

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.