niedrigen Überschuß von 1:30 schon einzelne Signale im STD-Spektrum sichtbar sind. Insbesondere im Aromatenbereich, aber auch in den restlichen Bereichen des Spektrums. Diese Signale kommen von Protonen des Peptids, die sich während der Messung in räumlicher Nähe zum Protein befinden. Bei dem Verhältnis 1:300 sind die Effekte noch größer und man kann im Vergleich mit dem Referenz-Spektrum gut erkennen, daß sich das Intensitäts-Muster zwischen Referenz- und STD-Spektrum unterscheidet. Einige Protonen zeigen höhere Signale im STD-Spektrum und sind an der Bindung maßgeblich beteiligt, ein Epitop-Mapping ist also möglich. Um eine vergleichbare Einheit für STD-Titrationsexperimente zu haben wurde der STD-Amplifikations-Faktor eingeführt¹⁷⁸. Er ist wie folgt definiert:

$$\text{STD - Amplifikations - Faktor} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \times \text{Ligandenüberschuß}$$

Gleichung 10

I_0 = Signalintensität im NMR-Spektrum ohne Sättigung des Proteins

I_{sat} = Signalintensität im NMR-Spektrum mit Sättigung des Proteins

$I_0 - I_{\text{sat}}$ entspricht der Signalintensität im STD-NMR-Spektrum

Der STD-Amplifikations-Faktor ist ein Maß für die absolute STD-Signalintensität; die jeweilige Proteinkonzentration wird ausgemittelt.

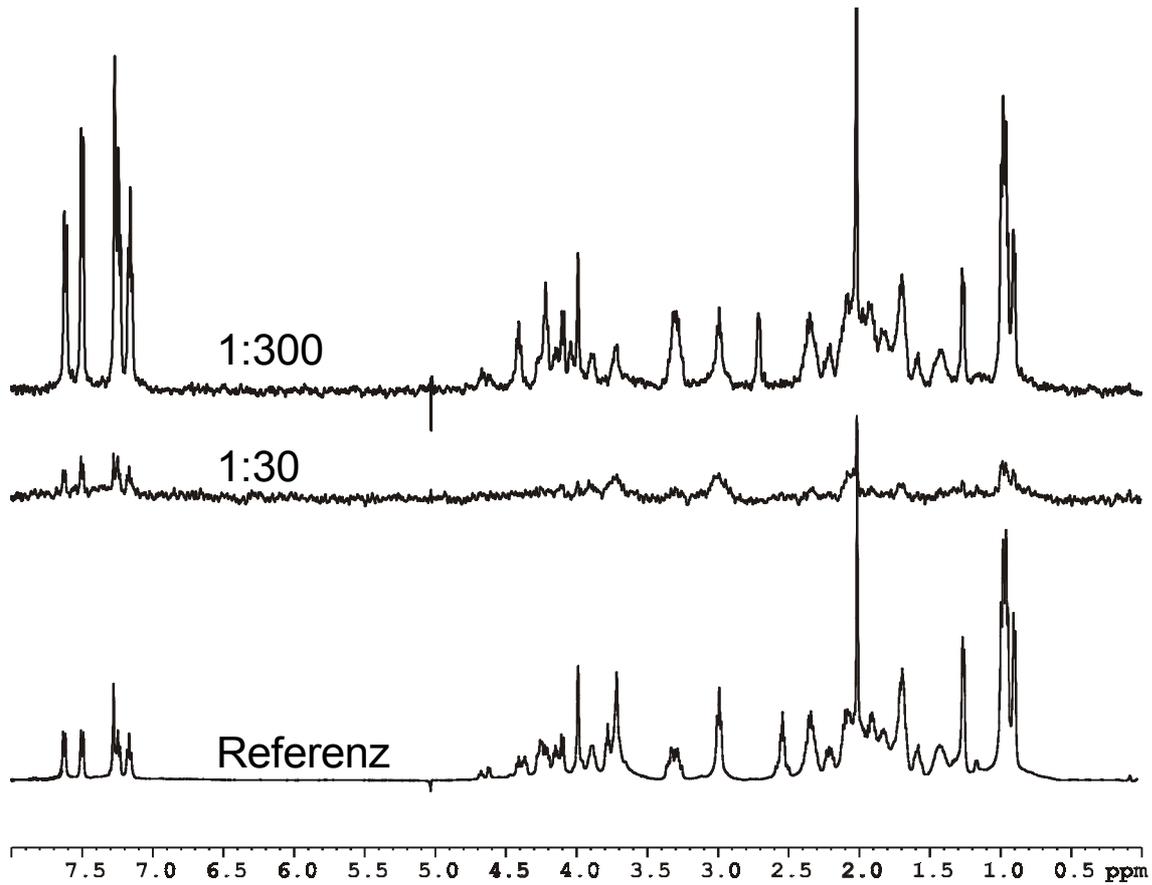
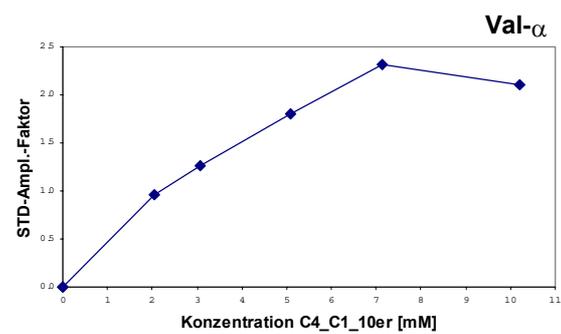
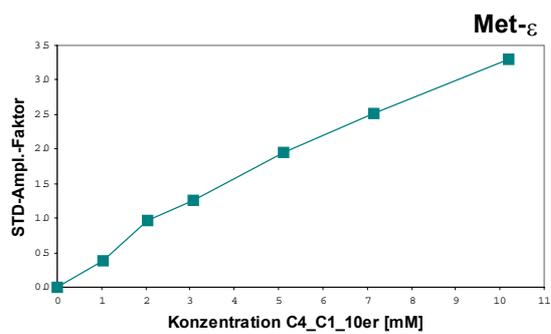
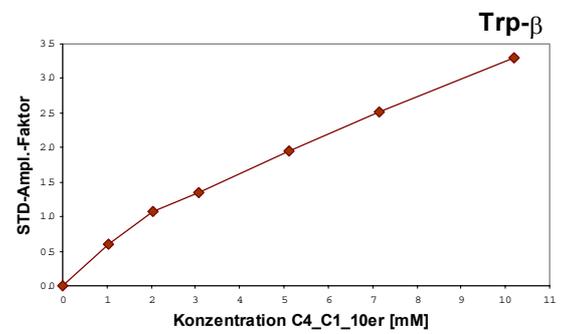
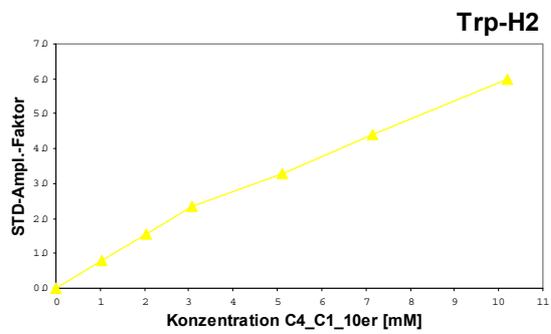
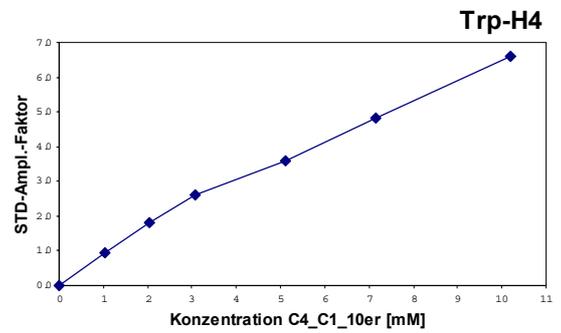
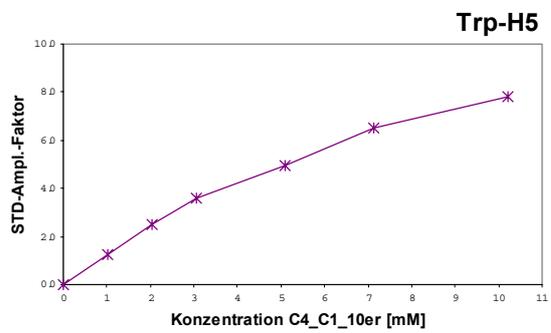
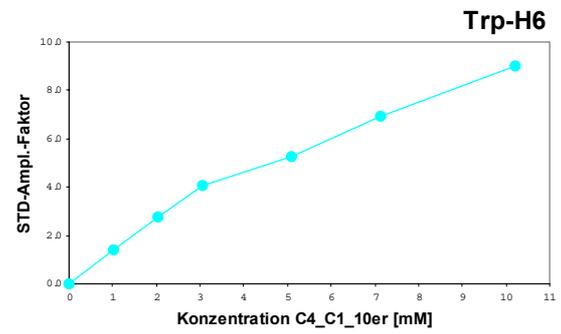
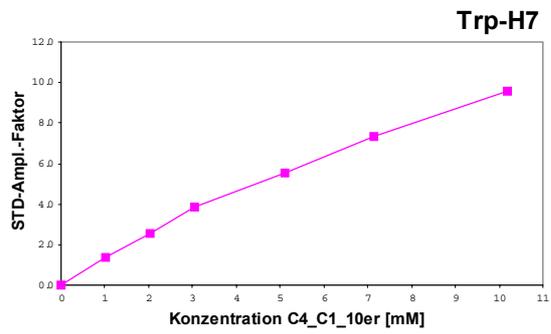
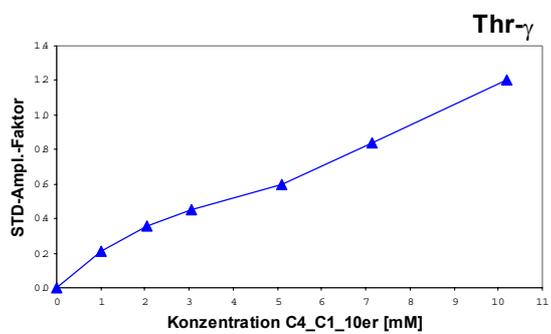
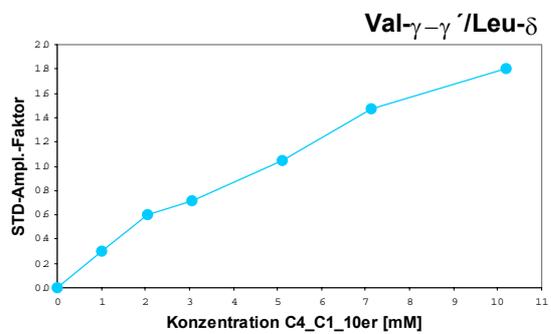
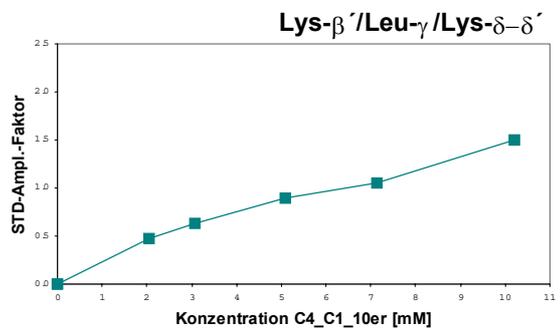
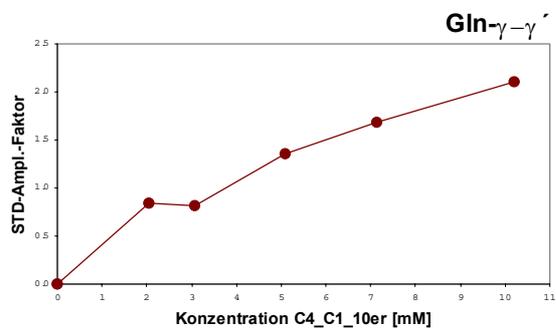
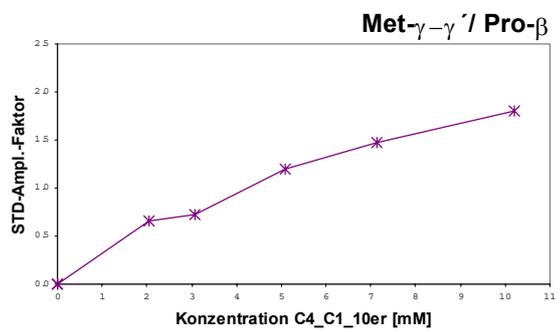
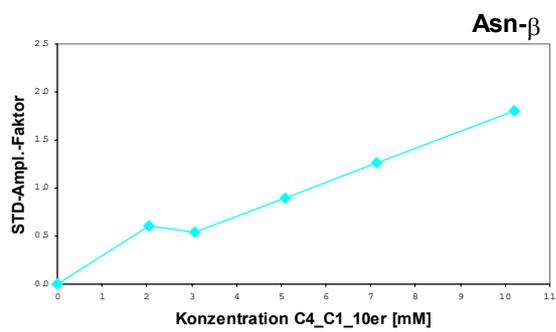
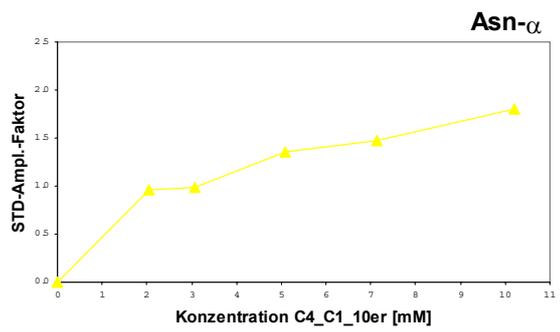
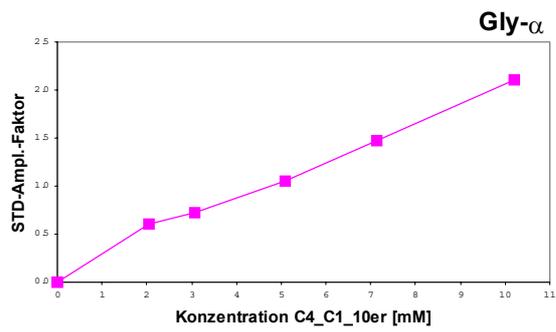


Abbildung 40 1D ¹H-STD-Experimente der Titration von CD4 mit dem Peptid C4_C1_10er. Die On-Resonance Frequenz war -1000 Hz. Das untere Spektrum zeigt das Referenz-¹H-NMR Spektrum. Die beiden oberen sind die STD-NMR-Spektren bei Überschüssen von 1:30 und 1:300 [D₂O-Phosphat-Puffer (20 mM Na/K), T: 278 K].

Aus den Spektren der Titrationsreihe wurden die STD-Intensitäten der Signale über den Dual-Display Modus in XWINNMR ermittelt. Für alle auswertbaren Signale der Titration wurde anschließend mit Gleichung 10 der STD-Amplifikations-Faktor errechnet und gegen die Konzentration aufgetragen. Die erhaltenen Kurven sind im folgenden abgebildet.





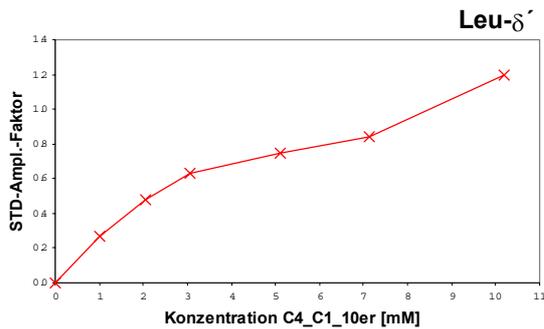


Abbildung 41 Auftragung des STD-Amplifikations-Faktors gegen die Ligandkonzentration für Protonen des Peptids C4_C1_10er. Sortiert wurden die Abbildungen nach abnehmenden STD-Amplifikations-Faktor.

Die Kurven zeigen einen für ein millimolaren Binder typischen Verlauf.

4.11.3 Bestimmung des Bindungsepitops von C4_C1_10er

Die Signalintensität bei STD-NMR-Spektren zeigt eine Abhängigkeit vom Abstand zwischen Proteinprotonen und den Ligandenprotonen. Daher können STD-NMR-Spektren auch dazu verwendet werden, das Bindungsepitop des Liganden zu bestimmen. Je näher ein Ligandenproton dem Bindungsbereich des Proteins kommt, desto grösser wird die Sättigung dieses Protons ausfallen. Daher liefern Molekülbereiche innerhalb eines Liganden, die näher am Protein liegen, grössere Intensitäten im STD-Spektrum. Die STD-Signale von Gruppen, die weiter entfernt sind, liefern dementsprechend kleinere Intensitäten^{120,179}. Zur Ermittlung des Bindungsepitops des Peptids C4_C1_10er an CD4 wurde das 1D STD-NMR-Spektrum mit der höchsten Ligandkonzentration von 10 mM benutzt.

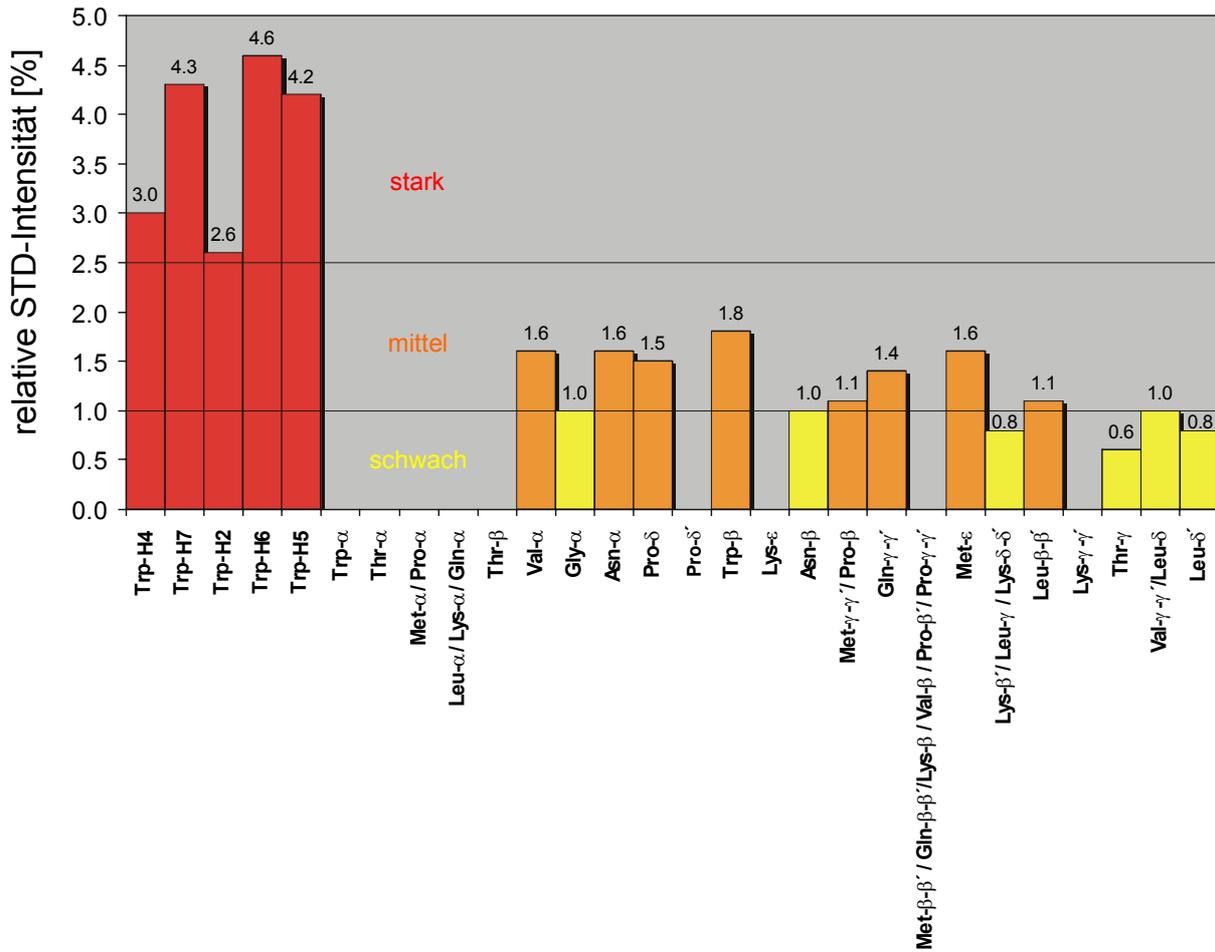


Abbildung 42 Relative STD-Intensitäten der Protonen von C4_C1_10er aus einem 1D STD-Spektrum bei einem CD4/Peptid-Verhältnis von 1:300 in H₂O/D₂O 9:1. Die Intensitäten wurden willkürlich in stark (über 2.5 %, in Rot), mittel (1.1 bis 2.5 %, in Orange) und schwach (0.5 bis 1.0 %, in Gelb) eingeteilt.

In Abbildung 42 sind die über den Dual-Display Modus in XWINNMR erhaltenen relativen STD-Intensitäten verglichen. Dabei erfolgte eine willkürlich Einteilung der Werte in: stark (über 2.5 %, in Rot), mittel (1.1 bis 2.5 %, in Orange) und schwach (0.5 bis 1.0 %, in Gelb). Besser anschaulich werden die Daten in Abbildung 43 präsentiert.

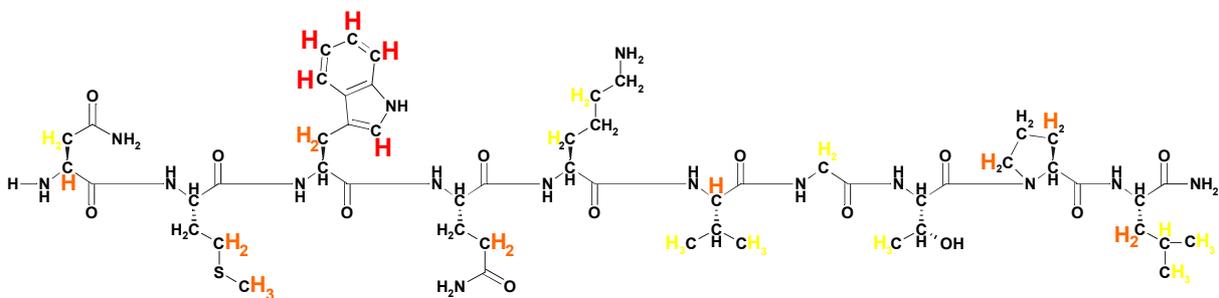


Abbildung 43 Strukturformel von C4_C1_10er mit den Ergebnissen des Epitop-Mappings. Die an der Bindung zum CD4 beteiligten Protonen des Peptids sind farblich und über die Größe der Buchstaben gekennzeichnet. Analog zu Abbildung 42 sind die starken STD-Intensitäten in Rot, die mittleren in Orange und die schwachen in Gelb dargestellt.

Die Ergebnisse des Epitop-Mappings sind, zusammen mit den Daten aus den folgenden TOCSY- und HSQC-Experimenten, in Kapitel 4.11.6 beschrieben und diskutiert.

4.11.4 STD-TOCSY-Experimente

Die guten Ergebnisse der 1D STD-NMR-Experimente gaben Anlaß, auch 2D STD-NMR-Experimente an diesem System durchzuführen. Bekanntermaßen sind TOCSY-Spektren sehr gut geeignet, um komplexe Moleküle zu identifizieren. Abbildung 44 zeigt das mit Off-Resonance Einstrahlung aufgenommene normale TOCSY-Spektrum von CD4 und C4_C1_10er im Verhältnis 1:60 bei 278 K. Es handelt sich dabei um die selbe Probe, mit der auch die 1D STD-Titrationsexperimente aufgenommen wurden.

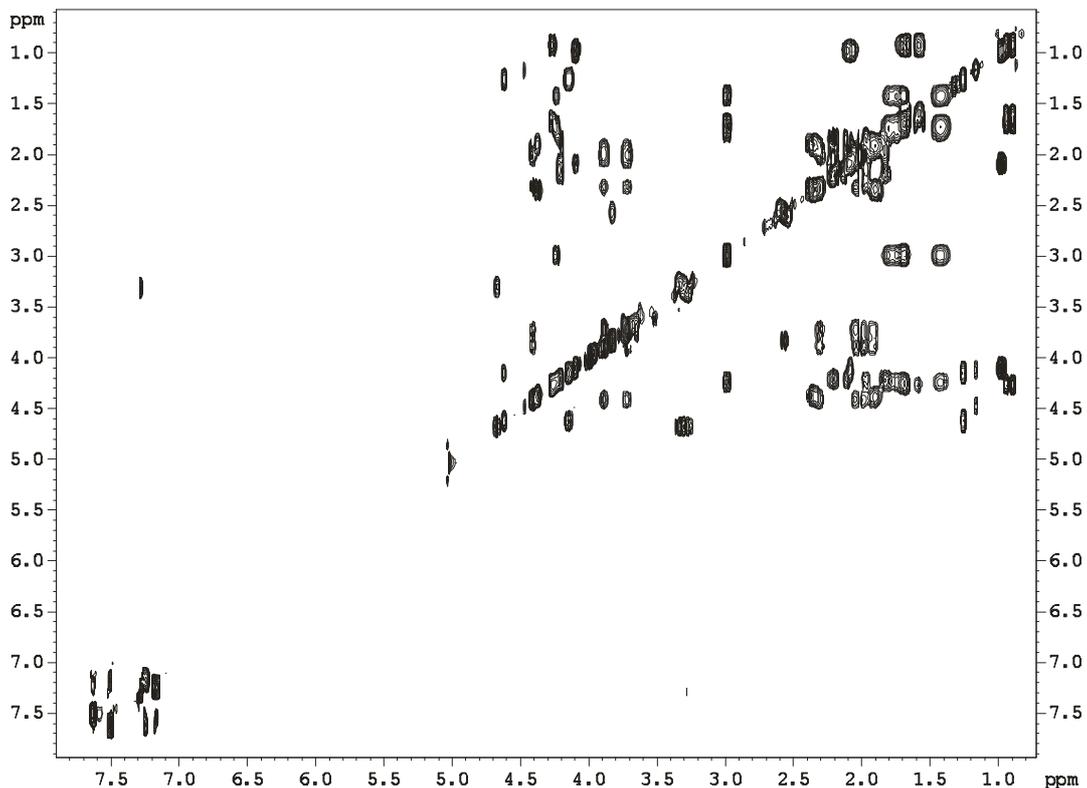


Abbildung 44 Off-Resonance-TOCSY-Spektrum des Peptids C4_C1_10er mit CD4 (22.2 nmol) im Verhältnis 60:1, in D₂O-Phosphat-Puffer (20 mM Na/K), T: 278 K.

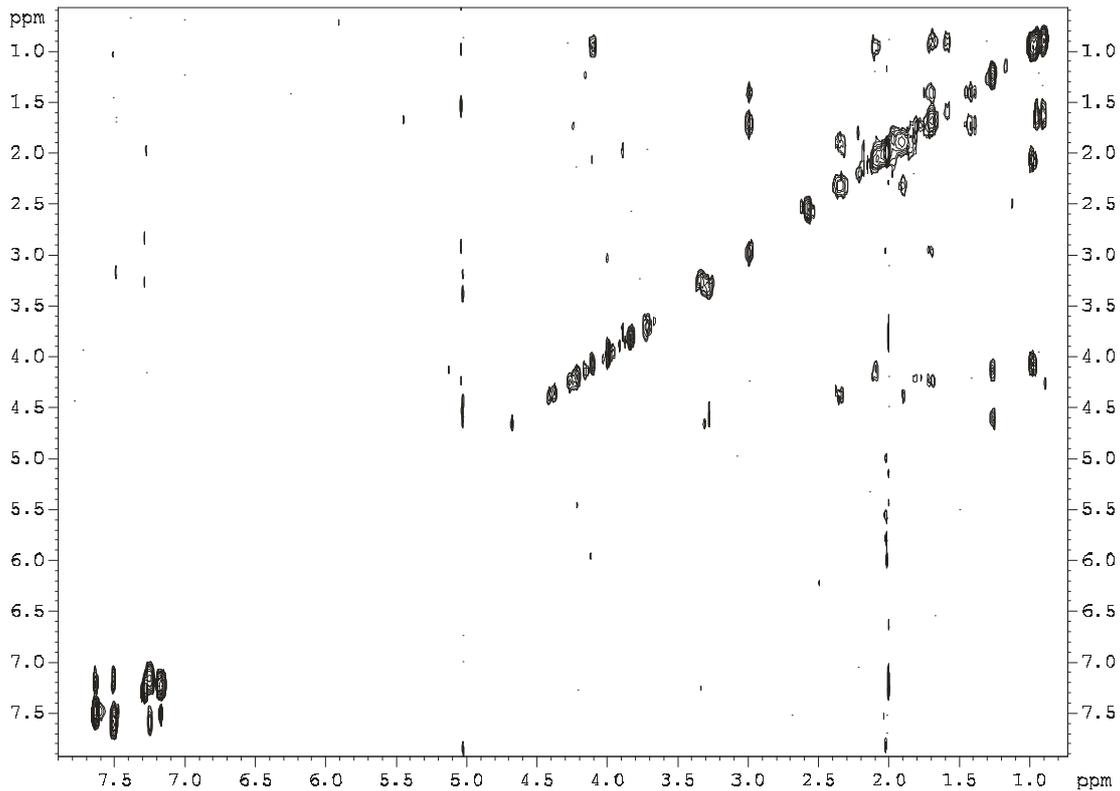


Abbildung 45 STD-TOCSY-Spektrum des Peptids C4_C1_10er mit CD4 (22.2 nmol) im Verhältnis 60:1, in D₂O-Phosphat-Puffer (20 mM Na/K), T: 278 K.

Das STD-TOCSY-Spektrum enthält nur Signale der in räumlicher Nähe mit dem Protein befindlichen Gruppen des Peptids C4_C1_10er. Es zeigen die Aminosäuren Tryptophan, Lysin, Valin, Threonin und Leucin Kontakt zum CD4. Welche Protonen des Liganden C4_C1_10er genau an der Bindung zum CD4 beteiligt sind, wird in Kapitel 4.11.6 im Vergleich mit den Daten von 2D STD-HSQC-Spektren präsentiert und diskutiert.

4.11.5 STD-HSQC-Experiment

Auf einem Spektrometer mit einem Cryo-Probenkopf bei Bruker in Zürich war es möglich, innerhalb von 15 Stunden ein STD-HSQC-Spektrum zu erhalten, aus dem Informationen bezüglich der Bindung gewonnen werden konnten.

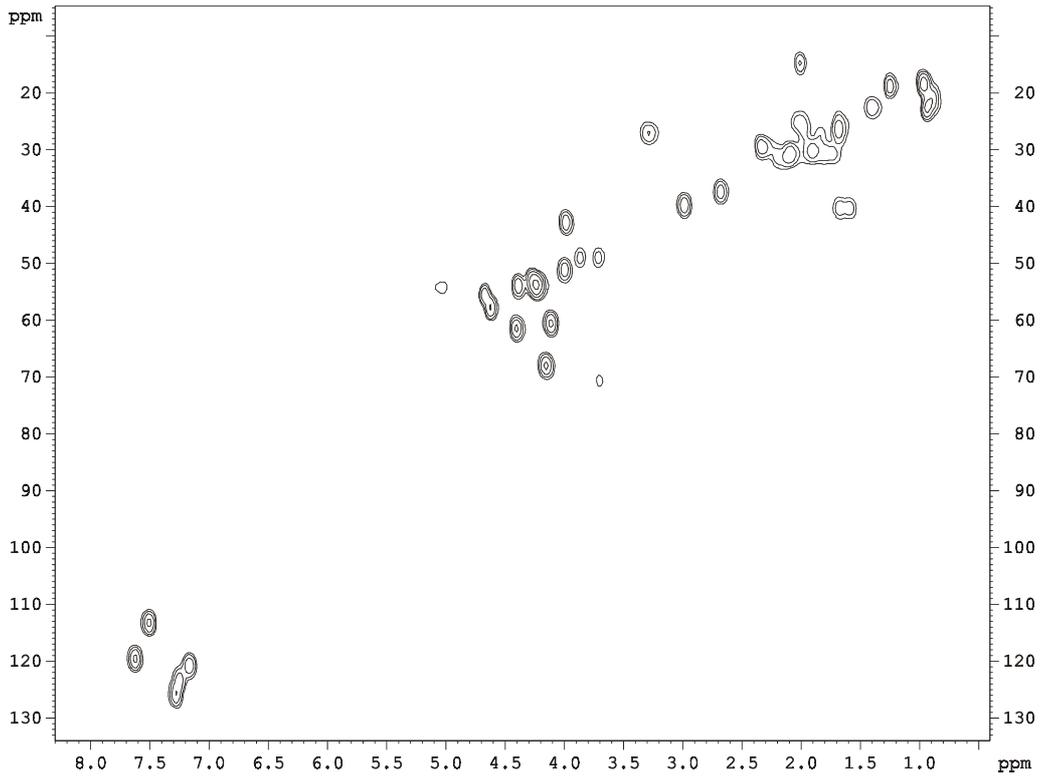


Abbildung 46 Referenz-HSQC-Spektrum des Peptids C4_C1_10er mit CD4 (22.2 nmol) im Verhältnis 300:1 in D₂O-Phosphat-Puffer (20 mM Na/K).

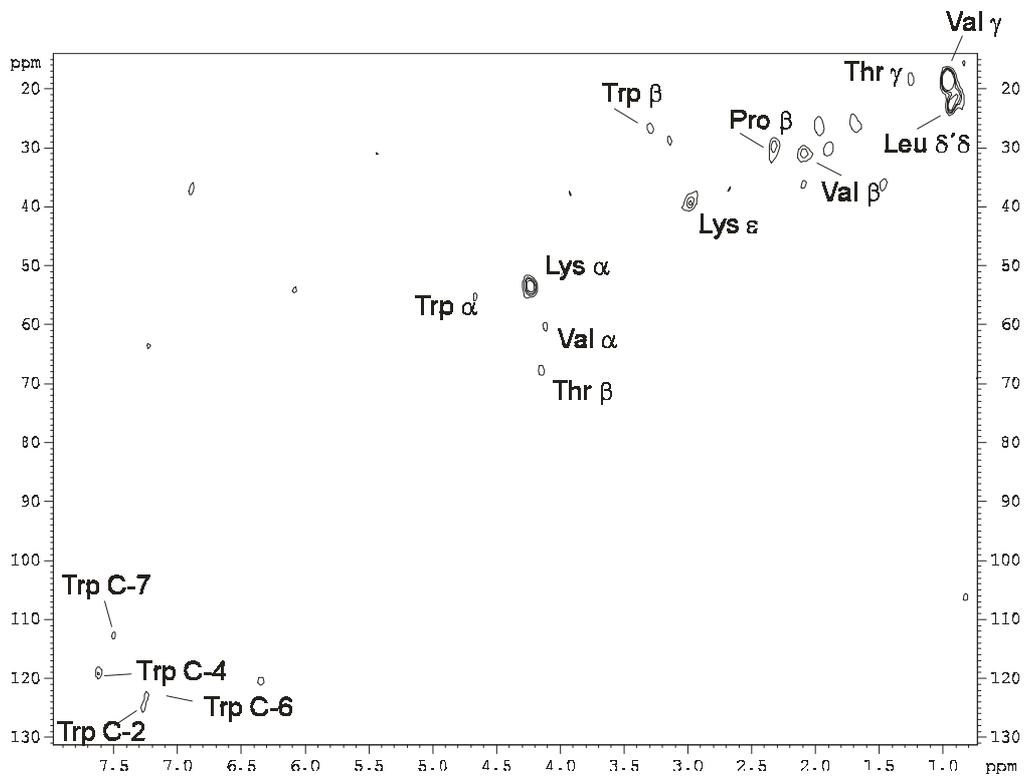


Abbildung 47 STD-HSQC-Spektrum des Peptids C4_C1_10er mit CD4 (22.2 nmol) im Verhältnis 300:1 in D₂O-Phosphat-Puffer (20 mM Na/K). Die Signale der an der Bindung beteiligten Atome sind beschriftet.

4.11.6 Vergleich der Bindungsepitope HSQC / TOCSY

Aus den beiden STD-Experimenten HSQC und TOCSY konnten jeweils Informationen über das Bindungsepitop des Peptids erhalten werden (Abbildung 48). Man erkennt eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Experimente. In beiden sind die Aminosäuren Tryptophan, Lysin, Valin, Threonin und Leucin maßgeblich an der Bindung beteiligt. Die je Aminosäure involvierten Atome unterscheiden sich nur marginal. Für das Valin ergibt sich aus beiden Experimenten, daß genau die gleichen Protonen an der Bindung beteiligt sind. Insbesondere sind die beiden γ -Methylgruppen vermutlich an wichtigen, hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt. In der Röntgenstruktur liegen die Alkyl-Ketten vom Val-430 auf einem hydrophoben Bereich des Proteins, welcher durch einen Teil des Trp-62 Ringes und die β -Atome den Arg-59 des CD4 gebildet wird (siehe Abbildung 33). Ebenfalls identische Ergebnisse liefern die beiden Experimente für die beteiligten Protonen des Threonins. Sowohl die Threonin- γ -Protonen, als auch das Threonin- β -Proton ist demnach an der Bindung beteiligt.

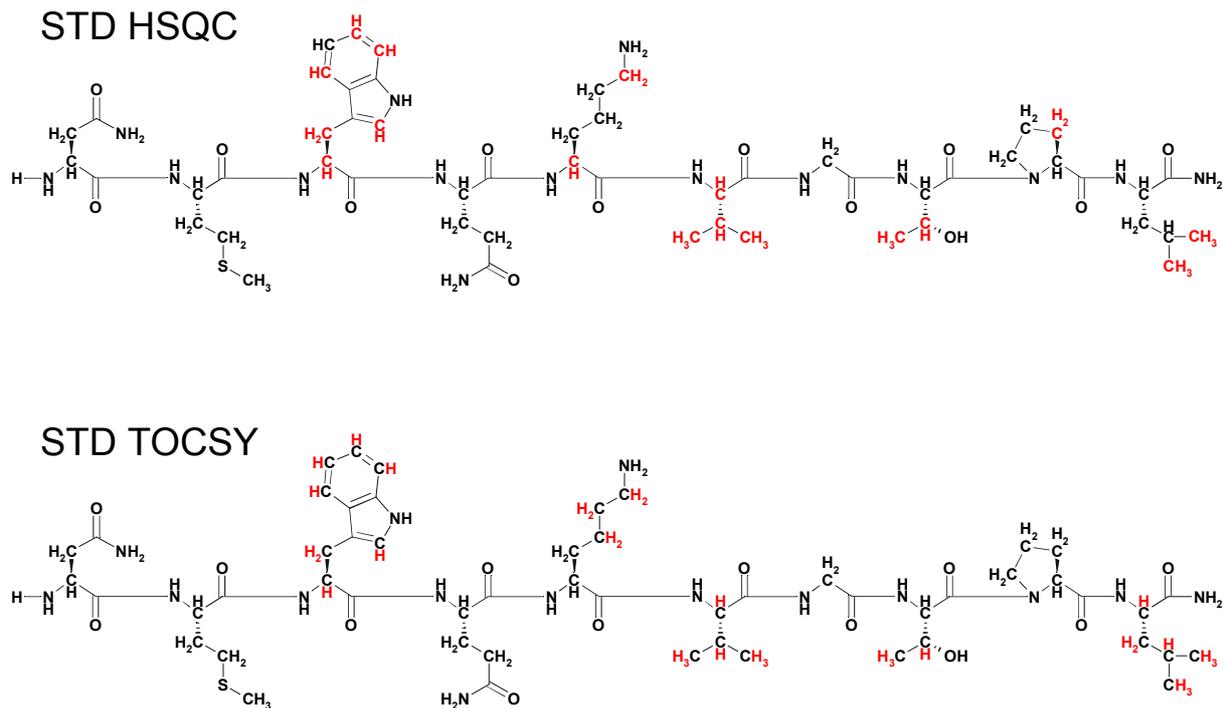


Abbildung 48 Vergleich der Ergebnisse der HSQC- und TOCSY-STD-Experimente vom Peptid C4_C1_10er mit CD4. Abgebildet ist zweimal die Strukturformel des Peptids. In Rot sind die Atome eingefärbt, die in dem jeweiligen STD-Experiment Signale gezeigt hatten.

Für das endständige Leucin gibt es leichte Differenzen zwischen dem HSQC- und dem TOCSY-Experiment. Während aus dem HSQC-Spektrum nur die Beteiligung der δ -Methylgruppen

resultiert, sind nach dem TOCSY-Spektrum auch die α -, β - und γ -Protonen involviert. Vielleicht ist das TOCSY-Experiment empfindlicher auf Effekte von Spin-Diffusion. In der Röntgenstruktur liegen die Alkyl-Gruppen des Leu-125 in einem hydrophoben Bereich auf der CD4-Oberfläche. An diesem Bereich sind die drei Gruppen Leu-61- β , - γ und - δ , Gln-64- γ und Ser-60- β des CD4 Moleküls beteiligt. Es ist wahrscheinlich, daß die Leucin-Seitenkette mit diesem hydrophoben Bereich des CD4 auch in Lösung wechselwirkt.

Beide Experimente ergeben eine Beteiligung einiger Protonen der Lysin-Seitenkette an der Bindung. Vermutlich liegt die Lysinseitenkette auf der Proteinoberfläche. Dadurch wird erreicht, daß sich eine Wasserstoffbrücke zu dem Asp-63 auf der CD4-Oberfläche ausbildet. Es wäre auch unwahrscheinlich, daß die Lysin-Seitenkette des Peptids weg von der CD4-Oberfläche ragt, wie in der Röntgenstruktur (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34), da die umgebenden Aminosäuren des Proteins fehlen und diese Stellung der Seitenkette vermutlich energetisch nicht sinnvoll ist.

Für das Tryptophan ergibt sich aus den beiden Experimenten, daß genau die gleichen Protonen (α , β , H2, H3, H4 und H6) an der Bindung beteiligt sind - mit Ausnahme, daß im TOCSY-Experiment eine Beteiligung des H5-Protons sichtbar ist, die im HSQC-Experiment fehlt. In der Röntgenstruktur zeigen die Trp-427- α - und Trp-427- β -Atome hydrophobe vdW-Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ring vom Phe-43. Der Indol-Ring des Trp-427 liegt zwar in räumlicher Nähe zum Phe-43-Ring, jedoch liegen die Ringe so weit voneinander entfernt, daß keinerlei Wechselwirkungen zum Beispiel der beiden π -Systeme möglich erscheinen. Jedoch ist dabei zu bedenken, daß in der Röntgenstruktur noch die umgebenden Aminosäuren des gp120 das Tryptophan in dieser Lage stabilisieren. In Lösung, und bei einem Peptid ist es sehr wahrscheinlich, daß der Indol-Ring eher flach auf der Proteinoberfläche liegt. Dann ist auch eine π - π -Wechselwirkung mit dem Phe-43 des CD4 möglich.

Die Ergebnisse des Epitop-Mappings aus den 1D STD-NMR-Experimenten (siehe Abbildung 43) stimmen im Prinzip gut mit den Daten aus den 2D STD-NMR-Experimenten überein. Abweichend zeigt das Peptid im 1D Experiment noch Kontakt zum Protein über die Seitenketten der anderen Aminosäuren. Es ist wahrscheinlich, daß das Peptid auch über diese Atome an das Protein bindet.

4.12 GENDATENBANK

Aus einem Datensatz mit 38552 HIV-Sequenzen aus *Genbank* sollten die Sequenzen extrahiert werden, in denen der C4-Bereich vorkommt. Vorher durchgeführte Suchen in Gendatenbanken mit dem Suchbegriff C4 und V4 im Namen hatten ergeben, daß in fast ausnahmslos allen gefundenen Sequenzen das Teilstück **NMW** vorkommt. Es war bekannt, daß zwischen dem letzten Cystein der V4 und einem Cystein (Disulfidbrücke zur C3-Domäne) fünf Aminosäuren vor dem Ende der C4-Region häufig 26 Aminosäuren liegen. Jedoch kann aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus diese Anzahl durch Deletionen oder Insertionen variieren. Daher wurden in den 38552 Sequenzen die Sequenzen ermittelt, die zwischen zwei Cysteinen eine Anzahl *n* an Aminosäuren haben (C_n_C). Dabei wurde *n* von 23 bis 28 benutzt. Tabelle 10 zeigt das Ergebnis der Suche. Man erkennt, daß fast ausschließlich bei der Suche nach C_26_C Sequenzen gefunden werden, die NMW enthalten. Alle anderen besitzen eine vernachlässigbare Anzahl.

Tabelle 10 **Durchsuchung der Datenbank mit 38552 HIV-Sequenzen nach Sequenzen mit unterschiedlich (23-28) langen Stücken zwischen zwei Cysteinen.**

Gesuchte Stücke <small>Die Zahl gibt die Anzahl der Aminosäuren zwischen den Cysteinen an.</small>	Anzahl an gefundenen Sequenzen	Sequenzen enthalten "NMW"
C_23_C	1206	0
C_24_C	775	1
C_25_C	1202	4
C_26_C	7032	5306
C_27_C	4147	3
C_28_C	3012	0

Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Gendatenbank kaum nennenswert C4-Bereiche mit einer abweichenden Länge von 26 Aminosäuren zwischen zwei Cysteinen beinhaltet. Eine optische Sichtung der 7032 Sequenzen ergab zum einen, daß eine ganze Reihe von darin enthaltenen Sequenzen eine komplett andere Abfolge an Aminosäuren aufweisen, und es sich somit nicht um C4 Sequenzen handelt. Diese sollten aus der Liste entfernt werden. Zum anderen zeigte sich auch im Bereich von NMW, daß auch dieser nicht zu 100 % konserviert war. Daher wurden die 7032 Sequenzen aufgeteilt (Tabelle 11). An einer Position in der Sequenz wurde nach den 20 Aminosäuren getrennt separiert. Die benutzte Position 10 ist die, wo das hochkonservierte Trp-427 liegt. Man sieht, daß von den 7032 Sequenzen bei 86 % dort auch ein Tryptophan in der Sequenz liegt. Die anderen Aminosäuren sind entsprechend nur schwach populiert. Innerhalb dieser Sequenzgruppen konnten dann optisch die C4-Sequenzen extrahiert werden.

Tabelle 11 Separierung der 7032 Sequenzen nach Aminosäure-Position 10.

Aminosäure an Position 10	Anzahl an Sequenzen	Sequenzen mit einer C4 Sequenz
Tryptophan	6027	6027
Cystein	36	2
Alanin	48	--
Aspartat	60	--
Glutamat	36	--
Phenylalanin	--	--
Glycin	9	1
Histidin	1	--
Isoleucin	7	--
Lysin	31	--
Leucin	21	--
Methionin	--	--
Asparagin	101	--
Prolin	--	--
Glutamin	--	--
Arginin	67	17
Serin	28	2
Threonin	513	33
Valin	17	2
Tyrosin	4	--

Es ergab sich eine Liste von 6084 C4-Sequenzen. Eine Auswertung in Form eines Balkendiagramms ist in Abbildung 49 ersichtlich.

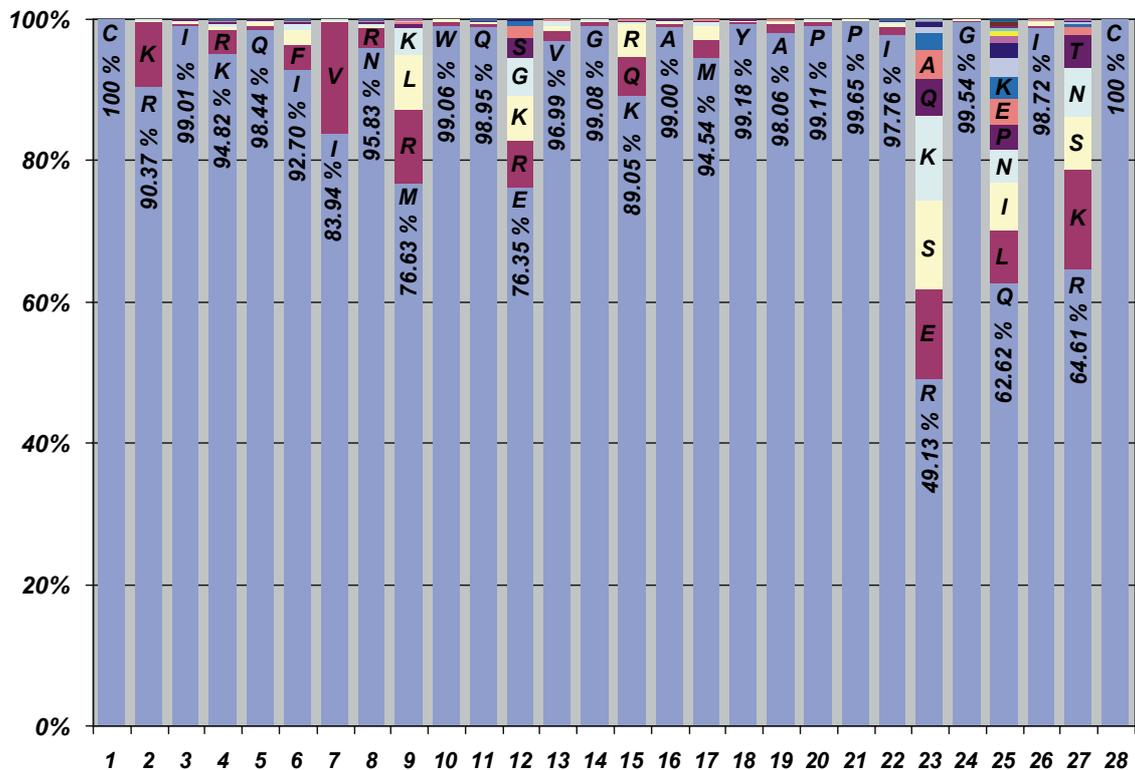


Abbildung 49 Graphische Auswertung der 6084 C4-Regionen aus einem Datensatz mit 38552 HIV-Sequenzen aus *Genbank*.

Erkennbar wird, daß der C4-Bereich bis auf wenige Ausnahmen ein hoch konservierter Bereich ist. Die Positionen 8 bis 13 entsprechen dem Peptid C4_6er. Die beiden Aminosäuren Trp-10 und Gln-11 sind zu 99 % in den 38552 Sequenzen an den Positionen zu finden. Interessanterweise ist die nächste Aminosäure nach der letzten Aminosäure des C4_6er in über 99 % der Sequenzen ein Glycin. Dies ist die Aminosäure die in dem Peptid C4_C1_10er als Verknüpfungsaminosäure an dieser Position benutzt wurde.

4.13 AUSBLICKE

Es konnte schon früh gezeigt werden, daß der D1-D2-Teil vom CD4 ausreichend ist um an gp120 zu binden¹⁸⁰. Daher wäre es für weitergehende und intensivere Bindungsstudien möglich und sinnvoll, statt des kompletten CD4 (D1-D4) das CD4 (D1-D2) zu benutzen. Da sich die Glycosylierungsstellen in D3 und D4 befinden, könnte auf die deutlich aufwendigere Expression in CHO-Zellen verzichtet werden. Daher wäre die Expression in *E. coli* möglich, die einfacher und kostengünstiger ist und bei Bedarf auch zu ¹³C und ¹⁵N *gelabelten* CD4 führen könnte. Damit wären intensive NMR-Bindungsstudien (z.B. SAR *by* NMR) möglich, um den Bindungsmodus des Leitpeptids C4_C1_10er sowie der optimierten Peptide präziser aufklären zu können. Mit diesen Informationen könnte dann ganz gezielt auch ein nicht-peptidischer Inhibitor generiert werden, um eine neue Medikamentenklasse zu etablieren.

4.14 BIO-ASSAY

In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Schreiber aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, wurde von diesen die inhibitorische Wirkung des Peptids C4_C1_10er in einem HIV-Neutralisationsassay untersucht (Abbildung 50)¹⁸¹. Die Werte der Messungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Als Negativ-Kontrollen wurden Wasser sowie menschliches Serum (1/10 und 1/100) eines nicht HIV-positiven Individuums benutzt. Wasser wurde dabei willkürlich eine Inhibition der Infektion von 0 % zugeordnet. Die beiden Serum-Proben zeigen im Vergleich zu Wasser fast unveränderte Inhibitionen der Infektion von 2 und 8 %. Als Positiv-Kontrolle wurde das an CCR5-Rezeptoren bindende CC-Chemokin RANTES benutzt. Von diesem war bekannt, daß es in der Lage ist, die HIV-Infektion zu hemmen¹⁸². In dem Assay lag die Inhibition der Infektion bei 49 %. Als eine weitere Kontrolle wurde ein

monoklonaler Antikörper gegen die V3-Loop von gp120 benutzt, der im Test eine Inhibition der Infektion von 38 % zeigte.

Tabelle 12 Ergebnisse des p24-ELISA vom HIV-Neutralisationsassay.

	1	2	3	Mittelwert
Wasser	0.962	0.797	0.875	0.878
Serum 1/10 (HIV-negativer Mensch)	0.854	0.848	0.869	0.857
Serum 1/100 (HIV-negativer Mensch)	0.844	0.816	0.774	0.811
Monoklonaler Antikörper gegen die V3-Loop 1/10	0.470	0.547	0.609	0.542
CC-Chemokin RANTES 1000 ng/ml	0.457	0.430	0.465	0.451
Peptid C4_C1_10er 50 mM	0.321	0.314	0.311	0.315
Peptid C4_C1_10er 25 mM	0.400	0.407	0.353	0.387
Peptid C4_C1_10er 12 mM	0.497	0.505	0.500	0.501

Für das eingesetzte Peptid C4_C1_10er lagen die Inhibitionen bei 43 % (12 mM), 56 % (25 mM) und bei 64 % (50 mM). Für die in diesem Test benutzten Konzentrationen von 12, 25 und 50 mM lagen die Belegungen des CD4-Rezeptors mit Peptid bei 67, 81 und 89 %. Gut erkennbar ist, daß das Peptid in den untersuchten Konzentrationen in der Lage ist, die Infektion mit HIV zu inhibieren und dabei auch eine Dosisabhängigkeit aufweist. Höhere Konzentration an Peptid ergibt auch eine bessere Inhibition der Infektion. Die Infektiösität der Peptidkonzentration war dabei in einem Bereich, indem auch bekannte Inhibitoren, wie z.B. RANTES oder auch ein monoklonaler Antikörper gegen die V3-Loop, liegen.

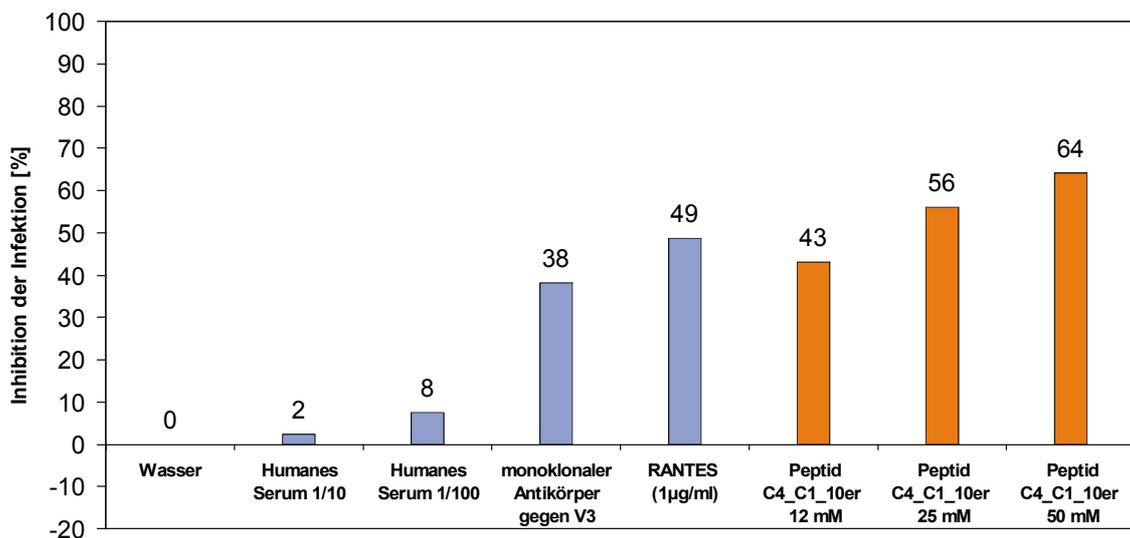


Abbildung 50 HIV-Neutralisationsassay zur Ermittlung der Inhibitionswirkung des Peptids C4_C1_10er im Vergleich mit Positiv- und Negativ-Kontrollen. Der Wert von Wasser wird willkürlich auf 0 gesetzt.

Aufgrund des positiven Befundes im HIV-Neutralisationsassay wurde zusätzlich ein T-Zell-Proliferationsassay durchgeführt. Damit wird überprüft, ob die verwendeten Konzentrationen des Peptids C4_C1_10er die Vermehrung der T-Zellen nicht beeinflussen. Bei den beiden niedrigen Konzentrationen zeigten sich keinerlei Effekte im T-Zell-Proliferationsassay, so daß die T-Zell-Teilung offensichtlich nicht durch das gelöste Peptid behindert wird. Erst bei der hohen Konzentration von 50 mM trat eine Beeinflußung der T-Zellteilung auf. Jedoch zeigen die beiden niedrigen Konzentrationen unbeeinflußt eine Inhibition von ca. 50 %. Das entwickelte Peptid ist somit in der Lage, die Infektion mit HI-Viren *in vitro* zu inhibieren.

5 Zusammenfassung

Der initiale Schritt der HIV-Infektion ist die Anheftung des Virus an seine Zielzelle. Die daran beteiligten Proteine sind das humane Glycoprotein CD4, welches auf Leukocyten vorkommt, und das Glycoprotein gp120 auf der Oberfläche des HI-Virus. Diese Interaktion wurde 1998 auf molekularer Ebene durch eine Röntgenstruktur aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde diese Interaktion genauer untersucht und dabei sechs unterschiedlich große Peptidsegmente des gp120, die drei bis neun Aminosäuren lang sind, als bindungsrelevant identifiziert. Durch diese Peptide findet die Interaktion des gp120 mit dem CD4 statt. Die Peptidsegmente sind diskontinuierlich über die gp120-Sequenz verteilt, liegen aber in dem räumlich begrenzten Bereich der Kontaktfläche mit dem CD4. Diese Peptide, d.h. TPL, DNAKT, SGGDPEI, NMWQKV, TRDGG und RPGGGDMRD wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als isolierte Moleküle synthetisiert und auf ihre Bindung hin untersucht. Bei einer weiteren Analyse der Röntgenstruktur zeigte sich, daß einige dieser Peptide über kurze Linkersegmente verknüpfbar sein sollten. Da dieses zu einer Verbesserung der Bindungsaktivität führen könnte, wurden die entsprechenden Peptide synthetisiert, bei denen mehrere dieser Bereiche über Aminosäuren verbrückt waren. Als Kontrolle wurden Peptide synthetisiert, von denen eine Wechselwirkung mit dem Protein CD4 in der Literatur beschrieben worden war. Alle Peptide wurden entweder mit einem *continuous-flow*-Peptidsynthesizer oder mit einem im *batch*-Verfahren arbeitenden Syntheseroboter für die kombinatorische Chemie hergestellt. Die Charakterisierung erfolgte anschließend mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und NMR Spektroskopie. Die Ausbeuten lagen im *continuous-flow*-Verfahren bei 23 bis 78 % und beim *batch*-Verfahren bei 8 bis 39 %. Mit einem Biacore 3000 Gerät wurden anschließend Untersuchungen hinsichtlich der Bindungseigenschaften dieser synthetischen Peptide zum Glycoprotein CD4 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß mehrere Peptide bei Konzentrationen von 1 mM Bindungseffekte aufwiesen. Bei den vom gp120 abgeleiteten Peptiden wurde Bindungsaffinität an das CD4 bei einem Tripeptid aus der C1-Region: TPL und einem Hexapeptid aus der C4-Region: NMWQKV gefunden. In der Sequenz des gp120 liegt das Peptid TPL auf der N-terminalen Seite vom Peptid NMWQKV. Da im gp120 aber der C-Terminus des NMWQKV räumlich nahe am N-Terminus des TPL liegt, wurde ein Hybrid-Peptid mit der Sequenz NMWQKVGITPL dargestellt, in dem beide Sequenzen durch ein Glycin überbrückt sind. Dieses Hybrid-Peptid wird als C4_C1_10er bezeichnet und zeigte bei den anfänglichen Untersuchungen die beste Bindungsaffinität. Eine Konzentrationsreihe des Peptids C4_C1_10er im Biacore zeigte, daß das Peptid zwei unterschiedliche Affinitäten zum CD4 besitzt. Eine sättigbare Bindung mit einem K_D -Wert von

6 mM und eine nicht-sättigbare, die ab Konzentrationen von ca. 3 mM sichtbar wird. Es kann nicht entschieden werden, ob es sich bei der zweiten um eine nicht-spezifische oder eine niedrig affine, spezifische Wechselwirkung handelt. Im STD NMR zeigt sich hingegen nur die für $K_D = 6$ mM erwartete Abhängigkeit der Signalintensität von der Konzentration. Die Ermittlung des Bindungs epitops unter Nutzung von 1D und 2D STD-NMR-TOCSY und -HSQC Experimenten des Peptids C4_C1_10er zeigt, daß Teile der Aminosäuren Tryptophan, Lysin, Valin, Threonin und Leucin für die Bindung im wesentlichen verantwortlich sind. Schwache Kontakte werden auch über andere Aminosäuren im 1D Experiment beobachtet. Die Ergebnisse aus der NMR-Spektroskopie zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Daten aus der Röntgenstruktur und dem daraus postulierten Bindungsmodus.

Um die Bindungsfähigkeit des Peptids C4_C1_10er an das humane CD4 weiter zu bestätigen, wurden Untersuchungen hinsichtlich der biologischen Aktivität des Peptids durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das Peptid *in vitro* in der Lage ist die HIV-Infektion effektiv zu inhibieren.

In weiterführenden Experimenten wurde das Peptid C4_C1_10er, unter Nutzung der Erkenntnisse aus der Röntgenstruktur, einer kombinatorischen Variation nach dem Prinzip des „*positional scanning*“ unterzogen, um dadurch die Relevanz einzelner Aminosäuren zu belegen. Die Ergebnisse zeigen eine Bestätigung des in der Röntgenstruktur und durch NMR-Spektroskopie gefundenen Bindungsmodells. Insbesondere die Relevanz des Tryptophans wurde durch einen Austausch mit Tyrosin und die damit verknüpfte Verringerung der Antwort um 60 % belegt. Der Austausch des Lysins gegen Arginin bringt eine deutliche Verbesserung der Affinität um 57 %. Eine 37 %ige Erhöhung der Antwort ergibt sich durch den Austausch von Valin gegen Isoleucin. Durch das Ersetzen des Glutamins gegen ein Serin ergibt sich eine Erhöhung von 15 %. Durch die Kombination dieser Verbesserungen in dem Design weiterer Peptide, war es möglich, durch den rationalen Austausch von einzelnen Aminosäuren des Peptids C4_C1_10er unter Kenntnis des Bindungsmodells, wie es aus der Röntgenstruktur erhältlich ist, die Bindungseigenschaft um 174 % zu erhöhen. Die Sequenz dieses Peptids ist NMWQRIGTPL.

Zweifellos sind mit dem Peptid C4_C1_10er und der daraus abgeleiteten verbesserten Struktur NMWQRIGTPL Moleküle entdeckt worden, die in der Lage sind, an CD4 zu binden. Die Bindung wurde mit zwei unterschiedlichen Verfahren (NMR und Biacore) nachgewiesen. Die Wirksamkeit des Peptids C4_C1_10er als Inhibitor der HIV-Infektion läßt sich in biologischen Test eindrucksvoll belegen. Es ist also gelungen, aus den Informationen, die eine Röntgenstruktur von CD4 im Komplex mit gp120 lieferte und mit NMR-Daten, rational ein Peptid zu generieren, das die erwünschte Funktion erfüllt. Diese beiden Peptide können als Leitstrukturen für Inhibitoren der HIV-Infektion betrachtet werden.

6 Summary

The initial step in HIV infection is the adhesion of the virus to the target cell. The proteins involved in this process are the human glycoprotein CD4, which is expressed on leukocytes, and the glycoprotein gp120 on the surface of the virus particle. In 1998 an x-ray structure was published, which resolved this interaction on the molecular level. In the present work this interaction has been analyzed in depth. Six different peptide segments of gp120 were found to contribute to binding. These segments contain between three and nine amino acids respectively. Together, they represent the CD4-binding epitope of gp120. They are discontinuously distributed along the gp120 sequence, but spatially close and in contact to the CD4 protein. The sequences of the peptides are: TPL, DNAKT, SGGDPEI, NMWQKV, TRDGG, and RPPGGDMRD. These peptides were synthesized and screened for binding to CD4.

Further analysis of the x-ray structure showed that some of these segments may be bridged with short linkers, possibly resulting in molecules with higher affinity. Some other peptides with known affinity to the CD4 receptor were synthesized as a positive control. All peptides were prepared with a continuous flow peptide synthesizer or with a combinatorial chemistry synthesizer, respectively. The peptides were characterized with Maldi ToF mass spectrometry and NMR spectroscopy. The yields ranged from 23 to 78 % (for the continuous flow system) and from 8 to 39 % (for the combichem machine).

With SPR (Biacore) all peptides were screened for their binding ability to the CD4 receptor. At concentrations of 1 mM some of these peptides bind to the CD4 protein. Out of the gp120 derived peptides a tripeptide, TPL, and a hexapeptide, NMWQKV, showed binding affinity. In the primary sequence of the gp120 the tripeptide lies n-terminal to the hexapeptide, but according to the x-ray structure the c-terminus of the 6mer is in close contact to the n-terminus of the 3mer. Therefore, a hybrid peptide with the sequence NMWQKVGTPLE was synthesized, in which these two peptide segments are bridged with a glycine. This peptide is called C4_C1_10er and showed initially the best binding properties. A concentration series carried out with biacore instrument showed that C4_C1_10er has two different affinities to CD4. One can be saturated with a K_D value of 6 mM, the other one which occurs at concentrations over 3 mM could not be saturated. It is not possible to decide if the latter is non-specific or of a very low specific affinity. The determination of the binding epitope of the peptide C4_C1_10er using 1D and 2D STD-NMR-TOCSY and -HSQC experiments showed that parts of the amino acids tryptophane, lysine, valine, threonine and leucine are essentially responsible for the binding to CD4. Some weaker contacts from other amino acids were found in the 1D STD-NMR experiment. The

results of the NMR spectroscopy are in good agreement with the binding model derived from the x-ray structure.

To verify the result that C4_C1_10er has binding affinity towards CD4 a biological assay was carried out. It was found that the peptide has the ability to inhibit the HIV infection very effectively.

The relevance of individual amino acids of the peptide C4_C1_10er was tested by positional scanning. The results are in perfect agreement with the derived binding model from x-ray structure analysis and NMR spectroscopy. In particular, the important role of the tryptophane was proved by the loss of binding ability by 60 % when this amino acid was replaced by tyrosine. Exchanging the lysine with an arginine resulted in an improvement of 57 %. A 37 % improvement arose when the valine was replaced by isoleucine. Substituting the glutamine against serine was followed by an improvement of 15 %. By combining the substitutions it was possible to improve the binding by 174 % relative to the peptide C4_C1_10er. This optimized peptide has the sequence: NMWQRIGTPL.

The peptides C4_C1_10er and the optimized peptide NMWQRIGTPL are able to bind to the CD4 receptor without doubt. The binding was assessed by two different methods (NMR and SPR). The function of the peptide C4_C1_10er as an inhibitor for the HIV infection was demonstrated in biological tests. With a rational approach, based on crystallographic and NMR spectroscopic data, it has been possible to generate a peptide with inhibitory function against HIV infection. Both peptides can serve as possible lead structures for a new class of anti-HIV drugs, the HIV-entry-inhibitors.

7 Experimenteller Teil

7.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Tabelle 13 Im Rahmen dieser Arbeit benutzte Chemikalien.

Hersteller	Substanzen
Advanced ChemTech (Bamberg)	Fmoc-L-Alanin-OH, Fmoc-L-Arginin-(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asparagin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Aspartat-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cystein-(Trt)-OH, Fmoc-L-Glutamat-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Glutamin-(Trt)-OH, Fmoc-Glycin-OH, Fmoc-L-Histidin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Isoleucin-OH, Fmoc-L-Leucin-OH, Fmoc-L-Lysin-(Boc)-OH, Fmoc-L-Methionin-OH, Fmoc-L-Phenylalanin-OH, Fmoc-L-Prolin-OH, Fmoc-L-Serin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Threonin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Tryptophan-(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyrosin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Valin-OH
BIACORE AB (Uppsala)	NHS, EDC, EA, HBS-EP
Calbiochem-Novabiochem, (Bad Soden)	TBTU
Deutero (Kastellann)	Deuteriumoxid, 99.9 %
J.T. Baker (Deventer)	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade)
Lancaster, (Mühlheim an der Ruhr)	Triisopropylsilan 99 %
Merck (Darmstadt)	Aceton, Ammoniak, Methanol, Dichlormethan, 2-Propanol, tert-Butylmethylether, Diethylether, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Trifluoressigsäure, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat
PerSeptive Biosystems (Wiesbaden) seit 2000 Applied Biosystems	Fmoc-L-Alanin-OH, Fmoc-L-Arginin-(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asparagin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Aspartat-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cystein-(Trt)-OH, Fmoc-L-Glutamat-(OtBu)-OH, Fmoc-L-Glutamin-(Trt)-OH, Fmoc-Glycin-OH, Fmoc-L-Histidin-(Trt)-OH, Fmoc-L-Isoleucin-OH, Fmoc-L-Leucin-OH, Fmoc-L-Lysin-(Boc)-OH, Fmoc-L-Methionin-OH, Fmoc-L-Phenylalanin-OH, Fmoc-L-Prolin-OH, Fmoc-L-Serin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Threonin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Tryptophan-(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyrosin-(tBu)-OH, Fmoc-L-Valin-OH, Piperidin/DMF (1:5), HATU, DIPEA, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
Prologo, (Hamburg)	DMF

7.2 PROTEINE

7.2.1 Recombinant human soluble CD4 (Baculovirus)

100 µg (500 µg/mL) in PBS, pH: 7.2 (2.2 nmol) Reinheit größer 95 % Expressions System: Baculovirus, 55 kDa Protein beim SDS-PAGE, National Institute for Biological Standards and Control, Nr. (ARP608/609) <http://www.nibsc.ac.uk/catalog/aids-reagent> Gelagert bei -80 °C.

7.2.2 Recombinant human soluble CD4 (CHO)

1 mg (1 mg/mL) in 10 mM Histidin und 50 mM Mannitol mit 0.1 mg *Polysorbate* 80. Reinheit größer 95 %. Aminosäure 1-369 vom natürlichen CD4 (45 kDa). Expression System: CHO Cells. NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Rockville USA. Catalog Number: 1813 <http://www.aidsreagent.org/> Gelagert bei -80°C .

7.2.3 HIV-1 envelope gp120 antigen (recombinant)

100 μg (0.8 mg/mL, 6.7 μM) in 2X PBS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH: 7.4 . Glu-39 bis Arg-517 (120 kDa) von HIV-1 (SF2 Isolat)¹⁸³. Reinheit größer 95 %. HI1A-600-5 Australbio, San Ramon, USA <http://www.australbio.com> gelagert bei -20°C .

7.3 ULTRAFILTRATIONS- UND DIALYSEMATERIAL

Zum Dialysieren wurden *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes* der Firma Pierce, Rockford USA verwendet. Ausschlußgrenzen: 3.5 kDa und 10 kDa.

Centricon[®] 10, (No. 4205), (10 kDa Membran), Volumen: 2 mL, Amicon, Inc. Beverly, MA 01915 USA. Vor der Benutzung wurde die Membran zehnmals mit 2 mL H₂O (120 Minuten, 5000 g) gewaschen.

7.4 VERWENDETE PUFFER

Phosphatpuffer pH: 7.4 (H₂O, H₂O/D₂O, 9:1 oder D₂O)

20 mg KH₂PO₄, 144 mg Na₂HPO₄ und 20 mg KCl auf 100 mL mit Wasser, H₂O/D₂O, 9:1 oder D₂O aufgefüllt.

PBS-Puffer pH: 7.4 (H₂O/D₂O, 9:1 oder D₂O)

800 mg NaCl, 20 mg KCl, 144 mg Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 20 mg KH₂PO₄, 50 mg NaN₃ auf 100 mL mit H₂O/D₂O, 9:1 oder D₂O aufgefüllt.

PBS-Puffer pH: 7.4 (H₂O/D₂O, 5:1)

800 mg NaCl, 20 mg KCl, 144 mg Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 20 mg KH₂PO₄, 50 mg NaN₃ auf 10 mL mit H₂O/D₂O, 5:1 aufgefüllt.

7.5 VERWENDETE GERÄTE

DRX 500 Spektrometer

Alle NMR-Experimente (Ausnahme: HSQC-STD) wurden an einem DRX 500 Spektrometer der Firma Bruker am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Der Magnet besaß eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla und eine Larmor-Frequenz für Protonen von 499.87 MHz und 125.77 MHz für ¹³C-Kerne. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet. Die Spektren wurden bei Temperaturen zwischen 278 K und 300 K aufgenommen. 2D-Experimente wurden in F₁-Richtung phasensensitiv durch TPPI (*time proportional phase increment*) aufgenommen. Die Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kalibrierung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR (Ver.: 2.5) und Aurelia (Ver.: 2.5.9) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (O₂, Octane). Das HSQC-STD-NMR-Spektrum wurde an einem 500 MHz NMR-Spektrometer mit einem Cryo-Probenkopf bei der Firma Bruker in Zürich durchgeführt.

BIACORE 3000

Die SPR-Experimente wurden mit einem BIACORE 3000 Gerät und CM-5 Chips an der Medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen BIAevaluation (Ver.: 3.0.2) und BIACORE Control Software (Vers.: 3.0).

Eppendorf *Centrifuge* 5415C

Alle zu zentrifugierenden, nicht proteinhaltigen Proben wurden auf einer Eppendorf 5415C Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert.

SIGMA Laborzentrifuge 2K15

Proteinproben wurden bei 6 °C in einer Kühlzentrifuge 2K15 der Firma SIGMA zentrifugiert.

MALDI-TOF MS, Biflex III,

Die Aufnahme der Maldi-TOF-Spektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma *Bruker* im *reflector mode*. Die Peptide wurden in einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) –, oder α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure (CCA) - Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/ μ l vermessen.

BioCAD[®] Sprint[™] Perfusions Chromatography[®] System

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte an einer BioCAD Sprint HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden. Dabei wurden Säulen mit unterschiedlichen Materialien und Dimensionen verwendet.

Tabelle 14 **Verwendete HPLC-Säulen.**

Name	C18 anal.	C18 prep.
Bezeichnung	ET 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18	VP 250/21 NUCLEOSIL 100-7 C18
Art.-Nr.	720014	715652
Hersteller	MACHEREY-NAGEL	MACHEREY-NAGEL
Partikelgröße	5 μ m	7 μ m
Länge	250 mm	250 mm
Durchmesser	4 mm	21 mm
Volumen	3.142 mL	86.590 mL
Name	C8 semiprep.	C18 Vydac
Bezeichnung	SP 250/10 NUCLEOSIL 100-7 C8	PROTEIN & PEPTIDE C18
Art.-Nr.	715001	218TP510
Hersteller	MACHEREY-NAGEL	Vydac
Partikelgröße	7 μ m	5 μ m
Länge	250 mm	250 mm
Durchmesser	10 mm	10 mm
Volumen	19.635 mL	19.635 mL

Als Fraktionssammler war ein GILSON[®] FC205 „*Fraction Collector*“ angeschlossen.

Pioneer[™] Peptide Synthesis System

Die Peptide C1_3er, V5_5er, C2_5er, Rev_C2_5er, PeptideT4-8, C3_7er, Rev_C3_7er, C4_6er, PeptideT, C5_V5_9er, VIP5-12, C2_10er, C4_C1_10er, C4_C1_10er_Q4S_K5R-V6I, C4_C1_10er_K5R_V6I und VIP1-12 wurden an einem Festphasenpeptidsynthesizer der Firma PerSeptive Biosystems mit Fmoc-geschützten L-Aminosäuren durchgeführt.

Advanced Chemtech MOS 496 Ω

Die Peptide C4_C1_10er_M2S, C4_C1_10er_Q4S, C4_C1_10er_W3Y, Rev_C4_C1_10er, C4_C1_10er_G7A, C4_C1_10er_V6I, C4_C1_10er_N1E, C4_C1_10er_K5R, C4_C1_10er_G7P, C4_C1_11er und C4_C1_11er_I(-1)F wurden an einem Syntheseroboter

MOS 496 Ω der Firma Advanced ChemTech mit Fmoc-geschützten L-Aminosäuren durchgeführt.

7.6 PEPTIDSYNTHESEN

7.6.1 Allgemeines

Beim Peptidsynthesizer (*Pioneer Peptide Synthesis System*) der Firma *PerSeptive Biosystems* wird das PAL-PEG-PS-Harz in einer Stempelsäule mit Frittenboden eingewogen. Die Aminosäuren werden als N-terminal Fmoc- und gegebenenfalls seitenkettengeschützte Derivate, in vierfachem Überschuß und in Abhängigkeit der Kupplungsanzahl entsprechend mehrfach eingewogen und in Reihenfolge der vorgegebenen Peptidsequenz an das Harz angeknüpft. Als Aktivator wird HATU oder TBTU in fünffachem Überschuß in Gegenwart von einem zehnfachem Überschuß an DIPEA verwendet. Nach jeder angeknüpften Aminosäure wird zur Blockierung noch freier funktioneller Gruppen mit Acetanhydrid in DMF (1:10) über jeweils 5 Minuten acetyliert. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgt mit Piperidin in DMF (1:4).

7.6.2 Abspaltung vom Harz

Vor der Abspaltung wurde das Harz mit Methanol und Dichlormethan gewaschen und mehrere Stunde an der Ölpumpe im Hochvakuum getrocknet. Ab dem 04.05.2000 wurde das Methanol gegen Isopropanol ersetzt. Damit soll die Bildung von Peptiden mit einer um 14 größeren Masse verhindert werden¹⁸⁴. Zur Abspaltung der Peptide wird das Harz in einer Glasfritte (G2) mit einer Mischung aus TFA/TIPS/Wasser (95:5:5) bedeckt und für 90 bis 100 Minuten oder zwei mal 30 Minuten geschüttelt. Die Lösung wird abgesaugt, das Harz dreimal mit TFA/TIPS/Wasser (95:5:5) gewaschen und die Abspalt-Lösung gesammelt.

7.6.3 Direktes Einengen

Die Abspalt-Lösung wurde im Hochvakkum zur Trockne eingengt, mit Wasser wieder aufgenommen und anschließend gefriergetrocknet.

7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether

Die Abspalt-Lösung wurde mit 80 mL 20 %iger Essigsäure verdünnt und fünfmal mit je 50 mL, auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten tert-Butylmethylether, ausgeschüttelt¹⁸⁶. Die wäßrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und an einer Ölpumpe im Hochvakuum bis zur Trockne lyophilisiert. Anschließend wurde mit Wasser wieder aufgenommen und gefriergetrocknet.

7.6.5 Reinigung der Peptide mittels HPLC

Je nach Löslichkeit wurden 1 - 20 mg des jeweiligen trocknen Rohproduktes in 1 mL Wasser/Acetonitril (95:5) mit 0.1 % TFA gelöst und unlösliche Verunreinigungen über einen $0.2\text{ }\mu\text{m}$ Filter (z.B: Schleicher& Schuell, FP 13/0,2 RC-S) abfiltriert. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte an einer BioCAD Sprint HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Wiesbaden. Dabei wurden Säulen mit unterschiedlichen Materialien und Dimensionen verwendet (siehe Tabelle 14). Je nach Trennproblem wurden unterschiedliche Gradienten zwischen Eluent C ($\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}$ (95:5) mit 0.1 % TFA) und Eluent D ($\text{Acetonitril}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5) mit 0.1 % TFA) verwendet. Die Fraktionen wurden mit dem angeschlossenen Fraktionssammler mit Peak-Erkennung in Glas-Reagenzgläser gesammelt. Die Fraktionen des Ziel-Peptids wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

7.6.6 Lagerung der Peptide

Alle Peptide wurde lyophilisiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert.

7.6.7 Charakterisierung mit MALDI-TOF und NMR

Die Peptide wurden mittels MALDI-TOF-MS und NMR identifiziert. Die NMR-Spektren der Peptide wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 bis 4.5 (angesäuert mit TFA) bei 280 bis 300 K aufgenommen. Die Zuordnung der ^1H -Signale erfolgte mit Hilfe von 1D ^1H -Spektren und 2D TOCSY- und NOESY-Experimenten, während die ^{13}C -chemischen Verschiebungen aus dem HSQC-Spektrum ermittelt wurden. Die 1D ^1H -Spektren wurden mit

dem Pulsprogramm *zg*, *zgp* oder *p3919gp* aufgenommen. Der Phasenfehler der Spektren wurde korrigiert und anschließend eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom fünften Grades durchgeführt. Die TOCSY-Spektren wurden mit den Pulssequenzen *mlevgstp19* aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm wurden 8 bis 40 Scans mit 4 k Datenpunkten und 256 oder 512 Inkrementen aufgenommen. In F1- und F2-Dimension wurde typischerweise mit einer um 90° verschobenen Quadrat-Sinusfunktion multipliziert.

Die NOESY-Spektren wurden mit der Pulssequenz *noesygstp19* aufgenommen. Bei einer Spektrenweite von 10 ppm wurden 32 Scans mit 4 k Datenpunkten und 512 Inkrementen aufgenommen. In F1- und F2-Dimension wurde typischerweise mit einer um 90° verschobenen Quadrat-Sinusfunktion multipliziert.

7.6.8 Parallel-Synthesen

An dem Syntheseroboter MOS 496 Ω wurden in zwei Ansätzen elf und 30 Peptide parallel synthetisiert. In dem einen Ansatz wurden elf 11er-Peptide in je 10 μ mol Ansätzen mit einem 2,5-fachem Überschuß an Aminosäure (Doppelkupplung, 60 und 90 Minuten), fünffachem Überschuß an HATU und zehnfachem Überschuß an DIPEA durchgeführt. Bei dem zweiten Ansatz wurden 30 10er-Peptide in je 10 μ M unter gleichen Bedingungen wie beim ersten Ansatz durchgeführt. Für die Abspaltung wurde das mit Isopropanol und Dichlormethan gewaschene und getrocknete Harz zweimal mit je 2 mL Abspalllösung (95:5:5 TFA, H₂O, TIPS) über 90 Minuten behandelt. Anschließend wurde noch viermal mit je 1 mL der Abspalllösung nachgewaschen, die Lösungen vereinigt und an der Ölpumpe zur Trockne eingengt. Danach wurde mit Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

7.6.9 Peptide

7.6.9.1 C1_3er

Sequenz:	T-P-L-NH ₂
Ansatzgröße:	2 · 50 μ mol
Harzmenge:	333 mg
Theoretische Ausbeute:	16 mg
Einfachkupplung:	30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	39 %
Synthesedauer:	2 h 47 min

Aminosäuren: Thr 79 mg, Pro 67 mg, Leu 71 mg
 Abspaltung: 4 mL Abspaltungslösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 min
 Vorreinigung: Kapitel 7.6.3 Direktes Einengen
 HPLC: C8 semiprep., 5 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 11.6 min, 61.1 %
 D
 NMR: 2.8 mg in 500 µl PBS-Puffer (H₂O/D₂O 9:1), 300 K

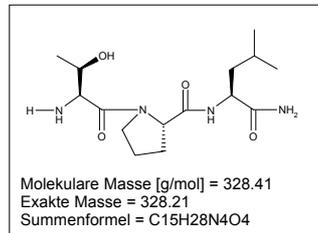


Tabelle 15 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C1_3er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
T	--	4.141	4.141	1.319	--	--
P	--	4.462	2.310/1.946	1.946	3.763/3.656	--
L	8.322	4.221	1.636	1.543	0.900/0.853	--
NH ₂	7.516/7.002	--	--	--	--	--

7.6.9.2 V5_5er

Sequenz: T-R-D-G-G-NH₂
 Ansatzgröße: 50 µmol
 Harzmenge: 333 mg
 Theoretische Ausbeute: 25 mg
 Einfachkupplung: 30 min
 Aktivator: HATU
 Ausbeute: 64 %
 Synthesedauer: 4 h 28 min
 Aminosäuren: Asp 82 mg, Gly 2 · 59 mg, Arg 130 mg, Thr 79 mg
 Abspaltung: 2:30 Minuten mit je 4 mL Abspaltungslösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS).
 Vorreinigung: Kapitel 7.6.3 Direktes Einengen
 HPLC: C8 semiprep., 5 mL/min, 1 CV 0 % D, 2 CV 0-100 % D, Peak: 4.6 min, 8.5 % D
 MALDI-TOF (m/z): 504.21 [M]⁺, 526.17 [M+Na]⁺, 542.14 [M+K]⁺
 Berechnet: 503.52 g/mol
 NMR: 6 mg in 650 µl (H₂O/D₂O 9:1), 300 K

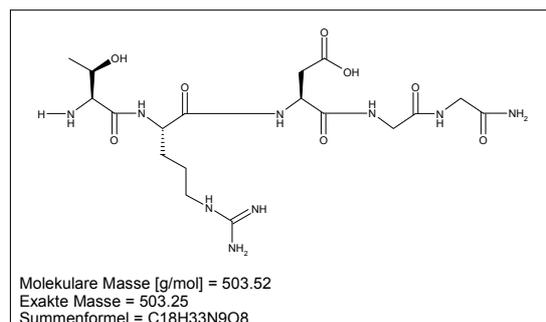


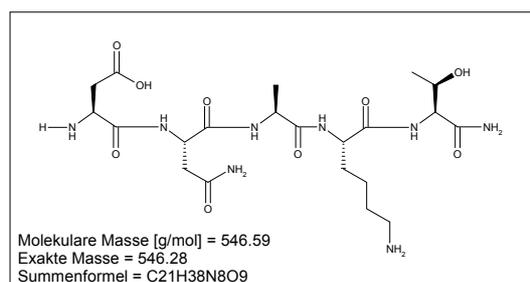
Tabelle 16 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids V5_5er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
T	--	4.143	3.849	1.259	--	--
R	8.720	4.336	1.819 / 1.737	1.590	3.151	NH 7.126/6.590
D	8.127	4.441	2.781 / 2.662	--	--	--
G*	8.270	3.838	--	--	--	--
G*	8.352	3.869	--	--	--	--
NH ₂	7.460 / 7.015	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.3 C2_5er

Sequenz:	D-N-A-K-T-NH ₂
Ansatzgröße:	50 μmol
Harzmenge:	333 mg
Theoretische Ausbeute:	27 mg
Einfachkupplung:	30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	43 %
Synthesedauer:	4 h 28 min
Aminosäuren:	Ala 62 mg, Asp 82 mg, Lys 94 mg, Asn 119 mg, Thr 79 mg
Abspaltung:	12 mL Abspaltlösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C8, semiprep., 1 CV 0 % D, 2 CV 0-100 % D, Peak: 4.5 min, 7.5 % D
MALDI-TOF (m/z)	546.95 [M] ⁺ , 568.68 [M+Na] ⁺ , 584.62 [M+K] ⁺ Berechnet: 546.59 g/mol
NMR	5 mg in 500 μl PBS-Puffer (H ₂ O/D ₂ O 9:1), 300 K

Tabelle 17 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C2_5er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
D	-	Überlagert mit N.	Überlagert mit N.	--	--	--
N	8.767	4.211	2.829/2.714	--	--	γNH ₂ 7.576/6.908
A	8.331	4.245	1.364	--	--	--
K	8.319	4.329	1.846/1.759	1.405	1.651	εCH ₂ 2.972 εNH ₂ 7.475
T	8.000	4.267	4.208	1.160	--	--

NH ₂	7.528/7.109	--	--	--	--	--
-----------------	-------------	----	----	----	----	----

7.6.9.4 Rev_C2_5er

Sequenz:	T-K-A-N-D-NH ₂
Ansatzgröße:	75 µmol
Harzmenge:	395 mg
Theoretische Ausbeute:	41 mg
Doppelkupplung:	30 + 30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	49 %
Synthesedauer:	8 h 15 min
Aminosäuren:	Ala 2 · 93 mg, Asp 2 · 123 mg, Lys 2 · 141 mg, Asn 2 · 179 mg, Thr 2 · 119 mg
Abspaltung:	12 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C8, semiprep., 1 CV 0 % D, 2 CV 0-100 % D, Peak: 4.5 Minuten 7.5 % D
MALDI-TOF (m/z)	546.71 [M] ⁺ , 568.68 [M+Na] ⁺ , 584.79 [M+K] ⁺ Berechnet: 546.59 g/mol
NMR	3 mg in 500 µl H ₂ O/D ₂ O 9:1, 300 K

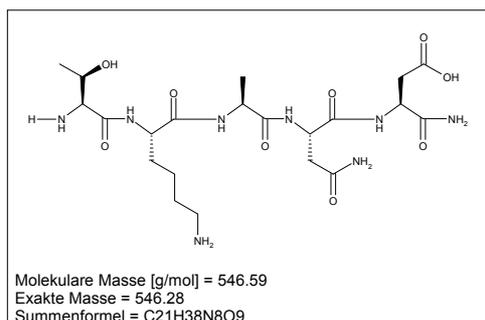


Tabelle 18 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids Rev_C2_5er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
T	--	4.158	3.891	1.302	--	--
K	8.759	4.344	1.820/1.769	1.433	1.680	εCH ₂ 3.002 εNH ₂ 7.502
A	8.464	4.270	1.381	--	--	--
N	8.433	4.673	2.765/2.832	--	--	γNH ₂ 7.593/6.891
D	8.341	4.700	2.900/2.851	--	--	--
NH ₂	7.523/7.141	--	--	--	--	--

7.6.9.5 PeptideT4-8

Sequenz:	T-T-N-Y-T-NH ₂
Ansatzgröße:	139 µmol
Harzmenge:	927 mg
Theoretische Ausbeute:	83 mg

Doppelkupplung:	30 + 30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	61 %
Synthesedauer:	8 h 24 min
Aminosäuren:	Asn 2 · 332 mg, Thr 6 · 221 mg, Tyr 2 · 254 mg
Abspaltung:	22 mL Abspaltlösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C18, prep., 2 CV 0-50 % D, 1 CV 50-100 % D, Peak bei 6.8 min, 13.7 % D
MALDI-TOF (m/z)	597.56 [M] ⁺ , 619.71 [M+Na] ⁺ , 635.78 [M+K] ⁺ Berechnet: 597.63 g/mol
NMR	4.2 mg in 650 µl (H ₂ O/D ₂ O 9:1), 300 K

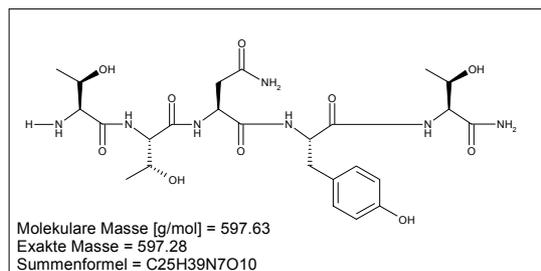


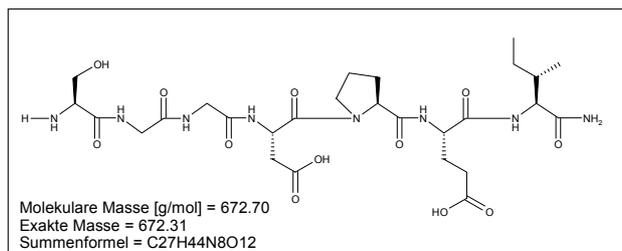
Tabelle 19 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids PeptideT4-8 in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
T*	--	4.013	3.801	1.127	--	--
T*	8.519	4.175	3.900	0.940	--	--
N	8.354	4.537	2.602/2.511	--	--	γNH ₂ 7.368/6.690
Y	8.150	4.450	2.898/2.801	--	--	2,6 H 6.974 3,5 H 6.669
T*	7.905	4.074	4.040	0.983	--	--
NH ₂	6.909/6.856	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.6 C3_7er

Sequenz:	S-G-G-D-P-E-I-NH ₂
Ansatzgröße:	50 µmol
Harzmenge:	333 mg
Theoretische Ausbeute:	34 mg
Einfachkupplung:	30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	36 %, (Reinheit: ~ 60 %, Abbruchpeptide 4er und 5er enthalten, nicht trennbar über RP-HPLC (C ₈ oder C ₁₈))
Synthesedauer:	6 h 09 min
Aminosäuren:	Asp 82 mg, Glu 85 mg, Gly 2 · 59 mg, Ile 71 mg, Pro 67 mg, Ser 77 mg
Abspaltung:	Je 4 mL Abspaltlösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 2 · 30 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.3 Direktes Einengen
HPLC:	C8, semiprep., 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak bei 11.5 Minuten 64.4 % D
MALDI-TOF (m/z)	671.19 [M] ⁺ , 694.18 [M+Na] ⁺ , 710.66 [M+K] ⁺ Berechnet: 672.70 g/mol
NMR	3.1 mg in 650 µl (H ₂ O/D ₂ O 9:1), 300 K

Tabelle 20 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C3_7er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
S	--	4.045	3.835	--	--	--
G*	8.277	3.776	--	--	--	--
G*	8.671	3.867	--	--	--	--
D	8.247	4.805	2.767/2.561	--	--	--
P	--	4.250	1.845/1.763	2.110	3.639/3.580	--
E	8.182	4.170	1.932/1.829	2.304	--	--
I	7.908	3.971	1.676	1.292/1.015	0.692	--
				CH ₃ 0.751		
NH ₂	7.508/6.983	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.7 Rev_C3_7er

Sequenz:	I-E-P-D-G-G-S-NH ₂
Ansatzgröße:	50 μmol
Harzmenge:	333 mg
Theoretische Ausbeute:	34 mg
Doppelkupplung:	30 + 60 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	78 %
Synthesedauer:	14 h 48 min
Aminosäuren:	Asp 2 · 82 mg, Glu 2 · 85 mg, Gly 4 · 59 mg, Ile 2 · 71 mg, Pro 2 · 67 mg, Ser 2 · 77 mg
Abspaltung:	12 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C8, semiprep., 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 10.5 min, 55.4 % D
MALDI-TOF (m/z)	673.37 [M] ⁺ , 695.39 [M+Na] ⁺ , 711.38 [M+K] ⁺ Berechnet: 672.70 g/mol
NMR	4 mg in 500 μL H ₂ O/D ₂ O 9:1, 300 K

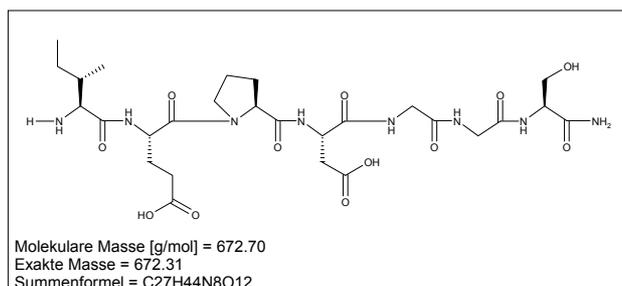


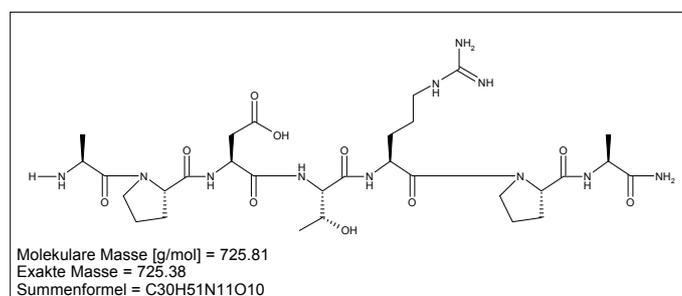
Tabelle 21 $^1\text{H-NMR}$ chemische Verschiebungen des Peptids Rev_C3_7er in ppm.

AS	N_H	$\text{C}_{\text{H}\alpha}$	$\text{C}_{\text{H}\beta}$	$\text{C}_{\text{H}\gamma}$	$\text{C}_{\text{H}\delta}$	Andere
I	--	3.831	1.891	1.429/1.162 CH_3 0.917	0.854	--
E	8.631	4.711	2.091/1.867	2.449	--	--
P	--	4.371	2.249/1.889	1.981	3.775/3.678	--
D	8.510	4.623	2.847	--	--	--
G*	8.357	3.918	--	--	--	--
G*	8.179	3.939	--	--	--	--
S	8.189	4.371	3.829	--	--	--
NH_2	7.587/7.099	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

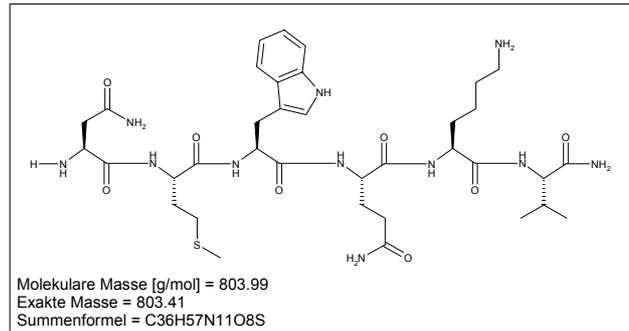
7.6.9.8 HM_7er

Von H. Möller zu Verfügung gestellt¹⁸⁵.



7.6.9.9 C4_6er

Sequenz:	N-M-W-Q-K-V-NH ₂
Ansatzgröße:	50 μmol
Harzmenge:	333 mg
Theoretische Ausbeute:	40 mg
Einfachkupplung:	30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	47 %
Synthesedauer:	5 h 18 min
Aminosäuren:	Lys 94 mg, Met 74 mg, Asn 119 mg, Gln 122 mg, Val 68 mg, Trp 105 mg
Abspaltung:	4 mL Abspaltungslösung „Reagent B“ ¹⁸⁶ (88 %TFA, 5 % Phenol, 5 % Wasser, 2 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC	C8, semiprep., 1 CV 0 % D, 0.3 CV 0-20 %, 4 CV 20-60 %, 1 CV 60-100 % D, Peak: 11.9 min, 37.4 % D
MALDI-TOF (m/z)	804.45 [M] ⁺ , 826.46 [M+Na] ⁺ , 842.42 [M+K] ⁺ Berechnet: 803.99 g/mol
NMR	5.6 mg Peptid in 500 μL PBS-Puffer führte zur Bildung eines weißen, flockigen Niederschlages (schlecht löslich bei der Ionenstärke). 3.8 mg, 650 μL H ₂ O/D ₂ O (9:1), 300 K

Tabelle 22 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C4_6er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
N	--	4.277	2.849	--	--	γNH ₂ 7.725/7.067*
M	8.800	4.430	1.943/1.871	2.361	--	--
W	8.307	4.636	3.300/3.249	--	--	H2: 7.259 H4: 7.597 H5: 7.145 H6: 7.233 H7: 7.491
Q	8.004	4.198	1.938/1.823	2.212/2.137	--	γCH ₂ 7.565/6.920*
K	8.343	4.172	1.753	1.398	1.689	εCH ₂ 2.997 εNH ₂ 7.598
V	8.328	4.043	2.025	0.954	--	--
NH ₂	7.848/7.219	--	--	--	--	--

* Nicht unterscheidbar zwischen Q und N.

7.6.9.10 C2_7er_NAc

Das Peptid (Abbruchpeptid bei der Synthese von C2_10er_CHI) wurde von Dr. S. Meyer und A. Kahrs zu Verfügung gestellt.

MALDI-TOF (m/z) 838.37 [M]⁺, 860.34 [M+Na]⁺, 876.27 [M+K]⁺
Berechnet: 836.91 g/mol
NMR 4 mg in 650 µl (H₂O/D₂O 9:1), 300 K

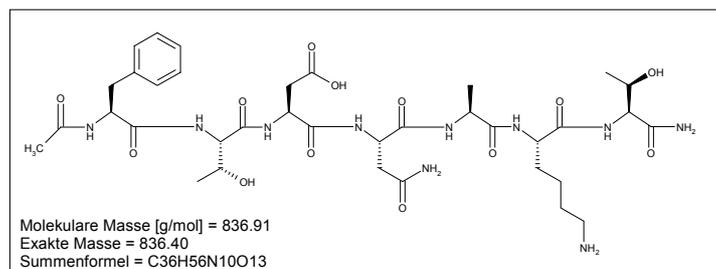


Tabelle 23 $^1\text{H-NMR}$ chemische Verschiebungen des Peptids C2_7er_NAc in ppm.

AS	N_H	$\text{C}_{\text{H}\alpha}$	$\text{C}_{\text{H}\beta}$	$\text{C}_{\text{H}\gamma}$	$\text{C}_{\text{H}\delta}$	Andere
Ac	--	--	--	--	--	1.942
F	8.258	4.645	3.129/3.002	--	--	2,6 H 7.264 3,5 H 7.357 4 H 7.298
T*	8.070	4.307	4.163	1.139	--	--
D*	8.384	4.637	2.820/2.736	--	--	--
N*	8.285	4.557	2.741/2.627	--	--	γNH_2 7.561/6.872
A	8.229	4.269	1.391	--	--	--
K	8.202	4.342	1.874/1.786	1.427	1.673	ϵCH_2 2.984 ϵNH_2 7.501
T*	7.977	4.287	4.235	1.186	--	--
NH_2	7.539/7.133	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.11 PeptideT

Sequenz:	A-S-T-T-T-N-Y-T- NH_2
Ansatzgröße:	75 μmol
Harzmenge:	395 mg
Theoretische Ausbeute:	64 mg
Dreifachkupplung:	15 + 30 + 30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	45 %
Synthesedauer:	15 h 35 min
Aminosäuren:	Ala 3 · 93 mg, Asn 3 · 179 mg, Ser 3 · 115 mg, Thr 12 · 119 mg, Tyr 3 · 137 mg
Abspaltung:	11 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C18, prep., 2 CV 0-50 % D, 1 CV 50-100 % D, Peak: 6.9 min, 14.1 % D
MALDI-TOF (m/z)	857.21 $[\text{M}]^+$, 879.30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 895.21 $[\text{M}+\text{K}]^+$ Berechnet: 856.89 g/mol
NMR	5 mg in 650 μl ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1), 300 K

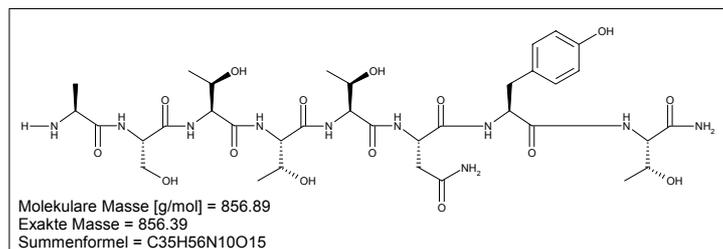


Tabelle 24 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids PeptideT in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
A	--	3.986	1.390	--	--	--
S	8.560	4.440	3.730	--	--	--
T*	8.175	4.294	4.124	1.052	--	--
T*	8.084	4.266	4.076	1.026	--	--
T*	8.011	4.130	3.942	0.945	--	--
N	8.232	4.530	2.605/2.517	--	--	γNH ₂ 7.368/6.689
Y	8.090	4.456	2.898/2.825	--	--	2,6 H 6.975 3,5 H 6.674
T*	7.887	4.079	4.052	0.986	--	--
NH ₂	6.978/6.678	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.12 C5_V5_9er

Sequenz:	R-P-G-G-G-D-M-R-D-NH ₂
Ansatzgröße:	50 μmol
Harzmenge:	333 mg
Theoretische Ausbeute:	48 mg
Einfachkupplung:	30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	49 %
Synthesedauer:	7 h 50 min
Aminosäuren:	Asp 2 · 82 mg, Gly 3 · 59 mg, Met 74 mg, Pro 67 mg, Arg 2 · 130 mg
Abspaltung:	4 mL Abspaltlösung „Reagent B“ ¹⁸⁶ (88 %TFA, 5 % Phenol, 5 % Wasser, 2 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C8, semiprep., 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 11.0 min, 61.4 % D
MALDI-TOF (m/z)	959.34 [M] ⁺ , 981.31 [M+Na] ⁺ , 1003.31 [M+2Na] ⁺ Berechnet: 959.06 g/mol
NMR	4 mg in 500 μl H ₂ O/D ₂ O 9:1, 280 K

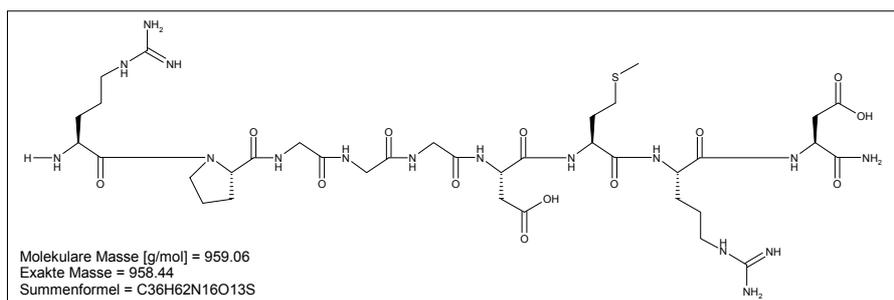


Tabelle 25 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C5_V5_9er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
R	--	4.432	1.966/1.732	1.681	3.241	NH 7.281 6.944
P	--	4.537	2.377/1.976	2.093/2.033	3.800/3.621	--
G*	8.815	4.026	--	--	--	--
G*	8.526	3.965	--	--	--	--
G*	8.447	4.012	--	--	--	--
D*	8.506	4.686	2.897/2.803#	--	--	--
M	8.560	4.473	2.130/2.044	2.630/2.544	--	εCH ₃ 2.100
R	8.467	4.298	1.866/1.806	1.636	3.216	NH 7.301 6.516
D*	8.475	4.665	2.897/2.803#	--	--	--
NH ₂	7.578/7.251	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung. # Überlagert.

7.6.9.13 VIP5-12

Sequenz:	L-F-T-D-N-Y-T-R-NH ₂
Ansatzgröße:	75 μmol
Harzmenge:	395 mg
Theoretische Ausbeute:	77 mg
Dreifachkupplung:	15 + 30 + 30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	51 %
Synthesedauer:	15 h 35 min
Aminosäuren:	Asp 3 · 123 mg, Phe 3 · 116 mg, Leu 3 · 106 mg, Asn 3 · 179 mg, Arg 3 · 195 mg, Thr 6 · 119 mg, Tyr 3 · 137 mg
Abspaltung:	12 mL Abspaltlösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C18 prep., 15 mL/min, 1 CV 0 % D, 2 CV 0-50 % D, 1 CV 50-100 % D, Peak: 15.6 min, 44.5 % D
MALDI-TOF (m/z)	1027.45 [M] ⁺ , 1049.31 [M+Na] ⁺ , 1065.50 [M+K] ⁺ Berechnet: 1028.14 g/mol
NMR	4.0 mg in 650 μL H ₂ O/D ₂ O 9:1, 300 K

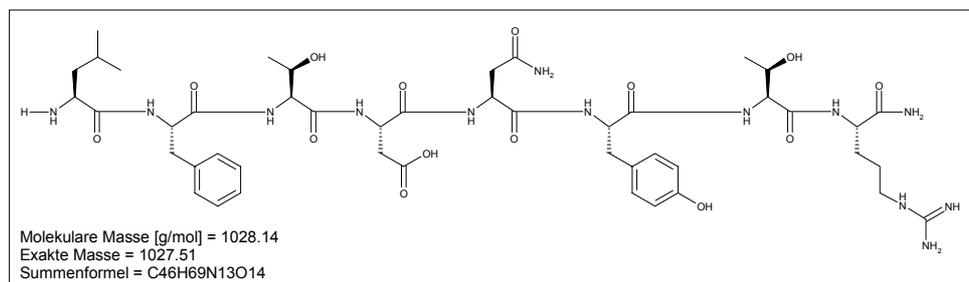


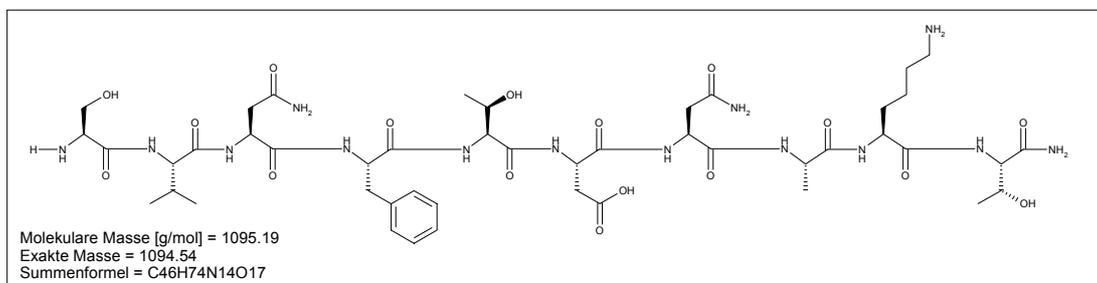
Tabelle 26 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids VIP5-12 in ppm.

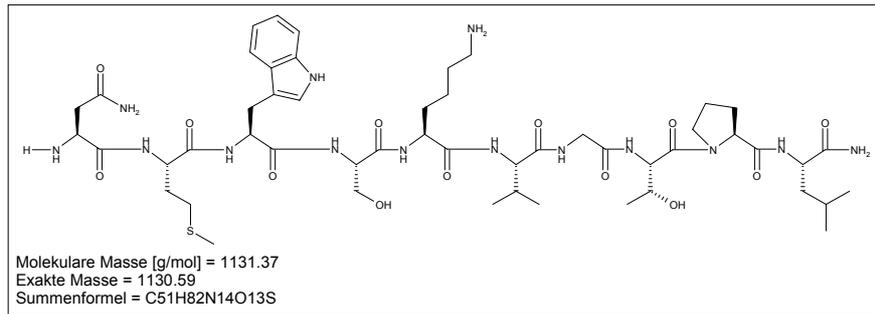
AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
L	--	3.955	1.654	1.581	0.911/0.890	--
F	8.755	4.742	3.132/3.068	--	--	2,6 H 7.262 3,5 H 7.355 4 H 7.301
T*	8.025	4.245	4.138	1.149	--	--
D*	8.312	4.635	2.733/2.640	--	--	--
N*	8.266	4.581	2.812/2.728	--	--	γNH ₂ 7.493/6.831
Y	8.067	4.580	3.064/2.973	--	--	2,6 H 7.100 3,5 H 6.807
T*	8.050	4.269	4.113	1.113	--	--
R	8.123	4.254	1.858/1.729	1.618	3.205	NH 7.156/6.625
NH ₂	7.514/7.109	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.14 C2_10er

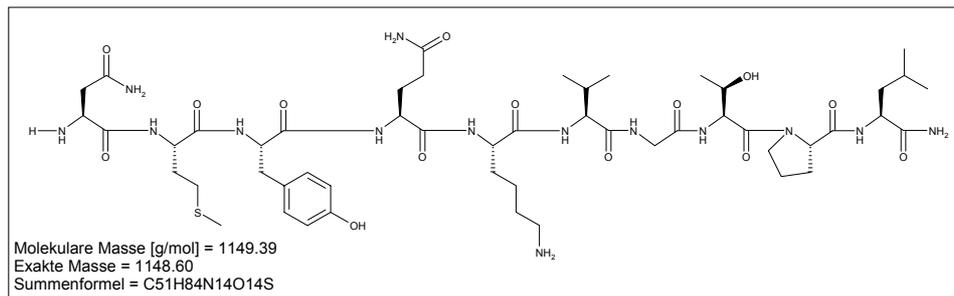
Sequenz:	S-V-N-F-T-D-N-A-K-T-NH ₂
Ansatzgröße:	75 μmol
Harzmenge:	395 mg
Theoretische Ausbeute:	82 mg
Dreifachkupplung:	30 + 30 + 90 Minuten für die erste AS, alle anderen 15 + 30 + 30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	54 %
Synthesedauer:	21 h 07 min
Aminosäuren:	Ala 3 · 93 mg, Asp 3 · 123 mg, Phe 3 · 116 mg, Lys 3 · 141 mg, Asn 6 · 179 mg, Ser 3 · 115 mg, Thr 6 · 119 mg, Val 3 · 102 mg,
Abspaltung:	12 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 100 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.3 Direktes Einengen
HPLC:	C18 prep., 15 mL/min, 1 CV 0 % D, 2 CV 0-50 % D, 1 CV 50-100 %D, Peak: 13.6 min, 37.5 % D
MALDI-TOF (m/z)	1094.71 [M] ⁺ , 1116.54 [M+Na] ⁺ , 1132.81 [M+K] ⁺ Berechnet: 1095.19 g/mol
NMR	4.1 mg in 600 μL H ₂ O/D ₂ O 9:1, 300 K





7.6.9.17 C4_C1_W3Y

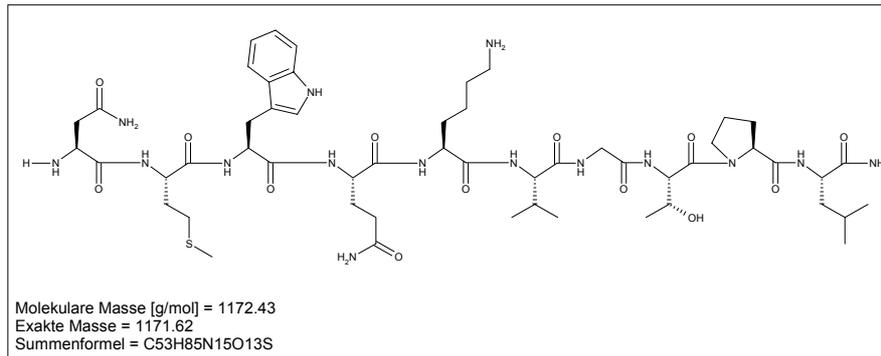
Sequenz:	N-M-Y-Q-K-V-G-T-P-L-NH ₂
Theoretische Ausbeute:	11.5 mg
Ausbeute:	22 %
HPLC:	C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 10.3 min, 54.0 % D
MALDI-TOF (m/z)	1149.34 [M] ⁺ , 1172.79 [M+Na] ⁺ , 1188.15 [M+K] ⁺ Berechnet: 1149.39 g/mol



7.6.9.18 C4_C1_10er

Sequenz:	N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L-NH ₂
Ansatzgröße:	50 µmol
Harzmenge:	263 mg
Theoretische Ausbeute:	59 mg
Dreifachkupplung:	15 + 30 + 30 min
Aktivator:	HATU
Ausbeute:	49 %
Synthesedauer:	19 h 16 min
Aminosäuren:	Gly 3 · 59 mg, Lys 3 · 94 mg, Leu 3 · 71 mg, Met 3 · 74 mg, Asn 3 · 119 mg, Pro 3 · 67 mg, Gln 3 · 122 mg, Thr 3 · 79 mg, Val 3 · 68 mg, Trp 3 · 105 mg
Abspaltung:	12 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
HPLC:	C18 prep. 15 mL./Minuten 1CV 0 % D, 2CV 0-50 % D, 1CV 50-100 % D Peak: 17.1 min, 49.4 % D
MALDI-TOF (m/z)	1173.30 [M] ⁺ , 1195.31 [M+Na] ⁺ , 1211.30 [M+K] ⁺ Berechnet: 1172.43 g/mol

NMR

6.1 mg in 600 μ L H₂O/D₂O 9:1, 300 KTabelle 28 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C4_C1_10er in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
N	--	4.310	2.8707	--	--	γNH ₂ 7.455/6.827*
M	8.701	4.445	1.920	2.384	--	εCH ₃ 2.034
W	8.181	4.686	3.325/3.270	--	--	H2: 7.277 H4: 7.636 H5: 7.172 H6: 7.260 H7: 7.516
Q	8.013	4.253	1.987/1.856	2.205	--	γCH ₂ 7.633/7.010*
K	8.221	4.234	1.805/1.716	1.404	1.690	εCH ₂ 3.001 εNH ₂ 7.534
V	8.172	4.129	2.090	0.968	--	--
G	8.532	4.000	--	--	--	--
T	8.051	4.634	4.168	1.257	--	--
P	--	4.417	2.306/1.933	2.057/1.995	3.863/3.724	--
L	8.293	4.283	1.604	1.677	0.950/0.900	--
NH ₂	7.559/7.069	--	--	--	--	--

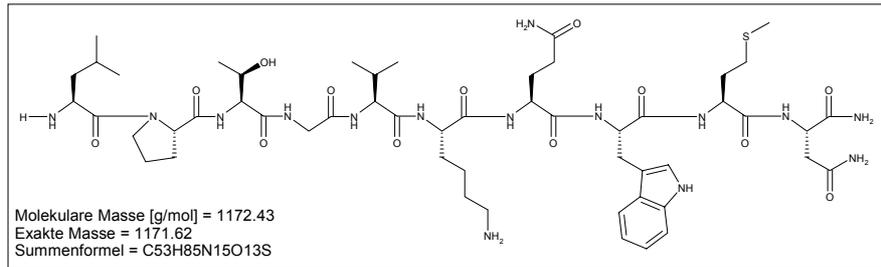
* Nicht unterscheidbar zwischen Q und N.

Tabelle 29 ¹³C-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C4_C1_10er in ppm.

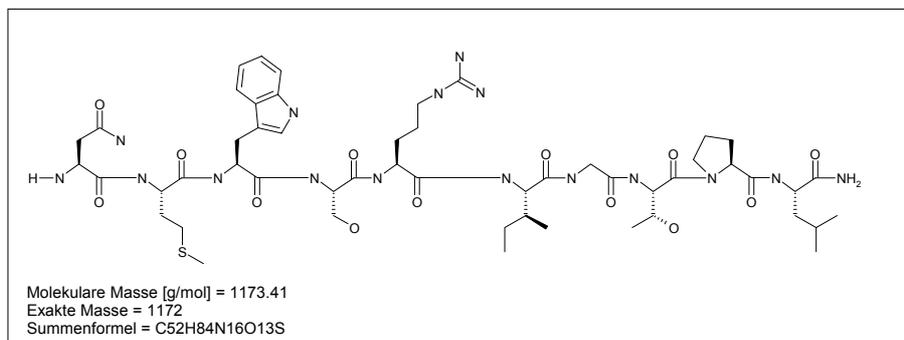
AS	α	β	γ	δ	ε
N	43.376	37.771	-	-	-
M	54.427	28.325	32.021	-	15.200 (kalibriert)
W	55.910	27.662	-	-	C2: 126.23 C4: 119.90 C5: 121.15 C6: 123.76 C7: 113.67
Q	54.436	30.1	29.959	-	-
K	54.	27.714	23.304	27.730	40.403
V	61.063	31.	19.381	-	-
G	51.454	-	-	-	-
T	58.455	68.283	19.809	-	-
P	61.857	30.5	26.062	49.730	-
L	53.6	40.873	25.575	21.778 / 23.423	-

7.6.9.19 Rev_C4_C1_10er

Sequenz: L-P-T-G-V-K-Q-W-M-N-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 11.7 mg
 Ausbeute: 48 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-35 % D, 1 CV 35-100 % D
 Peak: 15.2 min, 34.0 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1172.39 [M]⁺, 1195.01 [M+Na]⁺, 1210.33 [M+K]⁺
 Berechnet: 1172.43 g/mol

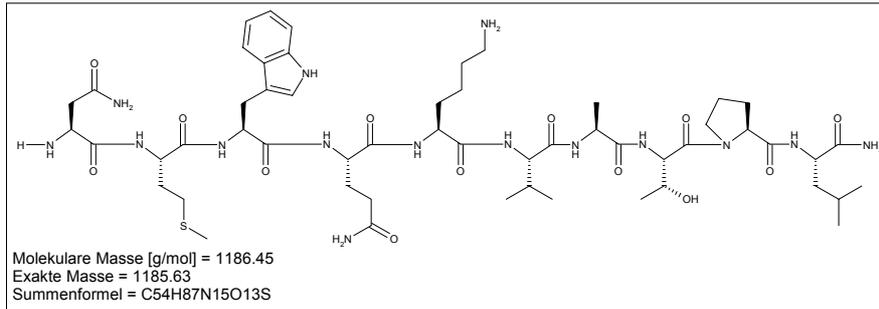
**7.6.9.20 C4_C1_10er_Q4S_K5R_V6I**

Sequenz: N-M-W-S-R-I-G-T-P-L-NH₂
 Ansatzgröße: 50 µmol
 Harzmenge: 278 mg
 Theoretische Ausbeute: 59 mg
 Dreifachkupplung: 30 + 60 + 90 min
 Aktivator: TBTU
 Ausbeute: 42 %
 Synthesedauer: 35 h 52 min
 Aminosäuren: Gly 3 · 59 mg, Arg 3 · 130 mg, Leu 3 · 71 mg, Met 3 · 74 mg, Asn 3 · 119 mg, Pro 3 · 67 mg, Ser 3 · 77 mg, Thr 3 · 79 mg, Ile 3 · 71 mg, Trp 3 · 105 mg
 Abspaltung: 12 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
 Vorreinigung: Kapitel 7.6.3 Direktes Einengen
 HPLC: C18 prep. 15 mL/min 1CV 10 % D, 2CV 10-50 % D, 1CV 50-90 % D
 Peak: 13.41 min, 54.0 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1173.02 [M]⁺, 1195.00 [M+Na]⁺, 1210.99 [M+K]⁺
 Berechnet: 1173.41 g/mol

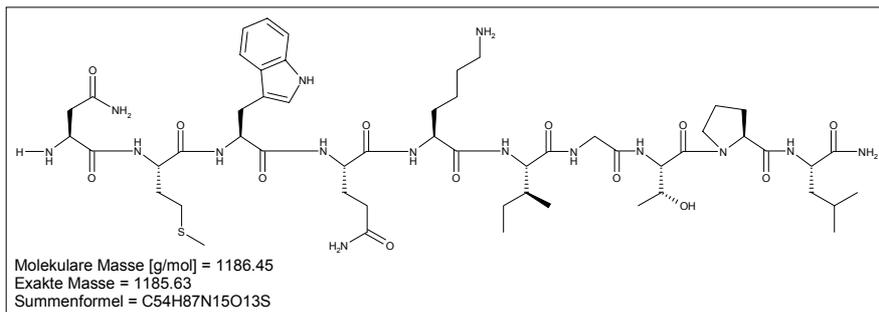


7.6.9.21 C4_C1_10er_G7A

Sequenz: N-M-W-Q-K-V-A-T-P-L-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 11.9 mg
 Ausbeute: 18 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 13.8 min, 60.5 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1185.85 [M]⁺, 1207.82 [M+Na]⁺, 1223.79 [M+K]⁺
 Berechnet: 1186.45 g/mol

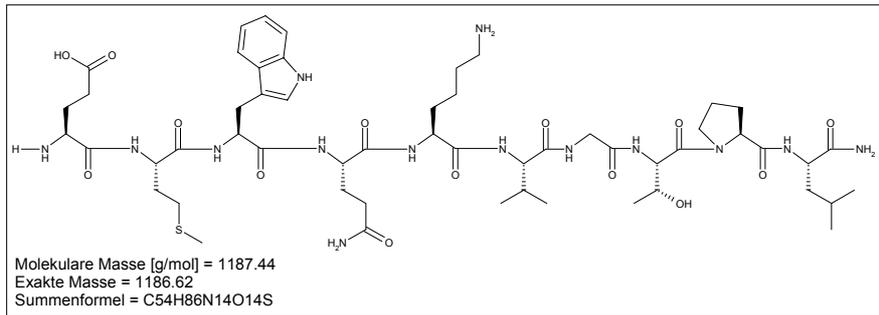
**7.6.9.22 C4_C1_10er_V-6I**

Sequenz: N-M-W-Q-K-I-G-T-P-L-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 11.9 mg
 Ausbeute: 26 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 11.1 min, 60.6 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1185.96, 1207.95 [M+Na]⁺, 1223.93 [M+K]⁺
 Berechnet: 1186.45 g/mol

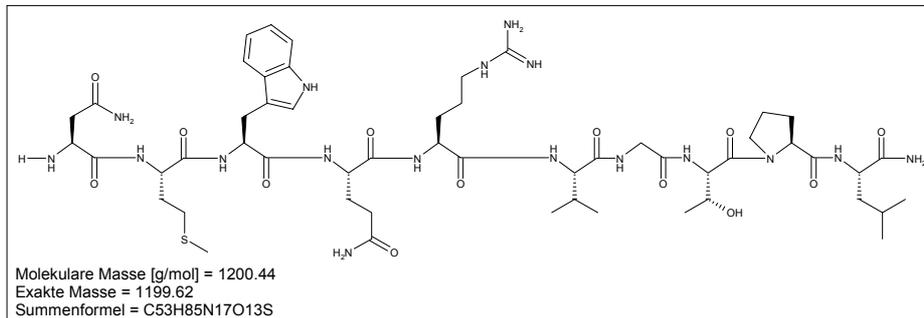
**7.6.9.23 C4_C1_10er_N1E**

Sequenz: E-M-W-Q-K-V-G-T-P-L-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 11.9 mg
 Ausbeute: 8.4 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 10.7 min, 57.7 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1186.94 [M]⁺, 1208.96 [M+Na]⁺, 1224.92 [M+K]⁺

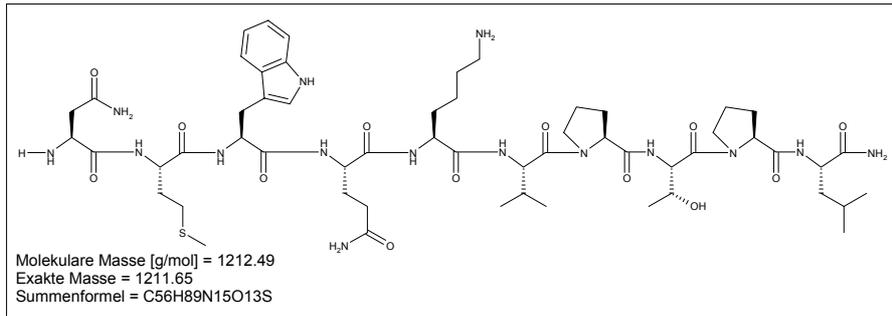
Berechnet: 1187.44 g/mol

**7.6.9.24 C4_C1_10er_K5R**

Sequenz: N-M-W-Q-R-V-G-T-P-L-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 12.0 mg
 Ausbeute: 26 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 11.0 min, 59.8 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1200.36 [M]⁺, 1222.32 [M+Na]⁺, 1238.30 [M+K]⁺
 Berechnet: 1200.44 g/mol

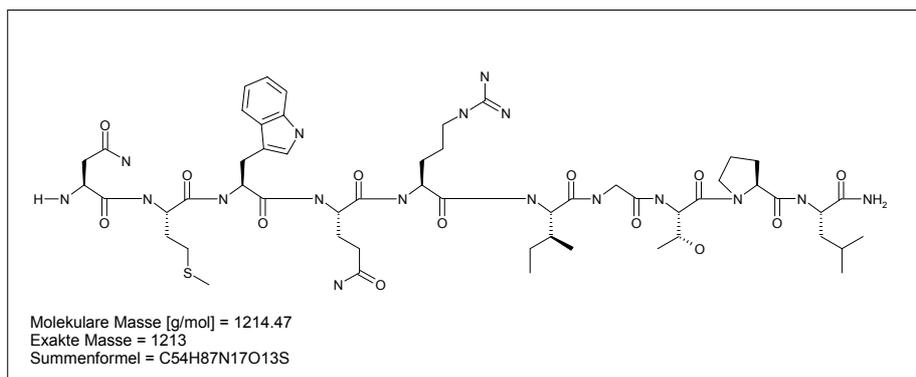
**7.6.9.25 C4_C1_10er_G7P**

Sequenz: N-M-W-Q-K-V-P-T-P-L-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 12.1 mg
 Ausbeute: 26 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 13.7 min, 60.7 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1211.91 [M]⁺, 1233.87 [M+Na]⁺, 1249.86 [M+K]⁺
 Berechnet: 1212.49 g/mol



7.6.9.26 C4_C1_10er_K5R_V6I

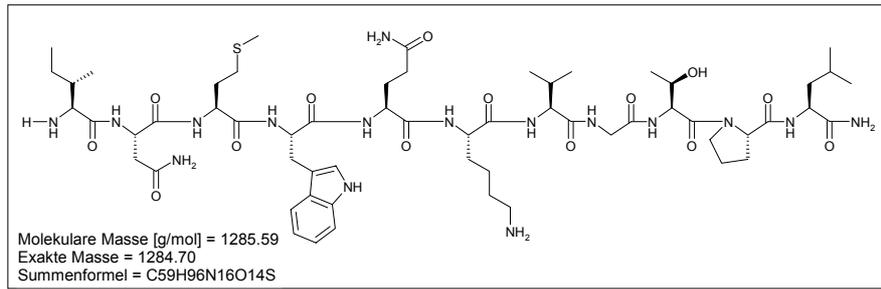
Sequenz:	N-M-W-Q-R-I-G-T-P-L-NH ₂
Ansatzgröße:	50 µmol
Harzmenge:	278 mg
Theoretische Ausbeute:	61 mg
Dreifachkupplung:	30 + 60 + 90 min
Aktivator:	TBTU
Ausbeute:	32 %
Synthesedauer:	35 h 52 min
Aminosäuren:	Gly 3 · 59 mg, Arg 3 · 130 mg, Leu 3 · 71 mg, Met 3 · 74 mg, Asn 3 · 119 mg, Pro 3 · 67 mg, Gln 3 · 122 mg, Thr 3 · 79 mg, Ile 3 · 71 mg, Trp 3 · 105 mg
Abspaltung:	12 mL Abspalllösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
Vorreinigung:	Kapitel 7.6.3 Direktes Einengen
HPLC:	C18 prep. 15 mL/min 1CV 10 % D, 2CV 10-50 % D, 1CV 50-90 % D Peak: 13.52 min, 55.2 % D
MALDI-TOF (m/z)	1214.12 [M] ⁺ , 1236.10 [M+Na] ⁺ , 1252.07 [M+K] ⁺ Berechnet: 1214.47 g/mol



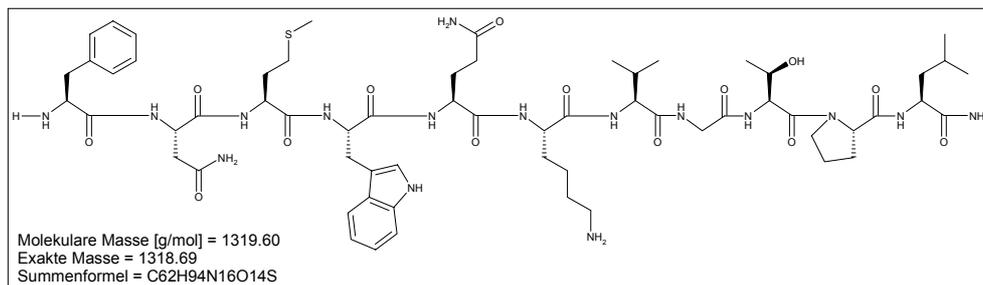
7.6.9.27 C4_C1_11er

Sequenz:	I-N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L-NH ₂
Theoretische Ausbeute:	12.9 mg
Ausbeute:	33 %
HPLC:	C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 14.0 min, 61.9 % D
MALDI-TOF (m/z)	1285.26 [M] ⁺ , 1307.21 [M+Na] ⁺ , 1323.20 [M+K] ⁺

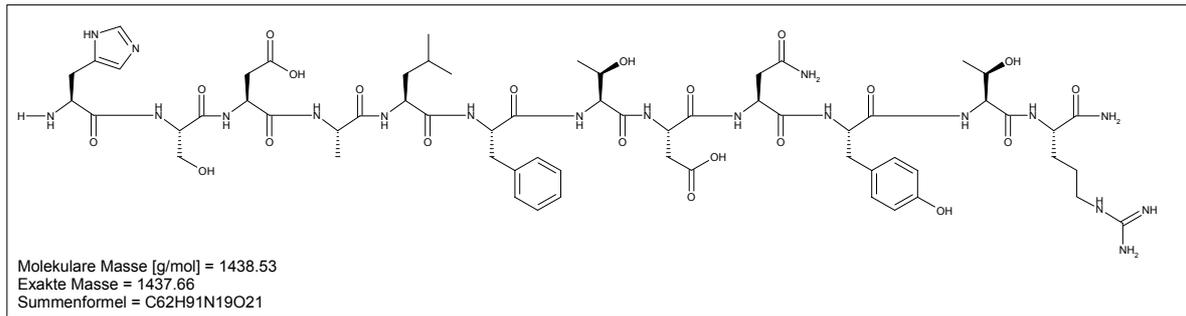
Berechnet: 1285.59 g/mol

**7.6.9.28 C4_C1_11er_I(-1)F**

Sequenz: F-N-M-W-Q-K-V-G-T-P-L-NH₂
 Theoretische Ausbeute: 13.2 mg
 Ausbeute: 39 %
 HPLC: C18 Vydac., 4 mL/min, 1 CV 0 % D, 3 CV 0-100 % D, Peak: 14.1 min, 62.7 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1318.70 [M]⁺, 1340.66 [M+Na]⁺, 1356.63 [M+K]⁺
 Berechnet: 1319.60 g/mol

**7.6.9.29 VIP1-12**

Sequenz: H-S-D-A-L-F-T-D-N-Y-T-R-NH₂
 Ansatzgröße: 75 µmol
 Harzmenge: 395 mg
 Theoretische Ausbeute: 108 mg
 Dreifachkupplung: 15 + 30 + 30 min
 Aktivator: HATU
 Ausbeute: 36 %
 Synthesedauer: 23 h 10 min
 Aminosäuren: Ala 3 · 93 mg, Asp 6 · 123 mg, Phe 3 · 116 mg, His 3 · 186 mg, Leu 3 · 106 mg, Asn 3 · 179 mg, Arg 3 · 195 mg, Ser 3 · 115 mg, Thr 6 · 119 mg, Tyr 3 · 137 mg
 Abspaltung: 12 mL Abspaltlösung (90 % TFA, 5 % Wasser, 5 % TIPS) 90 Minuten
 Vorreinigung: Kapitel 7.6.4 Ausschütteln mit tert-Butylmethylether
 HPLC: C18 prep., 15 mL/min, 1 CV 10 % D, 2 CV 10-50 % D, 1 CV 50-100 %D, Peak: 15.8 min, 45.1 % D
 MALDI-TOF (m/z) 1438.92 [M]⁺, 1460.76 [M+Na]⁺, 1476.90 [M+K]⁺
 Berechnet: 1438.53 g/mol
 NMR: 2.6 mg in 650 µL H₂O/D₂O 9:1, 300 K

Tabelle 30 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids VIP1-12 in ppm.

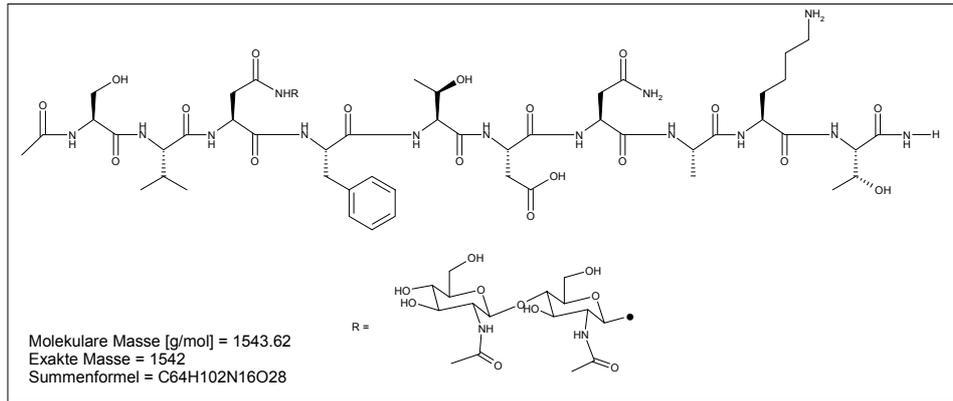
AS	N _H	CH _α	CH _β	CH _γ	CH _δ	Andere
H	--	4.430	3.517/3.472	--	--	2 H 8.746 4 H 7.498
S	8.886	4.623	3.940	--	--	--
D*	8.830	4.824	2.994/2.872	--	--	--
A	8.342	4.333	1.393	--	--	--
L	8.152	4.340	1.603	1.497	0.959/0.891	--
F	8.238	4.759	3.240/3.116	--	--	2,6 H 7.311 3,5 H 7.414 4 H 7.377
T*	8.107	4.354	4.233	1.238	--	--
D*	8.402	4.707	2.936/2.854	--	--	--
N*	8.382	4.724	2.827/2.734	--	--	γNH ₂ 7.581/7.200
Y	8.138	4.664	3.153/3.070	--	--	2,6 H 7.188 3,5 H 6.898
T*	8.061	4.352	4.244	1.221	--	--
R	8.250	4.344	1.948/1.822	1.708	3.274	NH 7.245/6.713
NH ₂	7.600/7.200	--	--	--	--	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.6.9.30 C2_10er_CHI

Das Glycopeptid wurde von Dr. S. Meyer und A. Kahrs zu Verfügung gestellt.

Sequenz: Ac-S-V-N-(Chi)-F-T-D-N-A-K-T-NH₂
 MALDI-TOF (m/z) 1543.71 [M]⁺, 1565.76 [M+Na]⁺, 1581.67 [M+K]⁺
 Berechnet: 1543.62 g/mol
 NMR 2.8 mg in 550 μL H₂O/D₂O 9:1, 300 K

Tabelle 31 ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids C2_10er_CHI in ppm.

AS	N _H	C _{Hα}	C _{Hβ}	C _{Hγ}	C _{Hδ}	Andere
Ac	--	--	--	--	--	1.818
S	8.103	4.258	3.646	--	--	--
V	7.947	3.921	1.820	0.686 / 0.644	--	--
N*	8.176	4.471	2.597	--	--	NH 8.384
F	7.954	4.470	2.983 / 2.874	--	--	2,6 H 7.067 3,5 H 7.179 4 H 7.131
T*	7.911	4.087	3.978	0.977	--	--
D	8.225	4.510	2.641 / 2.484	--	--	--
N*	8.115	4.471	2.675 / 2.582	--	--	γNH ₂ 7.379/6.703
A	8.002	4.111	1.223	--	--	--
K	8.073	4.181	1.708 / 1.616	1.276	1.510	ε CH ₂ 2.825 ε NH ₃ 7.334
T*	7.824	4.129	4.056	1.023	--	--
NH ₂	7.381/6.969	--	--	--	--	--
	N _H	N _H Ac	1 2	3 4	5	--
GlcNAc	8.384	8.013	4.833 3.655	3.556 3.353	3.460	--
GlcNAc'	--	8.194	4.405 3.587	3.547 3.302	3.386	--

* Keine sequentielle Zuordnung.

7.7 BIACORE-EXPERIMENTE

7.7.1 Umpuffern von 500 µg CD4

In das gewaschene Centricon (Ausschlußgrenze: 10 kDa) wurde 500 µg CD4 [7.2.2] überführt und das Eppendorf-Gefäß sowie die Pipette mit 1 mL und 0.6 mL Phosphatpuffer gespült und an der Wand haftende Flüssigkeit runter zentrifugiert. Anschließend wurde noch fünfmal mit je 2 mL Phosphatpuffer aufgefüllt und zentrifugiert. Die Filtrate wurden aufgefangen und in einem Gel (SDS-PAGE, 7.5 %, reduzierend) laufen gelassen. Nach Anfärbung mit Silber konnte in

keinem der Filtrate Protein detektiert werden. Der Überstand mit dem Protein wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

7.7.2 Umpuffern von 100 µg CD4 mit Peptid C2_5er

In das gewaschene Centricon (Ausschlußgrenze: 10 kDa) wurde die NMR-Probe mit 100 µg CD4 und dem Peptid C2_5er (1:150) überführt. Anschließend wurde das NMR-Röhrchen sowie die Pipette mit 1 mL und 0.6 mL Phosphatpuffer gespült und zentrifugiert. Danach wurde noch fünf mal mit je 2 mL Phosphatpuffer aufgefüllt und zentrifugiert. Die Filtrate wurden aufgefangen und in einem Gel (SDS-PAGE, 7.5 %, reduzierend) laufen gelassen. Nach Anfärbung mit Silber konnte in keinem der Filtrate Protein detektiert werden. Der proteinhaltige Überstand wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

7.7.3 Biacore-Bindungsstudien

Am BIACORE 3000 können drei verschiedene Injektions-Arten benutzt werden. Während beim *Quickinject* (QI) ein zusätzlicher Verbrauch von 10 µL pro Injektion benötigt wird, verbrauchen die Injektionen *Inject* (I) 30 µL und *Kinject* (KI) 40 µL mehr.

Das zur Verfügung stehende CD4 [7.2.2] lag in einem Histidin-Puffer vor. Da das Histidin während der Amin-Kupplung schneller an die aktivierte Matrix bindet als das Protein, mußte die Protein-Probe vorher ultrafiltriert werden.

Tabelle 32 Stammlösungen der untersuchten Peptide.

Peptid	Konzentration
C1_3er	2.86 mg in 174.2 µL H ₂ O. 50 mM
C2_5er	2.70 mg in 98.8 µL H ₂ O. 50 mM
Peptid T4-8	2.77 mg in 92.7 µL H ₂ O. 50 mM
HM7er	2.89 mg in 79.6 µL H ₂ O. 50 mM
C4_6er	2.62 mg in 65.2 µL H ₂ O. 50 mM
Peptid T	2.31 mg in 53.9 µL H ₂ O. 50 mM
VIP5-12	3.08 mg in 60.0 µL H ₂ O. 50 mM
C2_10er	3.38 mg in 61.7 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er	3.09 mg in 52.7 µL H ₂ O. 50 mM
VIP1-12	3.26 mg in 45.3 µL H ₂ O. 50 mM
C2_10er_CHI	1.44 mg in 18.7 µL HBS-EP. 50 mM. Ausgefallen als weiße Flocken. Auf 10 mM verdünnt. Immer noch flockig. Auf 2 mM mit H ₂ O verdünnt und 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Leicht trübe und flockig geblieben.

Die 50 mM Stammlösungen wurden mit HBS-EP-Puffer auf die erforderlichen Konzentrationen verdünnt. Die Peptidlösungen wurden auf 200 μ M verdünnt und je 100 μ L mit dem Befehl *inject* (I) injiziert.

Die Beschreibungen der BIACORE-Experimenten werden in Tabellenform erfolgen, da hieraus eine höhere Übersichtlichkeit resultiert.

Neuer Puffer HBS-EP, T= 25°C, Flow 5 μ L./min, neuer Chip CM5
Aktivierung: 100 μ L NHS/EDC 1200 s
Fc1: nichts
Fc2: 40 μ L IgG (Anti-Myoglobin AB) (2 μ g + 100 μ L NaAc-Puffer pH: 4.5) 1620 RU
Fc3: 10 + 30 + 20 +10 μ L CD4 (CHO, 7.2.2) (3 μ g + 150 μ L NaAc-Puffer pH: 4.5) 4115 RU
Fc4: 10 μ L CD4 (CHO, 7.2.2) (3 μ g + 150 μ L NaAc-Puffer pH: 4.5) 423 RU
Deaktivierung: 100 μ L EA 1200 s
Peptide: 200 μ M, C1_3er, C2_5er, Peptide T4-8, HM7er, C4_6er, Peptide T, VIP5-12, C2_10er, C4_C1_10er, VIP1-12, (4 μ M): C2_10er_CHI
KI 40 μ L 120 s Dissoziationszeit
gp120 (7.2.3) 1 μ M, [15 μ L (6.7 μ M Stammlösung) + 85 μ L HBS-EP-Puffer]
KI 40 μ L 2000 s Dissoziationszeit
Verdünnungsreihe: gp120 (7.2.3): 1, 0.6, 0.3 und 0.1 μ M in HBS-EP-Puffer
KI 40 μ L 240 s Dissoziationszeit
Regenerationspulse: QI 10 μ L 100 mM HCl Flow: 35 μ L/min

Der Chip war 15 Tage in HBS-EP-Puffer gelagert. Mit Wasser gründlich gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.
Puffer: HBS-EP, T= 25°C, Flow 5 μ L./min
HCl 10 mM 3 · QI 5 μ L
Puffer entgast
Puffer-Injektion: QI 20 μ L
HCl 10 mM 2 · QI 5 μ L , 1 · QI 1 μ L
1 h Wartezeit, Basislinie ist stabil.
gp120 (7.2.3) 0.5 μ M, [15 μ L (15 μ M Stammlösung) + 185 μ L HBS-EP-Puffer]
KI 140 μ L 3600 s Dissoziationszeit
HCl 10 mM 4 · QI 5 μ L
Puffer-Injektion: QI 50 μ L

Zweiter Chip.

Neuer Puffer HBS-EP, T= 25°C, Flow 5 μ L./min, neuer Chip CM5
Aktivierung: 100 μ L NHS/EDC 1200 s
Fc1: nichts
Fc2: QI 40 μ L CD4 (CHO, 7.2.2) (2 μ g + 150 μ L NaAc-Puffer pH: 4.5) 6200 RU
Fc3: QI 40 μ L CD4 (CHO, 7.2.2 zweiter Teil vom CD4 16.8.99 ultrafiltriert) (2 μ g + 150 μ L NaAc-Puffer pH: 4.5) 6000 RU
Fc4: 10 +20 μ L CD4 (CHO, 7.2.2 zweiter Teil vom CD4 16.8.99 ultrafiltriert) (2 μ g + 150 μ L NaAc-Puffer pH: 4.5) 1500 RU
Deaktivierung: 100 μ L EA 1200 s
Verdünnungsreihe:

Peptid C4_C1_10er : 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 und 10 mM in HBS-EP-Puffer KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit Regenerationspulse: QI 5 µL 10 mM HCl nach der 10 mM Injektion Puffer-Injektionen: QI 2 · 100µL HBS-EP
Puffer entgast, 5 Minuten Ultraschallbad.
Peptidlösungen: VIP5-12 1.0 mM KI 40 µL 120 s Dissoziationszeit Lactose 10 mM KI 40 µL 120 s Dissoziationszeit Lactose 10 mM KI 40 µL 120 s Dissoziationszeit HM7er 0.5 mM KI 40 µL 120 s Dissoziationszeit HM7er 1.0 mM KI 40 µL 120 s Dissoziationszeit VIP1-12 1.0 mM KI 40 µL 120 s Dissoziationszeit
Übernacht gespült mit 5 µL/min
NORMALIZE
gp120 100 nM KI 240 µL 2880 s Dissoziationszeit
Peptidlösungen: C1_3er 2.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2_5er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit HM7er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit PeptidT4-8 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit VIP5-12 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C4_C1_10er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit PeptideT 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C4_C1_10er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2/V5_13er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2_10er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2_10erCHI 20 µM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit VIP5-12 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit
gp120 100 nM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit
Übernacht gespült mit 5 µL/min
C4_C1_10er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit VIP1-12 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit VIP1-12 2.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C1_3er 2.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2/V5_13er 2.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2_10erCHI 1.0 µM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit
gp120 200 nM I 50 µL C4_C1_10er 10 mM KI 50 µL 600 s Dissoziationszeit

Von den weiteren zu testenden Peptiden wurden Stammlösungen (50 mM) in Wasser angesetzt.

Tabelle 33 Stammlösungen der untersuchten Peptide.

Peptid	Konzentration
V5_5er	1.60 mg in 64 µL H ₂ O. 50 mM
Rev_C3_7er	1.81 mg in 54 µL H ₂ O. 50 mM
C2_7er	0.3 mg in 7.2 µL H ₂ O. 50 mM
V5/C5_9er	1.72 mg in 36 µL H ₂ O. 50 mM
C2_10er_N	1.36 mg in 24 µL H ₂ O. 50 mM

Der Chip war 3 Monate in HBS-EP-Puffer gelagert. Mit Wasser gründlich gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.
PRIME
NORMALIZE
gp120 100 nM KI 40 µL 240 s Dissoziationszeit
Peptidlösungen: HM7er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit PeptidT4-8 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit Lactose 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit V5_5er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit Rev_C3_7er 1 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2_7er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit V5/C5_9er 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit C2_10er_NAc 1.0 mM KI 40 µL 480 s Dissoziationszeit
Probleme mit der Referenzzelle. Chip wurde verworfen.

Von den zu testenden Peptiden wurden Stammlösungen (50 mM) in Wasser angesetzt.

Tabelle 34 Stammlösungen der untersuchten Peptide.

Peptid	Konzentration
C4_C1_11er	2.1 mg in 32.7 µL H ₂ O. 50 mM (nicht löslich)
C4_C1_11er_I(-1)F	3.5 mg in 53 µL H ₂ O. 50 mM (nicht löslich)
C4_C1_10er_G7A	0.63 mg in 10.6 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_G7P	1.46 mg in 24.1 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_V6I	0.92 mg in 15.5 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_K5R	1.45 mg in 24.2 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_Q4S	0.88 mg in 15.6 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_W3Y	0.76 mg in 13.2 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_M2S	1.66 mg in 29.4 µL H ₂ O. 50 mM
C4_C1_10er_N1E	0.32 mg in 5.4 µL H ₂ O. 50 mM
Rev_C4_C1_10er	1.32 mg in 22.5 µL H ₂ O. 50 mM (nicht löslich)

Dritter Chip.

Neuer Puffer HBS-EP, T= 25°C, Flow 5 µL/min, neuer Chip CM5
NORMALIZE
Aktivierung: 100 µL NHS/EDC 1200 s
Fc1: nichts
Fc2: QI 40 µL CD4 (CHO, 7.2.2) (2 µg + 150 µL NaAc-Puffer pH: 4.5) 4825 RU
Fc2: QI 20 µL CD4 (CHO, 7.2.2) (2 µg + 150 µL NaAc-Puffer pH: 4.5) 876 RU
Fc2: QI 30 µL CD4 (CHO, 7.2.2) (2 µg + 150 µL NaAc-Puffer pH: 4.5) 2633 RU
Deaktivierung: 100 µL EA 1200 s
I 40 µL HBS-EP
I 5 µL HBS-EP
I 10 µL HBS-EP
I 10 µL Wasser
I 10 µL H ₃ PO ₄ (100 mM)

I 20 µL HBS-EP
I 20 µL HM7er 1 mM
I 20 µL C4C1_10er 1 mM
I 20 µL C4C1_10er 2 mM
Verdünnungsreihe (Negativ-Kontrolle): Peptid HM7er: 2, 3, 5 und 10 mM in HBS-EP-Puffer
I 20 µL
Übernacht gespült mit 5 µL/min
Puffer entgast (10 min)
I 20 µL HBS-EP
I 20 µL HBS-EP
I 20 µL HBS-EP
C4_C1_11er 1.0 mM I 20 µL 100 RU auf der Fc1 geblieben !!!
Diverse Reinigungsschritte
I 20 µL HBS-EP
Peptidlösungen: Zwischen jedem Peptide KI 20 µL HBS-EP 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_G7A 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_G7P 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_V6I 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_K5R 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_Q4S 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_W3Y 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_M2S 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
C4_C1_10er_N1E 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit
Rev_C4_C1_10er 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit 300 RU auf der Fc3 geblieben
Diverse Reinigungsschritte
C4_C1_10er 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit Positiv-Kontrolle
C4_C1_10er_K5R 1.0 mM KI 20 µL 270 s Dissoziationszeit Positiv-Kontrolle
Anschließend die Peptide von H. Möller vermessen.

Der Chip war 8 Tage in HBS-EP-Puffer gelagert. Mit Wasser gründlich gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.
Puffer: HBS-EP, T= 25°C, Flow 5 µL/min
Stark fallende Basislinie
HBS-EP QI 20 µL
Wasser QI 20 µL
Wasser QI 20 µL
HBS-EP QI 20 µL
1 h Wartezeit, Basislinie ist stabil.
C4_C1_10er 1.0 mM I 20 µL Positiv-Kontrolle
Konzentrationsreihe C4_C1_10er V-I
Konzentrationen: 50, 100, 300, 600 und 1000 µM, I 20 µL
Konzentrationsreihe C4_C1_10er K-R
Konzentrationen: 50, 100, 300, 600 und 1000 µM, I 20 µL
Konzentrationsreihe C4_C1_10er Q-S
Konzentrationen: 50, 100, 300, 600 und 1000 µM, I 20 µL
Außerdem noch weitere Konzentrationsreihen für H. Möller.

7.7.4 Biacore-Bindungsstudien mit immobilisierten C4_C1_10er

Eingesetzt wurde Biotin-GGGGNMWQKVGTPPL mit einer Molmasse von 1738.86 g/mol. Nach der Synthese des Peptids auf dem Peptidsynthesizer wurde am Harz biotinyliert. Auf die freien Aminogruppen des Peptids bezogen wurde ein 4-facher Überschuß an Biotinyl-6-amidocaprinsäure (5.07 mg), ein 5-facher Überschuß an 0.5 M TBTU in DMF (35.3 µL) und ein 5-facher Überschuß an 1 M DIPEA in DMF (17.65 µL) zu dem Harz gegeben. Es wurde über Nacht geschüttelt. Die Ausbeute nach der Biotinylierung lag bei 65 %. Charakterisiert wurde über MALDI-TOF MS. Der SA-Chip der Firma Biacore wurde folgendermaßen belegt: Fc1 Biotin, Fc2 gp120, Fc3 Biotin-GGGGNMWQKFGTPPL.

Auf Zelle 2 fand keine Wechselwirkung statt. Vermutlich wurde das gp120 beim Biotinylieren oder Regenerieren zerstört. Auf Zelle 3 war eine Bindungskurve erkennbar. Die Auswertung erfolgte mit der Biacore-Software. Es wurde eine Verdünnungsreihen mit CD4 (12.5nM, 25nM, 50nM, 100nM, 200nM, 400nM, 800nM, 1600nM) durchgeführt. Um den Meßfehler gering zu halten, wurde nach den Messungen eine Pufferkorrektur durchgeführt. Da sich die Basislinie nach jeder Messung leicht verschoben hatte, wurden die Werte immer auf die neue Basislinie bezogen. Die Messung wurde mit den geringeren Konzentrationen begonnen, um die Fehler der Konzentrationsunterschiede zwischen dem reinen Puffer und Puffer, indem CD4 gelöst war, zu minimieren, da so die Bulkeffekte am Anfang klein bleiben. Der neue SA-Chip wurde gespült und das biotinylierte Peptid und das biotinylierte gp120 immobilisiert. Anschließend wurden die offenen Bindungsstellen mit Biotin gecappt. Im nächsten Schritt wurde eine Verdünnungsreihe aufgenommen, wobei die Konzentrationsreihe aus 12.5 nM bis 1600 nM CD4 bestand. Vor der Probeninjektion und nach der Regeneration erfolgte jeweils eine Pufferinjektion¹⁸⁷.

7.8 STD-NMR-EXPERIMENTE

Alle STD-NMR-Experimente wurde bei 278 K aufgenommen.

7.8.1 NMR Probe (0.1 mg CD4, Baculo)

Das CD4 [7.2.1] (100 µg, 2.2 nmol) lag in 200 µL PBS gelöst vor. Es wurde mit PBS-Puffer (H₂O/D₂O, 5:1) auf 500 µL aufgefüllt. (pH: 7.0) Zugabe von 6 µL einer Peptid-Lösung C2_5er

(10 g/L) ergab ein CD4/Peptid-Verhältnis von 1:50. Weitere 12 μL ergaben ein Verhältnis von 1:150.

7.8.2 NMR-Probe (0.5 mg CD4, CHO)

Das CD4 [7.8.2] (500 μg , 11.1 nmol) lag in 500 μL Histidin-Mannitol-Puffer gelöst vor. Es wurde mit D_2O auf $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 9:1 eingestellt.

7.8.3 NMR-Probe (1 mg CD4, CHO)

1 mg CD4 [7.2.2] (22.2 nmol) ultrafiltriert, in 550 μL Phosphat-Puffer (D_2O) ergibt eine Konzentration von 40.4 μM . Ein 30-facher Überschuß an C4_C1_10er entspricht 0.78 mg Peptid. Bei einer 44.3 mM (52 g/L) Peptid-Stamm-Lösung in D_2O wird 15 μL zu pipettiert.

7.9 1D- ^1H -STD-TITRATIONSEXPERIMENTE

Die Titrationsexperimente wurden mit der 1 mg CD4 [7.2.2] Probe durchgeführt. Die Protein-Konzentration lag bei 40.4 μM . Es wurde eine C4_C1_10er Stamm-Lösung in D_2O mit einer Konzentration von 44.3 mM (52 g/L) zu pipettiert. Ein 30-facher Überschuß an C4_C1_10er entspricht 0.78 mg Peptid und 15 μL . 1D ^1H -NMR-Spektren wurden mit einer spektralen Weite von 12.0223 ppm und 32 k Datenpunkten aufgenommen und vor der Fourier-Transformation auf 32k mit Nullen aufgefüllt. Zur Apodisierung wurde das FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert (Linienverbreiterungsfaktor 0.3 – 3 Hz) und anschließend die Phase korrigiert. Die Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde über einen $T_{1\rho}$ -Filter, bestehend aus einem Spinlock-Puls mit einer Länge von 10 ms, bei einer Abschwächung von 15 dB erreicht. Da es sich bei den STD-NMR-Experimenten um Differenzmessungen handelt, wurden die Phasenzyklen so gewählt, daß bei den 1D NMR-Experimenten die Subtraktion jeweils alternierend nach jedem Scan erfolgte. Dadurch werden Subtraktionsartefakte aufgrund von von Temperatur- oder Magnetfeldinhomogenitäten minimiert. Die On- und Off-Resonance Frequenz der Vorsättigung wechselt nach jedem Scan. Die STD-Experimente wurden mit WATERGATE Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Einstrahlposition für die Vorsättigung des Proteins

(On-Resonance) lag bei -1000 Hz (-2 ppm). Die Off-Resonance-Frequenz betrug 20000 Hz (40 ppm). Um den prozentualen STD-Effekt bzw. den STD-Amplifikations-Faktor zu bestimmen, wurde bei jedem Überschuß ein Referenzexperiment unter identischen Konditionen aufgenommen, d.h. mit derselben Repetitionsdauer und einem Spinlock-Puls gleicher Länge. Die zu vergleichenden NMR-Experimente wurden mit den gleichen Parametereinstellungen prozessiert. Die STD-Intensitäten wurden über den Dual-Display Modus in XWINNMR miteinander verglichen.

7.10 STD-TOCSY-EXPERIMENT

Beim 2D STD-TOCSY-Experiment wurden die jeweiligen *On-* und *Off-Resonance* F1-Inkrementen nach jedem F1-Inkrement als *On-Resonance* und *Off-Resonance* Spektrum in zwei getrennten Datensätzen gespeichert. Verwendet wurde das Pulsprogramm *mlev2fug.hm*. Die Mischzeit betrug 100 ms. Es wurden 4k Datenpunkte bei 128 Inkrementen und zwischen 48 Scans je Inkrement aufgenommen. Die Differenzbildung erfolgte erst nach der Akquisition durch Subtraktion der prozessierten Daten¹⁸⁸. Zu diesem Zweck wurden die beiden Spektren über den *add2d* Befehl im XWINNMR-Programm subtrahiert. Die TOCSY-Spektren wurden in F1- und F2-Dimension typischerweise mit einer um 90° verschobenen Quadrat-Sinusfunktion multipliziert. Für die Auswertung wurde das TOCSY mit einem 60-fachem Überschuß an Peptid C4_C1_10er benutzt.

7.11 STD-HSQC-EXPERIMENT

Die *On-* und *Off-Resonance* Datensätze des STD-HSQC-Experiments wurden in zwei getrennte Verzeichnisse geschrieben. Das Standard Bruker-Pulsprogramm *invietgssi* wurde hierfür modifiziert¹⁸⁹. Der Frequenzwechsel erfolgte jeweils nach einem Inkrement. Die jeweiligen Datensätze wurden mit 1 k Datenpunkten bei 128 Inkrementen und 96 Scans je Inkrement aufgenommen. Die Differenzbildung erfolgte erst nach der Akquisition durch Subtraktion der prozessierten Daten. Die HSQC-Spektren wurden in F1-Dimension mit einer um 90° verschobenen Quadratsinus-Funktion multipliziert und in der F2-Dimension mit einer Gauss-Funktion mit dem Wert 0.02 und einem Linienverbreiterungsfaktor von -3.00 multipliziert. Das CD4/C4_C1_10er-Verhältnis betrug 1:300.

7.12 GENDATENBANK

Mittels zweier Perl-Skripte wurde aus einer aus *Genbank* extrahieren Subdatenbank (`allgenes.seq`) mit 38552 HIV-Sequenzen die Sequenzen des C4 Bereich extrahiert. Zuerst wurde nach einem Sequenzstück gesucht, das zwischen zwei Cysteinen `n` Aminosäuren enthält (`n` = 23 bis 28). Ausgegeben wird ein *File* mit dem Namen `name.seq`.

```
#!/usr/bin/perl

open (IN, "<allgenes.seq") or die "Could not open file allgenes.seq";
while (<IN>)
{
    if ( /C.{n}?C/)
        {push @loops, $&;}
};
close IN;

#open (OUT, ">name.seq");
foreach (@loops)
{
    #if (/GPG/)
        {print STDOUT "$_\n"; }
}

#close OUT;
```

Anschließend wurden aus den 7032 Sequenzen mit der Länge `C_26_C`, die hauptsächlich den C4 Bereich beinhalten, eine Separierung an Position 10 vorgenommen. Dazu wurden alle 20 natürlichen Aminosäuren als mögliche Aminosäuren an dieser Position zugelassen und die entsprechenden Sequenzen ausgegeben (`X` = Einbuchstabencode der Aminosäure). Ausgegeben werden *Files* mit dem Namen `name.seq`.

```
#!/usr/bin/perl

open (IN, "<C26C.seq") or die "Could not open file allgenes.seq";
while (<IN>)
{
    if ( /.{9}X.{18}?/)
        {push @loops, $&;}
};
close IN;

#open (OUT, ">name.seq");
foreach (@loops)
{
    #if (!/GPG/)
        {print STDOUT "$_\n"; }
}

#close OUT;
```

8 Toxikologie und Handhabung der Chemikalien

Aceton

F, Xi, MAK: 1200 mg/m³, leichtentzündlich (R11), reizt die Augen (R36), wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen (R66), Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen (R67), Behälter an einem belüfteten Ort aufbewahren (S9), von Zündquellen fernhalten, nicht rauchen (S16), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), LD 50 oral: 5800 mg/kg.

Acetonitril

F, T, MAK: 68 mg/m³, leichtentzündlich (R11), giftig beim Einatmen (R23), giftig bei Berührung mit der Haut (R24), giftig beim Verschlucken (R25), von Zündquellen fernhalten, nicht rauchen (S16), beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen (S27), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), LD 50 oral: 200 mg/kg.

Ammoniaklösung 25 %

C, N, MAK: 14 mg/m³, verursacht Verätzungen (R34), sehr giftig für Wasserorganismen (R50), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen (S36/37/39), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen (S61), LD 50 oral: 350 mg/kg.

α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure

Xn, Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut (R20/21/22), reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut (R36/37/38), , bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S36).

2,5-Dihydroxybenzoesäure

Berührung mit der Haut und den Augen vermeiden (S24/25)

tert-Butylmethylether

F, leichtentzündlich (R11), wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen (R66), von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen (S16), Dampf nicht einatmen (S23.2), nicht in die Kanalisation gelangen lassen (S29), Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen (S33), LD 50 oral: 3870 mg/kg.

O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)

Xi, reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut (R36/37/38), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und den Arzt konsultieren (S26), bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S36).

O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)

Xi, reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut (R36/37/38), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und den Arzt konsultieren (S26), bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S36).

Dichlormethan

Xn, MAK: 350 mg/m³, irreversibler Schaden möglich (R40), Rauch nicht einatmen (S23.2), Berührung mit der Haut vermeiden (S24), Berührung mit den Augen vermeiden (S25), reizt die Augen (S36), geeignete Schutzhandschuhe tragen (S37), LD 50 oral: 2388 mg/kg.

Diethylether

F+, Xn, MAK: 1200 mg/m³, hochentzündlich (R12), kann explosionsfähige Peroxide bilden (R19), gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R22), wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen (R66), Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen (R67), Behälter an einem belüfteten Ort aufbewahren (S9), von Zündquellen fernhalten, nicht rauchen (S16), nicht in die Kanalisation gelangen lassen (S29), Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen (S33), LD 50 oral: 1215 mg/kg., LDLo oral: 260 mg/kg.

Diisopropylethylamin (DIPEA)

F, C, leichtentzündlich (R11), gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R22), verursacht Verätzungen (R34), schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben (R52/53), nicht rauchen (S16), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und

Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen (S36/37/39), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen (S61).

Dimethylformamid (DMF)

T, MAK: 30 mg/m³, kann das Kind im Mutterleib schädigen (R61), auch gesundheitsschädlich beim Einatmen, beim Verschlucken und bei Berührung mit der Haut (R E20/21), reizt die Augen (R36), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Nicht für den berufsmäßigen Verwender. (S53), LD 50 oral: 2800 mg/kg.

Essigsäure 100%

C, MAK: 25 mg/m³, entzündlich (R10), verursacht schwere Verätzungen (R35), Dampf nicht einatmen (S23.2), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), LD 50 oral: 3310 mg/kg.

Essigsäureanhydrid

C, MAK: 21 mg/m³, entzündlich (R10), gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken (R20/22), verursacht Verätzungen (R34), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und den Arzt konsultieren (S26), bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen (S36/37/39), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), LD 50 oral: 1780 mg/kg.

Ethanolamin

Xn, MAK: 5.1 mg/m³, gesundheitsschädlich beim Einatmen (R20), reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut (R36/37/38), LD 50 oral 1510 mg/kg (männlich).

Methanol

F, T, MAK: 270 mg/m³, leichtentzündlich (R11), giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut (R23/24/25), Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken (R 39/23/24/25), Behälter dicht geschlossen halten (S7), von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen (S16), bei der Arbeit

geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen (S36/37), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), LD50 oral: 5628 mg/kg, LDLo orl: 143 mg/kg.

Piperidin

F, T, leichtentzündlich (R11), giftig beim Einatmen (R23), giftig bei Berührung mit der Haut (R24), verursacht Verätzungen (R34), von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen (S16), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen (S27), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), LD50 oral: 400 mg/kg.

2-Propanol

F, Xi, MAK 500 mg/m³, leichtentzündlich (R11), reizt die Augen (R36), reizt die Atmungsorgane (R37), nicht rauchen (S16), Berührung mit der Haut vermeiden (S24), Berührung mit den Augen vermeiden (S25), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren (S26), LD 50 oral 5045 mg/kg, LDLo oral 3570 mg/kg.

Trifluoressigsäure (TFA)

C, gesundheitsschädlich beim Einatmen (R20), verursacht schwere Verätzungen (R35), schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben (R52/53), Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren (S9), bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren (S26), getränkte Kleider sofort ausziehen (S27), bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser (S28.1), bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (S45), Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen (S61). LD 50 oral: 200 mg/kg.

Triisopropylsilan (TIPS)

Entzündlich (R10), Dampf nicht einatmen (S23.2), Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden (S24/25).

9 Pulsprogramme

9.1 DIFF19SLSP2

```

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/diff19slsp2.mm"
;diff19slsp2.mm
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan
;spin lock for protein suppression

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Avance.incl"
;Avance.incl
;
;version 96/05/01

# 9 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/diff19slsp2.mm"

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Grad.incl"
;Grad.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;avance-version
;version 96/05/01

# 10 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/diff19slsp2.mm"

1 ze
2 20u p11:f1
  d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times 17
  p1 ph1
  20u p110:f1
  p10 ph2
  50u setnmr2|0 setnmr0|34
  p16:gp1
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph3
  d19*2
  p28*0.692 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p0*0.231 ph4
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u setnmr2^0 setnmr0^34
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph1=0 2
ph2=1 3
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 0 2 2

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
;p110 : f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
; use for fine adjustment

```

```

;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p10 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;   d19 should be around 150-220usec.
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17   (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;       0 499.87000 on resonance 1x(xxxHZ) off resonance 1x(15000HZ)
;       on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
;use gradient ratio   gp1   :   gp2
;                       20     20

```

9.2 INVIETGSSI2F.OS

```

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/invietgssi2f.os"
;invietgssi.os 11/98
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
; using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn.
; Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114,
; 10663-5 (1992)
;J. Schleucher et al., Angew. Chem. 114(10), 1518 (1993)

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Avance.incl"
;Avance.incl
;
;version 96/05/01

# 16 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/invietgssi2f.os"

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Grad.incl"
;Grad.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;avance-version
;version 96/05/01

# 17 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/invietgssi2f.os"

;;"p2=p1*2"
;;"p4=p3*2"
;;"d0=3u"
;;"d4=1s/(cnst2*4)"
;;"d11=30m"
;;"d13=3u"

"l3=(td1/2)"

"d20=p16+d16+50u+p2+d0*2"
"d21=d13+p16+d16+4u"

1 ze
  d11 p112:f2
  d11 fq1:f3
2 d11 do:f2
  6m
3 d11
  18m
  3u
4 p11:sp1:f3
  d14
  lo to 4 times 17
5 (p1 ph1)
  d4 p12:f2
  (p2 ph1) (p4 ph6):f2

```

```

d4
p28 ph1
d13
(p1 ph2) (p3 ph3):f2
d0
p2 ph7
d0
50u setnmr2|0 setnmr0|34
  p16:ngrad:c34
d16
(p4 ph4):f2
d20
(p1 ph1) (p3 ph4):f2
d24
(p2 ph1) (p4 ph1):f2
d24
(p1 ph2) (p3 ph5):f2
d4
(p2 ph1) (p4 ph1):f2
d4
(p1 ph1)
d21
(p2 ph1)
d13
  p16:ngrad:c34
d16 p112:f2
4u setnmr2^0 setnmr0^34
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #1 if #1 zd
3m ip5
3m ip5
lo to 3 times 2
3u fq1:f3
goto 7
6 d11 do:f2
6m
3u
7 d11
18m
8 p11:sp1:f3
d14
lo to 8 times 17
(p1 ph1)
d4 p12:f2
(p2 ph1) (p4 ph6):f2
d4
p28 ph1
d13
(p1 ph2) (p3 ph3):f2
d0
p2 ph7
d0
50u setnmr2|0 setnmr0|34
  p16:ngrad:c34
d16
(p4 ph4):f2
d20
(p1 ph1) (p3 ph4):f2
d24
(p2 ph1) (p4 ph1):f2
d24
(p1 ph2) (p3 ph5):f2
d4
(p2 ph1) (p4 ph1):f2
d4
(p1 ph1)
d21
(p2 ph1)
d13
  p16:ngrad:c34
d16 p112:f2
4u setnmr2^0 setnmr0^34
go=6 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #2 if #2 zd
3m ip5
3m ip5
3u
lo to 7 times 2
d11 id0
3m ip3
3m ip3
3m ip6
3m ip6
3m ip31
3m ip31
3u fq1:f3
lo to 4 times 13

```

```

exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0
ph7=0 0 2 2
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d13: short delay [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: = p16+d16+50u+p2+d0*2
;d21: = d13+p16+d16+4u
;d24: 1/(4J)XH for XH
; 1/(6J)XH for all multiplicities
;L3: loop for phase sensitive 2D using E/A method : l3 = td1/2
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16, but 2 * ns * m
;td1: number of experiments
;MC2: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient program (GRDPROG) : 2sineea

;use gradient ratio: cnst21 : cnst22 : cnst23 : cnst24
; 80 : 20 : 80 : -20 for C-13
; 80 : 8 : 80 : -8 for N-15

```

9.3 MLEV2FWG.HM

```

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/mlev2fwg.hm"
;mlev2fwg.hm 12/98
;avance-version
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
;for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
;writing two files with dslist
;presat with shaped pulse defined by frequency list
;with two entries
;phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Avance.incl"
;Avance.incl
;
;version 96/05/01

# 17 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/mlev2fwg.hm"

# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Grad.incl"
;Grad.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;avance-version
;version 96/05/01

# 18 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/mlev2fwg.hm"

```

```

"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"

1 ze
  3u fq1:f2
2 d11
3 d7 pl1:f1
4 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 4 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 5 times l1
  (p17 ph26)
  50u setnmr2|0 setnmr0|34
  p16:gp1
  d16 pl18:f1
  p28*0.231 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*1.462 ph5
  d19*2
  p28*0.692 ph5
  d19*2
  p0*0.231 ph5
  46u
  p16:gp2
  d16
  4u setnmr2^0 setnmr0^34
  go=2 ph31
  d11 wr #1 if #1 zd fq1:f2
  goto 7
6 d11
7 d7 pl1:f1
8 p11:sp1:f2
  d14
  lo to 8 times l7
  p1 ph1
  d0
  d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
9 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 9 times l1
  (p17 ph26)

```

```

50u setnmr2|0 setnmr0|34
p16:gp1
d16 p118:f1
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp2
d16
4u setnmr2^0 setnmr0^34
go=6 ph31
d11 wr #2 if #2 id0 ip1 zd fq1:f2
lo to 3 times tdl
exit

ph1=0 2
ph4=0 0 1 1 2 2 3 3
ph5=2 2 3 3 0 0 1 1
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p118 : f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 30 -70 dB
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [ 1mse ]
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p11: shaped pulse [50 msec]
;
;*****Delays*****
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec ]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec ]
;d12: delay for power switching [20 usec ]
;d13: short delay [3 usec ]
;d14: delay between presat pulses [1 msec ]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery [ 200 u ]
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;l7: loop counter, (d14 + p11) * l7 = presaturation time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 20 : 20

```

10 Anhang

In der Röntgenstruktur 1GC1 sind fünf verschiedene Proteinketten aufgeführt, die hier in einer tabellarischen Übersicht gezeigt sind.

Tabelle 35 In der Röntgenstruktur vorkommende Proteinketten mit der verwendeten Nomenklatur der Ketten-Benennung, Bezeichnung und Anfangs- und End-Aminosäure.

Kette	Bezeichnung	Aminosäuren
C	D1-D2 von CD4	Lys-1 bis Lys-181
G	gp120-core	Thr-90 bis Phe-396
G	gp120-core	Gly-410 bis Glu-492
H	F _{ab} Schwere Kette	Gln-1 bis Lys-229
L	F _{ab} Leichte Kette	Glu-1 bis Arg-213

10.1 PRIMÄRSEQUENZEN DER PROTEIN-KETTEN

10.1.1 CD4 (D1-D2) Röntgenstruktur 1GC1

Chain C: LYS1=LYS2=VAL3=VAL4=LEU5=GLY6=LYS7=LYS8=GLY9=ASP10=THR11=VAL12=GLU13=LEU14=THR15=CYS16 (=C/CYS84.SG)=THR17=ALA18=SER19=GLN20=LYS21=LYS22=SER23=ILE24=GLN25=PHE26=HIS27=TRP28=LYS29=ASN30=SER31=ASN32=GLN33=ILE34=LYS35=ILE36=LEU37=GLY38=ASN39=GLN40=GLY41=SER42=PHE43=LEU44=THR45=LYS46=GLY47=PRO48=SER49=LYS50=LEU51=ASN52=ASP53=ARG54=ALA55=ASP56=SER57=ARG58=ARG59=SER60=LEU61=TRP62=ASP63=GLN64=GLY65=ASN66=PHE67=PRO68=LEU69=ILE70=ILE71=LYS72=ASN73=LEU74=LYS75=ILE76=GLU77=ASP78=SER79=ASP80=THR81=TYR82=ILE83=CYS84 (=C/CYS16.SG)=GLU85=VAL86=GLU87=ASP88=GLN89=LYS90=GLU91=GLU92=VAL93=GLN94=LEU95=LEU96=VAL97=PHE98=GLY99=LEU100=THR101=ALA102=ASN103=SER104=ASP105=THR106=HIS107=LEU108=LEU109=GLN110=GLY111=GLN112=SER113=LEU114=THR115=LEU116=THR117=LEU118=GLU119=SER120=PRO121=PRO122=GLY123=SER124=SER125=PRO126=SER127=VAL128=GLN129=CYS130 (=C/CYS159.SG)=ARG131=SER132=PRO133=ARG134=GLY135=LYS136=ASN137=ILE138=GLN139=GLY140=GLY141=LYS142=THR143=LEU144=SER145=VAL146=SER147=GLN148=LEU149=GLU150=LEU151=GLN152=ASP153=SER154=GLY155=THR156=TRP157=THR158=CYS159 (=C/CYS130.SG)=THR160=VAL161=LEU162=GLN163=ASN164=GLN165=LYS166=LYS167=VAL168=GLU169=PHE170=LYS171=ILE172=ASP173=ILE174=VAL175=VAL176=LEU177=ALA178=PHE179=GLN180=LYS181

10.1.2 Gp120-core Röntgenstruktur 1GC1

Chain G: THR90=GLU91=ASN92=PHE93=ASN94=MET95=TRP96=LYS97=ASN98=ASP99=MET100=VAL101=GLU102=GLN103=MET104=HIS105=GLU106=ASP107=ILE108=ILE109=SER110=LEU111=

TRP112=ASP113=GLN114=SER115=LEU116=LYS117=PRO118=CYS119 (=G/CYS205.SG)=VAL120=LYS121=LEU122=THR123=PRO124=LEU125=CYS126 (=G/CYS196.SG)=VAL127=GLY128=ALA129=GLY194=SER195=CYS196 (=G/CYS126.SG)=ASN197 (=G/NAG697.C1)=THR198=SER199=VAL200=ILE201=THR202=GLN203=ALA204=CYS205 (=G/CYS119.SG)=PRO206=LYS207=VAL208=SER209=PHE210=GLU211=PRO212=ILE213=PRO214=ILE215=HIS216=TYR217=CYS218 (=G/CYS247.SG)=ALA219=PRO220=ALA221=GLY222=PHE223=ALA224=ILE225=LEU226=LYS227=CYS228 (=G/CYS239.SG)=ASN229=ASN230=LYS231=THR232=PHE233=ASN234 (=G/NAG734.C1)=GLY235=THR236=GLY237=PRO238=CYS239 (=G/CYS228.SG)=THR240=ASN241=VAL242=SER243=THR244=VAL245=GLN246=CYS247 (=G/CYS218.SG)=THR248=HIS249=GLY250=ILE251=ARG252=PRO253=VAL254=VAL255=SER256=THR257=GLN258=LEU259=LEU260=LEU261=ASN262 (=G/NAG762.C1)=GLY263=SER264=LEU265=ALA266=GLU267=GLU268=GLU269=VAL270=VAL271=ILE272=ARG273=SER274=VAL275=ASN276 (=G/NAG776.C1)=PHE277=THR278=ASP279=ASN280=ALA281=LYS282=THR283=ILE284=ILE285=VAL286=GLN287=LEU288=ASN289 (=G/NAG789.C1)=THR290=SER291=VAL292=GLU293=ILE294=ASN295 (=G/NAG795.C1)=CYS296 (=G/CYS331.SG)=THR297=GLY298=ALA299=GLY329=HIS330=CYS331 (=G/CYS296.SG)=ASN332 (=G/NAG832.C1)=ILE333=SER334=ARG335=ALA336=LYS337=TRP338=ASN339 (=G/NAG839.C1)=ASN340=THR341=LEU342=LYS343=GLN344=ILE345=ALA346=SER347=LYS348=LEU349=ARG350=GLU351=GLN352=PHE353=GLY354=ASN355=ASN356=LYS357=THR358=ILE359=ILE360=PHE361=LYS362=GLN363=SER364=SER365=GLY366=GLY367=ASP368=PRO369=GLU370=ILE371=VAL372=THR373=HIS374=SER375=PHE376=ASN377=CYS378 (=G/CYS445.SG)=GLY379=GLY380=GLU381=PHE382=PHE383=TYR384=CYS385 (=G/CYS418.SG)=ASN386 (=G/NAG886.C1)=SER387=THR388=GLN389=LEU390=PHE391=ASN392 (=G/NAG892.C1)=SER393=THR394=TRP395=PHE396

Chain G: GLY410=SER411=ASP412=THR413=ILE414=THR415=LEU416=PRO417=CYS418 (=G/CYS385.SG)=ARG419=ILE420=LYS421=GLN422=ILE423=ILE424=ASN425=MET426=TRP427=GLN428=LYS429=VAL430=GLY431=LYS432=ALA433=MET434=TYR435=ALA436=PRO437=PRO438=ILE439=SER440=GLY441=GLN442=ILE443=ARG444=CYS445 (=G/CYS378.SG)=SER446=SER447=ASN448 (=G/NAG948.C1)=ILE449=THR450=GLY451=LEU452=LEU453=LEU454=THR455=ARG456=ASP457=GLY458=GLY459=ASN460=SER461=ASN462=ASN463=GLU464=SER465=GLU466=ILE467=PHE468=ARG469=PRO470=GLY471=GLY472=GLY473=ASP474=MET475=ARG476=ASP477=ASN478=TRP479=ARG480=SER481=GLU482=LEU483=TYR484=LYS485=TYR486=LYS487=VAL488=VAL489=LYS490=ILE491=GLU492

10.1.3 Schwere Kette Fab Röntgenstruktur 1GC1

Chain H: GLN1=VAL2=GLN3=LEU4=LEU5=GLU6=SER7=GLY8=ALA9=GLU10=VAL11=LYS12=LYS13=PRO14=GLY15=SER16=SER17=VAL18=LYS19=VAL20=SER21=CYS22 (=H/CYS96.SG)=LYS23=ALA24=SER25=GLY26=ASP27=THR28=PHE29=ILE30=ARG31=TYR32=SER33=PHE34=THR35=TRP36=VAL37=ARG38=GLN39=ALA40=PRO41=GLY42=GLN43=GLY44=LEU45=GLU46=TRP47=MET48=GLY49=ARG50=ILE51=ILE52=THR53=ILE54=LEU55=ASP56=VAL57=ALA58=HIS59=TYR60=ALA61=PRO62=HIS63=LEU64=GLN65=GLY66=ARG67=VAL68=THR69=ILE70=THR71=ALA72=ASP73=LYS74=SER75=THR76=SER77=THR78=VAL79=TYR80=LEU81=GLU82=LEU83=ARG84=ASN85=LEU86=ARG87=SER88=ASP89=ASP90=THR91=ALA92=VAL93=TYR94=PHE95=CYS96 (=H/CYS22.SG)=ALA97=GLY98=VAL99=TYR100=GLU101=GLY102=GLU103=ALA104=ASP105=GLU106=GLY107=GLU108=TYR109=ASP110=ASN111=ASN112=GLY113=PHE114=LEU115=LYS116=HIS117=TRP118=GLY119=GLN120=GLY121=THR122=LEU123=VAL124=THR125=VAL126=THR127=SER128=ALA129=SER130=THR131=LYS132=GLY133=PRO134=SER135=VAL136=PHE137=PRO138=LEU139=ALA140=PRO141=SER142=SER143=LYS144=SER145=THR146=SER147=GLY148=GLY149=THR150=ALA151=ALA152=LEU153=GLY154=CYS155 (=H/CYS211.SG)=LEU156=VAL157=LYS158=ASP159=TYR160=PHE161=PRO162=GLN163=

PRO164=VAL165=THR166=VAL167=SER168=TRP169=ASN170=SER171=GLY172=ALA173=LEU174=THR175=SER176=GLY177=VAL178=HIS179=THR180=PHE181=PRO182=ALA183=VAL184=LEU185=GLN186=SER187=SER188=GLY189=LEU190=TYR191=SER192=LEU193=SER194=SER195=VAL196=VAL197=THR198=VAL199=PRO200=SER201=SER202=SER203=LEU204=GLY205=THR206=GLN207=THR208=TYR209=ILE210=CYS211 (=H/CYS155.SG)=ASN212=VAL213=ASN214=HIS215=LYS216=PRO217=SER218=ASN219=THR220=LYS221=VAL222=ASP223=LYS224=LYS225=VAL226=GLU227=PRO228=LYS229

10.1.4 Leichte Kette Fab Röntgenstruktur 1GC1

Chain L: GLU1=LEU2=GLU3=LEU4=THR5=GLN6=SER7=PRO8=ALA9=THR10=LEU11=SER12=VAL13=SER14=PRO15=GLY16=GLU17=ARG18=ALA19=THR20=LEU21=SER22=CYS23 (=L/CYS88.SG)=ARG24=ALA25=SER26=GLU27=SER28=VAL29=SER30=SER31=ASP32=LEU33=ALA34=TRP35=TYR36=GLN37=GLN38=LYS39=PRO40=GLY41=GLN42=ALA43=PRO44=ARG45=LEU46=LEU47=ILE48=TYR49=GLY50=ALA51=SER52=THR53=ARG54=ALA55=THR56=GLY57=VAL58=PRO59=ALA60=ARG61=PHE62=SER63=GLY64=SER65=GLY66=SER67=GLY68=ALA69=GLU70=PHE71=THR72=LEU73=THR74=ILE75=SER76=SER77=LEU78=GLN79=SER80=GLU81=ASP82=PHE83=ALA84=VAL85=TYR86=TYR87=CYS88 (=L/CYS23.SG)=GLN89=GLN90=TYR91=ASN92=ASN93=TRP94=PRO95=PRO96=ARG97=TYR98=THR99=PHE100=GLY101=GLN102=GLY103=THR104=ARG105=LEU106=GLU107=ILE108=LYS109=ARG110=THR111=VAL112=ALA113=ALA114=PRO115=SER116=VAL117=PHE118=ILE119=PHE120=PRO121=PRO122=SER123=ASP124=GLU125=GLN126=LEU127=LYS128=SER129=GLY130=THR131=ALA132=SER133=VAL134=VAL135=CYS136 (=L/CYS196.SG)=LEU137=LEU138=ASN139=ASN140=PHE141=TYR142=PRO143=ARG144=GLU145=ALA146=LYS147=VAL148=GLN149=TRP150=LYS151=VAL152=ASP153=ASN154=ALA155=LEU156=GLN157=SER158=GLY159=ASN160=SER161=GLN162=GLU163=SER164=VAL165=THR166=GLU167=GLN168=ASP169=SER170=LYS171=ASP172=SER173=THR174=TYR175=SER176=LEU177=SER178=SER179=THR180=LEU181=THR182=LEU183=SER184=LYS185=ALA186=ASP187=TYR188=GLU189=LYS190=HIS191=LYS192=VAL193=TYR194=ALA195=CYS196 (=L/CYS136.SG)=GLU197=VAL198=THR199=HIS200=GLN201=GLY202=LEU203=SER204=SER205=PRO206=VAL207=THR208=LYS209=SER210=PHE211=ASN212=ARG213

10.1.5 CD4 (D1-D4) Röntgenstruktur 1WIO

Chain A: LYS1=LYS2=VAL3=VAL4=LEU5=GLY6=LYS7=LYS8=GLY9=ASP10=THR11=VAL12=GLU13=LEU14=THR15=CYS16=THR17=ALA18=SER19=GLN20=LYS21=LYS22=SER23=ILE24=GLN25=PHE26=HIS27=TRP28=LYS29=ASN30=SER31=ASN32=GLN33=ILE34=LYS35=ILE36=LEU37=GLY38=ASN39=GLN40=GLY41=SER42=PHE43=LEU44=THR45=LYS46=GLY47=PRO48=SER49=LYS50=LEU51=ASN52=ASP53=ARG54=ALA55=ASP56=SER57=ARG58=ARG59=SER60=LEU61=TRP62=ASP63=GLN64=GLY65=ASN66=PHE67=PRO68=LEU69=ILE70=ILE71=LYS72=ASN73=LEU74=LYS75=ILE76=GLU77=ASP78=SER79=ASP80=THR81=TYR82=ILE83=CYS84=GLU85=VAL86=GLU87=ASP88=GLN89=LYS90=GLU91=GLU92=VAL93=GLN94=LEU95=LEU96=VAL97=PHE98=GLY99=LEU100=THR101=ALA102=ASN103=SER104=ASP105=THR106=HIS107=LEU108=LEU109=GLN110=GLY111=GLN112=SER113=LEU114=THR115=LEU116=THR117=LEU118=GLU119=SER120=PRO121=PRO122=GLY123=SER124=SER125=PRO126=SER127=VAL128=GLN129=CYS130=ARG131=SER132=PRO133=ARG134=GLY135=LYS136=ASN137=ILE138=GLN139=GLY140=GLY141=LYS142=THR143=LEU144=SER145=VAL146=SER147=GLN148=LEU149=GLU150=LEU151=GLN152=ASP153=SER154=GLY155=THR156=TRP157=

THR158=CYS159=THR160=VAL161=LEU162=GLN163=ASN164=GLN165=LYS166=LYS167=VAL168=
GLU169=PHE170=LYS171=ILE172=ASP173=ILE174=VAL175=VAL176=LEU177=ALA178=PHE179=
GLN180=LYS181=ALA182=SER183=SER184=ILE185=VAL186=TYR187=LYS188=LYS189=GLU190=
GLY191=GLU192=GLN193=VAL194=GLU195=PHE196=SER197=PHE198=PRO199=LEU200=ALA201=
PHE202=THR203=VAL204=GLU205=LYS206=LEU207=THR208=GLY209=SER210=GLY211=GLU212=
LEU213=TRP214=TRP215=GLN216=ALA217=GLU218=ARG219=ALA220=SER221=SER222=SER223=
LYS224=SER225=TRP226=ILE227=THR228=PHE229=ASP230=LEU231=LYS232=ASN233=LYS234=
GLU235=VAL236=SER237=VAL238=LYS239=ARG240=VAL241=THR242=GLN243=ASP244=PRO245=
LYS246=LEU247=GLN248=MET249=GLY250=LYS251=LYS252=LEU253=PRO254=LEU255=HIS256=
LEU257=THR258=LEU259=PRO260=GLN261=ALA262=LEU263=PRO264=GLN265=TYR266=ALA267=
GLY268=SER269=GLY270=ASN271=LEU272=THR273=LEU274=ALA275=LEU276=GLU277=ALA278=
LYS279=THR280=GLY281=LYS282=LEU283=HIS284=GLN285=GLU286=VAL287=ASN288=LEU289=
VAL290=VAL291=MET292=ARG293=ALA294=THR295=GLN296=LEU297=GLN298=LYS299=ASN300=
LEU301=THR302=CYS303=GLU304=VAL305=TRP306=GLY307=PRO308=THR309=SER310=PRO311=
LYS312=LEU313=MET314=LEU315=SER316=LEU317=LYS318=LEU319=GLU320=ASN321=LYS322=
GLU323=ALA324=LYS325=VAL326=SER327=LYS328=ARG329=GLU330=LYS331=ALA332=VAL333=
TRP334=VAL335=LEU336=ASN337=PRO338=GLU339=ALA340=GLY341=MET342=TRP343=GLN344=
CYS345=LEU346=LEU347=SER348=ASP349=SER350=GLY351=GLN352=VAL353=LEU354=LEU355=
GLU356=SER357=ASN358=ILE359=LYS360=VAL361=LEU362=PRO363

11 Literatur

- 1 Report on the global HIV/AIDS epidemic December 2000.
http://www.unaids.org/epidemic_update/report/index.html
- 2 Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
- 3 Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. & Markham, P. D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503 (1984).
- 4 Henderson, L. E. & Arthur, L. O. Defeating AIDS: What will it take? *Scientific American* **279**, 61 (1998).
- 5 Wyatt, R. & Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888 (1998).
- 6 Turner, B. G. & Summers F. M. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32 (1999).
- 7 Littman, D. R. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu Rev Immunol* **5**, 561-584 (1987).
- 8 Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S. E., Cantin, C., Hendrickson, W. A. & Sekaly, R. P. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* **66**, 1037-1049 (1991).
- 9 Robey, E. & Axel, R. CD4: collaborator in immune recognition and HIV infection. *Cell* **60**, 697-700 (1990).
- 10 Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. & Weiss, R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767 (1984).

- 11 Klatzmann, D., Champagne, E., Chemaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. & Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768 (1984).
- 12 Sattentau, Q. J., Clapham, P. R., Weiss, R. A., Beverley, P. C., Montagnier, L., Alhalabi, M. F., Gluckmann, J. C. & Klatzmann, D. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *Aids* **2**, 101-105 (1988).
- 13 Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. & Markowitz, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126 (1995).
- 14 Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-1586 (1996).
- 15 Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A. & Hahn, B. H. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**, 117-122 (1995).
- 16 Fauci, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**, 617-622 (1988).
- 17 Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
- 18 Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. & Berger, E. A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958 (1996).
- 19 Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. & Doms, R. W. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158 (1996).

- 20 Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. & Sodroski, J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148 (1996).
- 21 Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrikson, 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).
- 22 Sattentau, Q. J., Moore, J. P., Vignaux, F., Traincard, F. & Poignard, P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* **67**, 7383-7393 (1993).
- 23 Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. & Sodroski, J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183 (1996).
- 24 Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711 (1998).
- 25 Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**, 1949-1953 (1998).
- 26 Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A. & Sattentau, Q. J. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **250**, 1139-1142 (1990).
- 27 Gallaher, W. R. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**, 327-328 (1987).
- 28 Hart, T. K., Kirsh, R., Ellens, H., Sweet, R. W., Lambert, D. M., Petteway, S. R., Leary, J. & Bugelski, P. J. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2189-2193 (1991).

- 29 Bartlett, J. G. & Moore, R. D. Improving HIV therapy. *Sci Am* **279**, 84-87, 89 (1998).
- 30 Janeway, C. A. & Travers P. Immunologie 2. Aufl. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997.
- 31 Informationen des Robert-Koch-Institutes,
<http://www.rki.de/GESUND/MBL/HIV.HTM>
- 32 Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. Concorde Coordinating Committee. *Lancet* **343**, 871-881 (1994).
- 33 Rockstroh, J. K. Antiretroviral therapy of HIV-infections. *Pharm Unserer Zeit* **29**, 284-296 (2000).
- 34 Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T. C., Chaisson, R. E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J. & Siliciano, R. F. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* **5**, 512-517 (1999).
- 35 Pomerantz, R. J. Primary HIV-1 resistance: a new phase in the epidemic? *Jama* **282**, 1177-1179 (1999).
- 36 Siliciano, R. F. Latency and reservoirs for HIV-1. *Aids* **13**, 49-58 (1999).
- 37 Cohen, J. AIDS vaccines show promise after years of frustration. *Science* **291**, 1686-1688 (2001).
- 38 Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. & Saxon, A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**, 1425-1431 (1981).
- 39 Siegal, F. P., Lopez, C., Hammer, G. S., Brown, A. E., Kornfeld, S. J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S. Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B. R. & *et al.* Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* **305**, 1439-1444 (1981).

- 40 Lane, H. C. & Fauci, A. S. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annu Rev Immunol* **3**, 477-500 (1985).
- 41 Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., Danquet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Veziret, F., Rouzioux, C., Gluckman, J. C., Chermann, J. C. & *et al.* Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper- inducer T lymphocytes. *Science* **225**, 59-63 (1984).
- 42 McDougal, J. S., Mawle, A. C., Cort, S., Nicholson, J., Hicks, D. & Slight, J. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T-cell activation and expression of the T4 antigen. *J Immunol* **135**, 3151-3162 (1985).
- 43 Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A. & Axel, R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333-348 (1986).
- 44 McDougal, J. S., Kennedy, M. S., Sligh, J. M., Cort, S. P., Mawle, A. & Nicholson, J. K. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382-385 (1986).
- 45 Brady, R. L. & Barclay, A. N. The structure of CD4. *Current topics in microbiology and immunology* **205**, 1-18 (1996).
- 46 Bernhard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C., Schlossman, S. F. *Leucocyte Typing*. Springer, Berlin Heidelberg New York (1984).
- 47 Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F. Separation of funktional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4061-4065 (1979).
- 48 Williams, A. F., Galfre, G. & Milstein, C. Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* **12**, 663-673 (1977).
- 49 Maddon, P. J., Littman, D. R., Godfrey, M., Maddon, D. E., Chess, L., & Axel, R. The Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface Protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**, 93-104 (1985).

- 50 Maddon, P. J., Moleneaux, S. M., Zimmerman, K. A. M. Godfrey, M., Alt, F. W., Chess, L. & Axel, R. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 9155-9159 (1987).
- 51 Clark, S. J., Jefferies, W. A., Barclay, A. N., Gagnon, J. & Williams, A. F. Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 1649-1653 (1987).
- 52 Bowers, K., Pitcher, C. & Marsh, M. CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 871-875 (1997).
- 53 Traunecker, A., Luke, W. & Karjalainen, K. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature* **331**, 84-86 (1988).
- 54 Berger, E. A., Fuerst, T. R. & Moss, B. A soluble recombinant polypeptide comprising the amino-terminal half of the extracellular region of the CD4 molecule contains an active binding site for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2357-2361 (1988).
- 55 Peterson, A. & Seed, B. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* **54**, 65-72 (1988).
- 56 Clayton, L. K., Hussey, R. E., Steinbrich, R., Ramachandran, H., Husain, Y. & Reinherz, E. L. Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding. *Nature* **335**, 363-366 (1988).
- 57 Mizukami, T., Fuerst, T. R., Berger, E. A. & Moss, B. Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site- directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9273-9277 (1988).
- 58 Fisher, R. A., Bertonis, J. M., Meier, W., Johnson, V. A., Costopoulos, D. S., Liu, T., Tizard, R., Walker, B. D., Hirsch, M. S., Schooley, R. T. & Flavell, R. A. HIV infection is blocked *in vitro* by recombinant soluble CD4. *Nature* **331**, 76-78 (1988).

- 59 Hussey, R. E., Richardson N. E., Kowalsky, M., Brown, N. R., Chang, H. C., Silicano, R. F., Dorfman, T., Walker, B., Sodrosky, J. & Reinherz E. L. A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation. *Nature* **331**, 78-81 (1988).
- 60 Deen, K. C., McDougal, J. S., Inacker, R., Folena-Wasserman, G., Arthos, J., Rosenberg, J., Maddon, P. J., Axel, R. & Sweet, R. W. A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature* **331**, 82-84 (1988).
- 61 Smith, D. H., Byrn, R. A., Marsters, S. A., Gregory, T., Groopman, J. E. & Capon, D. J. Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science* **238**, 1704-1707 (1987).
- 62 Daar, E. S., Li, X. L., Moudgil, T. & Ho, D. D. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6574-6578 (1990).
- 63 O'Brien, W. A., Mao, S. H., Cao, Y. & Moore, J. P. Macrophage-tropic and T-cell line-adapted chimeric strains of human immunodeficiency virus type 1 differ in their susceptibilities to neutralization by soluble CD4 at different temperatures. *J Virol* **68**, 5264-5269 (1994).
- 64 Kahn, J. O., Allan, J. D., Hodges, T. L., Kaplan, L. D., Arri, C. J., Fitch, H. F., Izu, A. E., Mordenti, J., Sherwin, J. E., Groopman, J. E. & *et al.* The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase 1. *Ann Intern Med* **112**, 254-261 (1990).
- 65 McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R. & Weissman, I. L. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**, 55-67 (1988).
- 66 Franzusoff, A., Volpe, A. M., Josse, D., Pichuanes, S. & Wolf, J. R. Biochemical and genetic definition of the cellular protease required for HIV-1 gp160 processing. *J Biol Chem* **270**, 3154-3159 (1995).

- 67 Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C. & Sodroski, J. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**, 2119-2123 (1991).
- 68 Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. & Gregory, T. J. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**, 10373-10382 (1990).
- 69 Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Wyatt, R. & Sodroski, J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* **68**, 469-484 (1994).
- 70 Kwong, P. D., Wyatt, R., Desjardins, E., Robinson, J., Culp, J. S., Hellmig, B. D., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. Probability analysis of variational crystallization and its application to gp120, the exterior envelope glycoprotein of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1). *J Biol Chem* **274**, 4115-4123 (1999).
- 71 Binley, J. M., Wyatt, R., Desjardins, E., Kwong, P. D., Hendrickson, W., Moore, J. P. & Sodroski, J. Analysis of the interaction of antibodies with a conserved enzymatically deglycosylated core of the HIV type 1 envelope glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 191-198 (1998).
- 72 Fenouillet, E., Clerget-Raslain, B., Gluckman, J. C., Guetard, D., Montagnier, L. & Bahraoui, E. Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis. *J Exp Med* **169**, 807-822 (1989).
- 73 Thali, M., Moore, J. P., Furman, C., Charles, M., Ho, D. D., Robinson, J. & Sodroski, J. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol* **67**, 3978-3988 (1993).
- 74 Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. and Capon, D. J. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*, **50**, 975-985 (1987).

- 75 Schnittman, S. M., Lane, H. C., Roth, J., Burrows, A., Folks, T. M., Kehrl, J. H., Koenig, S., Berman, P. & Fauci, A. S. Characterization of GP120 binding to CD4 and an assay that measures ability of sera to inhibit this binding. *J Immunol* **141**, 4181-4186 (1988).
- 76 Wu, H., Myszka, D. G., Tendian, S. W., Brouillette, C. G., Sweet, R. W., Chaiken, I. M. & Hendrickson, W. A. Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15030-15035 (1996).
- 77 Fischer, P. B., Collin, M., Karlsson, G. B., James, W., Butters, T. D., Davis, S. J., Gordon, S., Dwek, R. A. & Platt, F. M. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. *J Virol* **69**, 5791-5797 (1995).
- 78 Myszka, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Wyatt, R., Sodroski, J. & Doyle, M. L. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9026-9031 (2000).
- 79 Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **263**, 777-784 (1994).
- 80 Hill, D. Trends in development of high-throughput screening technologies for rapid discovery of novel drugs. *Curr Opin Drug Discov Devel* **1**, 92-97 (1998).
- 81 Nakashima, H., Masuda, M., Murakami, T., Koyanagi, Y., Matsumoto, A., Fujii, N. & Yamamoto, N. Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-7]polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1249-1255 (1992).
- 82 Weeks, B. S., Nomizu, M., Otaka, A., Weston, C. A., Okusu, A., Tamamura, H., Yamamoto, N. & Fujii, N. The synthetic [Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II peptide (T22) binds to the CD4 cell surface molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **215**, 626-631 (1995).
- 83 Tamamura, H., Otaka, A., Murakami, T., Ishihara, T., Ibuka, T., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, N. & Fujii, N. Interaction of an anti-HIV peptide, T22, with gp120 and CD4. *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 555-559 (1996).

- 84 Murakami, T., Nakajima, T., Koyanagi, Y., Tachibana, K., Fujii, N., Tamamura, H., Yoshida, N., Waki, M., Matsumoto, A., Yoshie, O., Kishimoto, T., Yamamoto, N. & Nagasawa, T. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**, 1389-1393 (1997).
- 85 Murakami, T., Zhang, T. Y., Koyanagi, Y., Tanaka, Y., Kim, J., Suzuki, Y., Minoguchi, S., Tamamura, H., Waki, M., Matsumoto, A., Fujii, N., Shida, H., Hoxie, J. A., Peiper, S. C. & Yamamoto, N. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **73**, 7489-7496 (1999).
- 86 Ramsdale, T. E., Andrews, P. R. & Nice, E. C. Verification of the interaction between peptide T and CD4 using surface plasmon resonance. *FEBS Lett* **333**, 217-222 (1993).
- 87 Monnet, C., Laune, D., Laroche-Traineau, J., Biard-Piechaczyk, M., Briant, L., Bes, C., Pugniere, M., Mani, J. C., Pau, B., Cerutti, M., Devauchelle, G., Devaux, C., Granier, C. & Chardes, T. Synthetic Peptids derived from the variable regions of an anti-CD4 monoclonal antibody bind to CD4 and inhibit HIV-1 promoter activation in virus-infected cells. *J Biol Chem* **274**, 3789-3796 (1999).
- 88 Robey, F. A., Harris-Kelson, T., Robert-Guroff, M., Batinic, D., Ivanov, B., Lewis, M. S. & Roller, P. P. A synthetic conformational epitope from the C4 domain of HIV Gp120 that binds CD4. *J Biol Chem* **271**, 17990-17995 (1996).
- 89 Robey, F. A., Kelson-Harris, T., Roller, P. P. & Robert-Guroff, M. A helical epitope in the C4 domain of HIV glycoprotein 120. *J Biol Chem* **270**, 23918-23921 (1995).
- 90 Autiero, M., Abrescia, P. & Guardiola, J. Interaction of seminal plasma proteins with cell surface antigens: presence of a CD4-binding glycoprotein in human seminal plasma. *Exp Cell Res* **197**, 268-271 (1991).
- 91 Neurath, A. R., Jiang, S., Strick, N., Lin, K., Li, Y. Y. & Debnath, A. K. Bovine beta-lactoglobulin modified by 3-hydroxyphthalic anhydride blocks the CD4 cell receptor for HIV. *Nat Med* **2**, 230-234 (1996).
- 92 Zeder-Lutz, G., Neurath, A. R. & Van Regenmortel, M. H. Kinetics of interaction between 3-hydroxyphthaloyl-beta-lactoglobulin and CD4 molecules. *Biologicals* **27**, 29-34 (1999).

- 93 Howie, S. E., Fernandes, M. L., Heslop, I., Hewson, T. J., Cotton, G. J., Moore, M. J., Innes, D., Ramage, R. & Harrison, D. J. A functional, discontinuous HIV-1 gp120 C3/C4 domain-derived, branched, synthetic peptide that binds to CD4 and inhibits MIP-1alpha chemokine binding. *Faseb J* **13**, 503-511 (1999).
- 94 Blair, W. S., Lin, P.F., Meanwell, N. A. & Wallace, O. B. HIV-1 entry – an expanding portal for drug discovery. *DDT*, **5**, 183-194 (2000).
- 95 Daar, E. S. & Ho, D. D. Relative resistance of primary HIV-1 isolates to neutralization by soluble CD4. *Am J Med* **90**, 22-26 (1991).
- 96 Allaway, G. P., Davis-Bruno, K. L., Beaudry, G. A., Garcia, E. B., Wong, E. L., Ryder, A. M., Hasel, K. W., Gauduin, M. C., Koup, R. A., McDougal, J. S. & *et al.* Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 533-539 (1995).
- 97 Zhang, J. L., Choe, H., Dezube, B. J., Farzan, M., Sharma, P. L., Zhou, X. C., Chen, L. B., Ono, M., Gillies, S., Wu, Y., Sodroski, J. G. & Crumpacker, C. S. The bis-azo compound FP-21399 inhibits HIV-1 replication by preventing viral entry. *Virology* **244**, 530-541 (1998).
- 98 Rosenstein, I. J., Stafford, M. K., Kitchen, V. S., Ward, H., Weber, J. N. & Taylor-Robinson, D. Effect on normal vaginal flora of three intravaginal microbicides potentially active against human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **177**, 1386-1390 (1998).
- 99 Yahi, N., Fantini, J., Baghdiguian, S., Mabrouk, K., Tamalet, C., Rochat, H., Van Rietschoten, J. & Sabatier, J. M. SPC3, a synthetic peptide derived from the V3 domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120, inhibits HIV-1 entry into CD4+ and CD4- cells by two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4867-4871 (1995).
- 100 Masuda, M., Nakashima, H., Ueda, T., Naba, H., Ikoma, R., Otaka, A., Terakawa, Y., Tamamura, H., Ibuka, T., Murakami, T. & *et al.* A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II). *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 845-850 (1992).

- 101 Arakaki, R., Tamamura, H., Premanathan, M., Kanbara, K., Ramanan, S., Mochizuki, K., Baba, M., Fujii, N. & Nakashima, H. T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *J Virol* **73**, 1719-1723 (1999).
- 102 Murakami, T., Nakajima, T., Koyanagi, Y., Tachibana, K., Fujii, N., Tamamura, H., Yoshida, N., Waki, M., Matsumoto, A., Yoshie, O., Kishimoto, T., Yamamoto, N. & Nagasawa, T. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**, 1389-1393 (1997).
- 103 Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J. A., Henson, G. & De Clercq, E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* **186**, 1383-1388 (1997).
- 104 Donzella, G. A., Schols, D., Lin, S. W., Este, J. A., Nagashima, K. A., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Henson, G., De Clercq, E. & Moore, J. P. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* **4**, 72-77 (1998).
- 105 Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. & Matthews, T. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10537-10541 (1992).
- 106 Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. & Matthews, T. J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9770-9774 (1994).
- 107 Hughson, F. M. Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr Biol* **7**, 565-569 (1997).
- 108 Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14172-14177 (2000).
- 109 Singh, M., Berger, B. & Kim, P. S. LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins. *J Mol Biol* **290**, 1031-1041 (1999).

- 110 Informationen der Firma Trimeris, <http://www.trimeris.com/newsdocs/pr57.htm>
- 111 Root, M. J., Kay, M. S. & Kim, P. S. Protein Design of an HIV-1 Entry Inhibitor. *Science* **11**, 884-888 (2001).
- 112 CD Römpp Chemie Lexikon-Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag (1995).
- 113 Merrifield R. B. Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Bio* **21**, 412 (1962).
- 114 Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L. & Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* **30** 2739-2742 (1989).
- 115 Perason, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L. & Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* **30**, 2739-2742 (1989).
- 116 Carpino, L. A. & Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem* **37**, 3404-3409 (1972).
- 117 Carpino, L. A., El-Faham A. & Albericio F. Racemization studies solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Letters* **35**, 2279-2282 (1994).
- 118 Carpino L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* **115**, 4397-4398 (1993).
- 119 Reid, G. E. & Simpson, R. J. Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butylloxycarbonyl amino acids. *Anal Biochem* **200**, 301-309 (1992).
- 120 Mayer, M. & Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* **111**, 1902-1906 (1999).

- 121 Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M. & Meyer, B. Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J Am Chem Soc* **121**, 5336-5337 (1999).
- 122 Akasaka, K. Intermolecular spin diffusion as a method for studying macromolecule-ligand interactions. *J Magn Reson* **36**, 135-140 (1979).
- 123 Sanders, J. K. M. & Mersh, J. D. Nuclear magnetic double resonance: the use of difference spectroscopy. *Progr NMR Spectr* **15**, 353-400 (1982).
- 124 Vogtherr, M. & Peters, T. Application of NMR based binding assay to identify key hydroxy groups for intermolecular recognition. *J Am Chem Soc* **122**, 6093-6099 (2000).
- 125 Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Jonsson, U., Karlsson, R., Lofas, S., Lundh, K., Malmquist, M., Ostlin, H., Persson, B., Ronnberg, I., Roos, H., Sjolander, S., Stahlberg, R., Stenberg, E., & Urbaniczky, C. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**, 620-627 (1991).
- 126 Turbadar, T. Complete absorption of light by thin metal films. *Proc Phy Soc* **73**, 40-44 (1959).
- 127 Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys* **216**, 398-410 (1968).
- 128 Otto, A. Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmaschwingungen. *Phys Stat Solidi* **26**, K99-K101 (1968).
- 129 Kretschmann, E. & Rather, H. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturf* **230**, 2135-2136 (1968).
- 130 Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. *Colloid and Interface Science*. **143**, 513-526 (1991).
- 131 Informationen der Firma Biacore, <http://www.biacore.com>
- 132 Myszka, D. G. & Rich R. L. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *PSTT* **3**, 310-317 (2000).

- 133 Plant, A. L., Brigham-Burke, M., Petrella, E. C. & O'Shannessy, D. J. Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance. *Anal Biochem* **226**, 342-348 (1995).
- 134 Yu, Y. Y., Van Wie, B. J., Koch, A. R., Moffett, D. F. & Davis, W. C. Preparation and characterization of bifunctional biopolymers for receptor-based liposomal immunosensing. *Biotechnol Prog* **14**, 310-317 (1998).
- 135 Erb, E. M., Chen, X., Allen, S., Roberts, C. J., Tendler, S. J., Davies, M. C. & Forsen, S. Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Anal Biochem* **280**, 29-35 (2000).
- 136 Weimar, T. Recent trends in the application of evanescent wave biosensors. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 1219-1221 (2000).
- 137 Nagata, K., Handa, H. Real-time analysis of biomolecular interactions: Applications of Biacore. *Springer Verlag, Berlin* (2000).
- 138 Rich, R. L. & Myszka, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 54-61 (2000).
- 139 Holmes, S. D., May, K., Johansson, V., Markey, F. & Critchley, I. A. Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermis with fibronectin using surface plasmon resonance (BIACORE). *J Micro Methods* **28**, 77-84 (1997).
- 140 Quinn, J. G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B. D. & O'Kennedy, R. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem* **281**, 135-143 (2000).
- 141 Xing, L., Tjarnlund, K., Lindqvist, B., Kaplan, G. G., Feigelstock, D., Cheng, R. H. & Casasnovas, J. M. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *Embo J* **19**, 1207-1216 (2000).
- 142 Cooper, M. A., Hansson, A., Lofas, S. & Williams, D. H. A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal Biochem* **277**, 196-205 (2000).

- 143 Hoffman, T. L., Canziani, G., Jia, L., Rucker, J. & Doms, R. W. A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11215-11220 (2000).
- 144 Internetseite der Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>
- 145 Ryu, S. E., Kwong, P. D., Truneh, A., Porter, T. G., Arthos, J., Rosenberg, M., Dai, X. P., Xuong, N. H., Axel, R., Sweet, R. W. & *et al.* Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* **348**, 419-426 (1990).
- 146 Wang, J. H., Yan, Y. W., Garrett, T. P., Liu, J. H., Rodgers, D. W., Garlick, R. L., Tarr, G. E., Husain, Y., Reinherz, E. L. & Harrison, S. C. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* **348**, 411-418 (1990).
- 147 Garrett, T. P., Wang, J., Yan, Y., Liu, J. & Harrison, S. C. Refinement and analysis of the structure of the first two domains of human CD4. *J Mol Biol* **234**, 763-778 (1993).
- 148 Brady, R. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Lange, G., Davis, S. J., Williams, A. F. & Barclay, A. N. Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH₂-terminal domains. *Science* **260**, 979-983 (1993).
- 149 Ryu, S. E., Truneh, A., Sweet, R. W. & Hendrickson, W. A. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure* **2**, 59-74 (1994).
- 150 Willibold, D. & Rösch P. Solution structure of the human CD4 (403-419) receptor peptide. *J Biomed Sci* **3**, 435-441 (1996).
- 151 Wu, H., Kwong, P. D. & Hendrickson, W. A. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* **387**, 527-530 (1997).
- 152 Arthos, J., Deen, K. C., Chaikin, M. A., Fornwald, J. A., Sathe, G., Sattentau, Q. J., Clapham, P. R., Weiss, R. A., McDougal, J. S., Pietropaolo, C. & *et al.* Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell* **57**, 469-481 (1989).
- 153 Clayton, L. K., Hussey, R. E., Steinbrich, R., Ramachandran, H., Husain, Y. & Reinherz, E. L. Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding. *Nature* **335**, 363-366 (1988).

- 154 Mizukami, T., Fuerst, T. R., Berger, E. A. & Moss, B. Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9273-9277 (1988).
- 155 Cordonnier, A., Riviere, Y., Montagnier, L. & Emerman, M. Effects of mutations in hyperconserved regions of the extracellular glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 on receptor binding. *J Virol* **63**, 4464-4468 (1989).
- 156 Stryer, L. *Biochemie* 2. korr. Nachdruck Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994).
- 157 Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W. & Sodroski, J. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* **237**, 1351-1355 (1987).
- 158 Thali, M., Olshevsky, U., Furman, C., Gabuzda, D., Posner, M. & Sodroski, J. Characterization of a discontinuous human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope recognized by a broadly reactive neutralizing human monoclonal antibody. *J Virol* **65**, 6188-6193 (1991).
- 159 McKeating, J. A., Thali, M., Furman, C., Karwowska, S., Gorny, M. K., Cordell, J., Zolla-Pazner, S., Sodroski, J. & Weiss, R. A. Amino acid residues of the human immunodeficiency virus type I gp120 critical for the binding of rat and human neutralizing antibodies that block the gp120-sCD4 interaction. *Virology* **190**, 134-142 (1992).
- 160 Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W. & Sodroski, J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol* **64**, 5701-5707 (1990).
- 161 Sun, N. C., Ho, D. D., Sun, C. R., Liou, R. S., Gordon, W., Fung, M. S., Li, X. L., Ting, R. C., Lee, T. H., Chang, N. T. & *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibodies to the putative CD4-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **63**, 3579-3585 (1989).

- 162 Cordonnier, A., Montagnier, L. & Emerman, M. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* **340**, 571-574 (1989).
- 163 Reed, J. & Kinzel, V. A conformational switch is associated with receptor affinity in Peptides derived from the CD4-binding domain of gp120 from HIV I. *Biochemistry* **30**, 4521-4528 (1991).
- 164 Sacerdote, P., Ruff, M. R., & Pert C. B. Vasoactive intestinal peptide 1-12: A ligand for the CD4 (T4)/human immunodeficiency virus receptor. *J Neurosci Res* **18**, 102-107 (1987).
- 165 ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics, http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html
- 166 Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques. Harcourt Publishers Ltd, 114-117 (1996).
- 167 Malvoisin, E. & Wild, F. Analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein interaction with the CD4 host cell receptor. *J Gen Virol* **75**, 839-847 (1994).
- 168 Borchers, C. & Tomer, K. B. Characterization of the noncovalent complex of human immunodeficiency virus glycoprotein 120 with its cellular receptor CD4 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **38**, 11734-11740 (1999).
- 169 Zeder-Lutz, G. Benito, A. & Van Regenmortel, M. H. Active concentration measurements of recombinant biomolecules using biosensor technology. *J Mol Recognit* **12**, 300-309 (1999).
- 170 Autiero, M., Gaubin, M., Mani, J. C., Castejon, C., Martin, M., el Marhomy, S., Guardiola, J. & Piatier-Tonneau, D. Surface plasmon resonance analysis of gp17, a natural CD4 ligand from human seminal plasma inhibiting human immunodeficiency virus type-1 gp120-mediated syncytium formation. *Eur J Biochem* **245**, 208-213 (1997).
- 171 BIAevaluation Software Handbook, Version 3.0, Seite A-6, Edition July 1997.
- 172 Nieba, L., Krebber, A. & Plückthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: Large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-165 (1996).

- 173 Shinohara, Y., Hasegawa Y., Kaku, H. & Shibuya, N. Elucidation of the mechanism enhancing the avidity of lectin with oligosaccharides on the solid phase surface. *Glycobiology* **7**, 1201-1208 (1997).
- 174 Scherf, T. & Anglister, J. A. T1 rho-filtered two-dimensional transferred NOE spectrum for studying antibody interactions with peptide antigens. *Biophys J* **64**, 754-761 (1993).
- 175 Piotto, M., Saudek, V., & Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **2**, 661-665 (1992).
- 176 Hwang, T.-L. & Shaka, A. J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J Magn Reson Series A* **112**, 275-279 (1995).
- 177 Canet, D., Brondeau, J., Mischler, E. & Humbert, F. Solvent suppression by use of a DANTE train of B₁ gradient pulses. *J Magn Reson Series A* **105**, 239-244 (1993).
- 178 Mayer, M. STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Dissertation Hamburg (2001).
- 179 Weimar, T., Bukowski, R. & Young, N. M. The conformation of the T-antigen disaccharide bound to maclura pomifera agglutinin in aqueous solution. *J Biol Chem* **275**, 37006-37010 (2000).
- 180 Trauneker, A., Luke, W. & Karjalainen, K. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature* **331**, 84-86 (1988).
- 181 Nelson, L. M. & Jerome H. K. *Methods in Molecular Medicine - HIV-Protocols* Verlag Humana Press, Totowa, New Jersey, (1998).
- 182 Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. & Lusso, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815 (1995).
- 183 Sanchez-Pescador, R., Power, M. D., Barr, P. J., Steimer, K. S., Stempien, M. M., Brown-Shimer, S. L., Gee, W. W., Renard, A., Randolph, A. & Levy, J. A. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**, 484-492 (1985).
- 184 TECHNICAL BULLETIN, PE Biosystems, Rev. 1 10/99.

- 185 Möller, H. Diplomarbeit, Universität Hamburg (1999).
- 186 Solé, N. A. & Barany, G. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala⁸]-dynorphin A1-3. *J Org Chem* **57**, 5399-5403 (1992).
- 187 Schulte, B. Schwerpunktarbeit, Universität Hamburg (2001).
- 188 Bax, A. & Davis, D. G. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J Magn Reson* **65**, 355-360 (1985).
- 189 Palmer III, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E. & Rance, M. Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J Magn Reson* **93**, 151-170 (1991).

DANKSAGUNG

Meinen Eltern und meiner Schwester Katrin für die jahrelange Unterstützung.

Allen Mitgliedern des AK Meyer.

Heiko Möller für die tolle Zusammenarbeit.

Florian Ende und Oliver Schuster für die grandiose Zeit in Raum 20.

Moriz Mayer und Oliver Schuster für die zahllosen Gespräche "*in Sachen NMR*".

Robert Meineke für die vielen unglaublichen "Basteleien".

Britta Schulte für Ihre Arbeiten mit den biotinylierten Peptiden.

Sonja Meyer und Angela Kahrs für die Synthese und Bereitstellung des Glycopeptids.

Thio Weimar für die Biacore Einweisung.

LEBENS LAUF

geboren am 01. März 1968 in Hamburg, ledig

- 08.74 - 06.78** Grundschule, Strenge, Hamburg
- 08.78 - 06.88** Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg
- 06.86 - 01.89** Doppelqualifikation: Gymnasium Altona/Staatliche Gewerbeschule G13 Ausbildung zum staatlich geprüften Chemisch-Technischen Assistenten (CTA)
- 01.89 - 03.89** Zeitarbeit als CTA in Hamburg
- 04.89 - 06.90** Wehrdienst
- 04.90 - 02.93** Grundstudium Chemie an der Universität Hamburg, Abschluß: Vordiplom
- 02.93 - 07.93** Auslandssemester in Spanien (Sevilla)
- 02.93 - 07.96** Hauptstudium Chemie an der Universität Hamburg
Wahlpflichtfach: Biochemie Schwerpunktarbeit: Biochemie Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, PD Dr. Leippe, Hamburg
- 09.96 - 06.97** Diplomarbeit bei Prof. B. Meyer, Universität Hamburg
Synthese und NMR-spektroskopische Konformationsanalyse eines antimikrobiellen Peptides, abgeleitet vom Protein *amoebapore A* aus *Entamoeba histolytica*
- 26.07.97** Abschluß und Verleihung des akademischen Grades Diplomchemiker, Gesamtnote: „sehr gut“
- 09.97 – 07.01** Doktorarbeit bei Prof. Dr. B. Meyer, Universität Hamburg
Entwicklung CD4 bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion.

Anstellungsverhältnisse

- 09.95 - 07.96** Wissenschaftliche Hilfskraft im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin PD Dr. Leippe, Hamburg
- 10.96 - 03.97** Lehrtätigkeit Universität Hamburg für das Grundpraktikum in Organischer Chemie für Medizin- und Zahnmedizin-Studenten
- 03.97 - 07.97** Computerbeauftragter des Instituts für Organische Chemie
- 09.97 - 03.01** Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Organische Chemie

Veröffentlichung

Andrä, J., Berninghausen, O., Wülken, J. & Leippe, M. (1996) Shortened *amoebapore* analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity. *FEBS Lett.*, **385**, 96-100.

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