Synthese und Analyse von Liganden des CCR5-Rezeptors

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Fachbereich Chemie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Beatrice Jürs

aus Hamburg

im 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Betzel

Tag der Disputation: 02.12.2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2008 bis Dezember 2011 in dem Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. B. Meyer, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Meyer durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für Überlassung dieses interessanten Themas und die stetige freundliche und wertvolle Unterstützung.
Herrn Prof. Dr. C. Betzel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Wirkstoffforschung 1
1.2 Der Humane Immundefizienzvirus (HIV) 2
1.3 Replikationszyklus des HIV 5
1.4 CCR5 – natürliche Liganden und Inhibitoren 8
2. Methoden 12
2.1 Peptidsynthese 12
2.3 Oberflächenplasmonenresonanz 13
2.2 Durchflusszytometrie 15
2.4 Sättigungstransfer-Differenz-STD-NMR-Spektroskopie 17
2.5 Sättigungstransfer-Doppeldifferenz-STDD-NMR-Spektroskopie 18
2.6 Konformationsanalyse von Peptiden 19
2.7 *Molecular Modeling* 23
3. Aufgabenstellung 25
4. Ergebnisse und Diskussion 26
4.1 Synthese und Analyse der Peptiden 27
4.2 SPR-Messungen der Peptidbibliothek mit GHOST(3)-Zellen 29
4.3.1 SPR-Messungen der C1-Region des gp120 30
4.3.2 SPR-Messungen der C4-Region des gp120 30
4.3.3 Auswertung der SPR-Daten 40
4.3 Durchflusszytometrie mit GHOST(3)-Zellen 45
4.3.1 Quantitative Bestimmung des CCR5-Rezeptors 45
4.3.2 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten 53
4.4 STDD-NMR-Spektroskopie der Leitstruktur **2** und Liposomen 62
4.4.1 Präparation von Liposomen aus Zellen 62
4.4.2 STDD-NMR-Titration 63
4.5 Konformationsanalyse der Leitstruktur **2** mittels NMR-Spektroskopie 68
4.5.1 Berechnung der Abstände und ϕ-Winkel aus NMR-Spektren 68
4.5.2 Beschränkungen und DG-Rechnung 76
4.6 Homologie der C4-Region 81
4.7 *Molecular Dynamics*-Simulation 84
4.7.1 MD-Simulationen der Sequenz 436-443 des gp120 mit dem CCR5-Rezeptor 84
4.7.2 Vergleich der Strukturen aus MD-Simulation und Konformationsanalyse 97

5. Zusammenfassung **99**
6. Summary **102**
7. Experimenteller Teil **104**
7.1 Verwendete Geräte und Materialien 104
7.1.1 Chemikalien 104
7.1.2 Zellen und Antikörper 105
7.1.3 Materialien 105
7.1.4 Geräte 106
7.1.5 Puffer, Lösungen und Medien 107
7.1.6 Software 108
7.2 Peptidsynthese 108
7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs) 108
7.2.2 Synthese der Peptide 111
7.2.3 Synthese des Cy3-markierten Peptids **2+Cy3** 120
7.3 Kultur humaner Zellen 120
7.4 SPR-Bindungsstudien 121
7.4.1 Immobilisierungen der Peptide 121
7.4.2 Messungen mit Zellen 123
7.5 Durchflusszytometriemessungen 124
7.5.1 Quantitative Durchflusszytometriemessungen 124
7.5.2 Durchflusszytometriemessungen mit fluoreszenzmarkiertem Peptid **2+Cy3** 124
7.6 STDD-NMR-Spektroskopie 125
7.6.1 Präparation von Liposomen 125
7.6.2 STDD-NMR-Titration 125
7.7 Konformationsanalyse 126
7.7.1 EASYROESY-Spektren und Berechnung der Aufbaukurven 126
7.7.2 Berechnung der ϕ-Winkel 126
7.7.3 DG-Rechnung 127
7.8 Homologie der C4-Region 127
7.9 *Molecular Dynamics*-Simulationen 128
8. Toxikologische Daten **129**
9. Anhang **133**
9.1 Homologie des gp120 133
9.2 Pulsprogramm EASYROESY 134

9.3 *Molecular Dynamics*-Simulation – *Simulation Quality Analysis* 137
9.3.1 *Simulation Quality Analysis* des Peptids **2** ^{436}APPIEGQI^{443} 137
9.3.2 *Simulation Quality Analysis* des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443} 138
10. Literatur 139
Danksagung 150
Lebenslauf 152
Erklärung 154

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-, zweidimensional
7TM	7-Helixtransmembran
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac_2O	Essigsäureanhydrid
AIDS	*acquired immunodeficiency syndrome*
AS	Aminosäure
BLAST	*basic local alignment search tool*
CCR5	*chemokine (c-c motiv) receptor 5*
CD4	*Cluster of Differentiation 4*
CDC	*Centers for Disease Control*
cDNA	*coding desoxyribonucleic acid*
CRF	*circulating recombinant form*
CV	Säulenvolumen *(column volume)*
CXCR4	*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*
Cy3	Cyanin-3
CYANA	*combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications*
DG	*distance geometry*
DIPEA	*N*,*N*-Di*iso*propylethylamin
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMF	*N*,*N*-Dimethylformamid
DNA	*desoxyribonucleic acid*
EASYROESY	*efficient adiabatic symmetrized rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy*
ECEPP	*empirical conformational energy program for peptides*
ECL	*extracellular loop*
EDC	*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N´*-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylamin-N,N,*N'*,*N'*-tetraacetat
FACS	*fluorencence activated cell sorting*
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1, FL-2	Fluoreszenzparameter-1, -2
Fmoc	9*H*-Fluorenylmethoxycarbonyl

FSC	*forward scatter*
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GHOST	*green fluorescent osteosarcoma cell*
gp	Glycoprotein
GPCR	*G-protein-coupled receptor*
HAART	*highly activate anti-retroviral therapy*
HIV	*human immunodeficiency virus*
HPLC	*high performance liquid chromatography*
IgG	Immunglobulin G
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante
LADME	*liberation, absorption, distribution, metabolism, excretion*
LUV	*large unilamellar vesicle*
mAb	*monoclonal antibody*
MALDI-TOF	*matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*
MD	*molecular dynamic*
MIP	*macrophage inflammatory protein*
MS	Massenspektrometrie
MW	*molecular weight*
MWCO	*molecular weight cut off*
m/z	Masse/Ladung
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NIH	*National Institute of Health*
NMR	*nuclear magnetic resonance*
NOE	*nuclear Overhauser enhancement*
NOESY	*nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy*
O*t*Bu	*tert*-Butoxy
PBS	*phosphate buffered saline*
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pI	isoelektronischer Punkt
Pip	Piperidin
ppm	*parts per million*
RANTES	*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*
REDAC	*redundant dihedral angle constraints*

rmsd	*root-mean-square deviation*
RNA	*ribonucleic acid*
ROE	*rotating frame Overhauser enhancement*
ROESY	*rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy*
RP	*reversed phase*
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RU	*response unit*
SA	Sinapinsäure
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SIV	*simian immunodeficiency virus*
SIV_{cpz}	*simian immunodeficiency virus/chimpanzee*
SIV_{sm}	*simian immunodeficiency virus/sooty mangabey*
SPR	*surface plasmon resonance*
SSC	*sidewards scatter*
ssRNA	*single-stranded ribonucleic acid*
STD	*saturation transfer difference*
STDD	*saturation transfer double difference*
*t*Bu	*tert*-Butyl
TBTU	*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Tri*iso*propylsilan
TOCSY	*total correlation spectroscopy*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
UV	Ultraviolett
WATERGATE	*water suppression by gradient-tailored excitation*
WHO	*World Health Organization*

1. **Einleitung**

1.1 Wirkstoffforschung

Als Emil Fischer im Jahre 1894 den Begriff Schlüssel-Schloss-Prinzip einführte: „*...Um ein Bild zu gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie Schloss und Schlüssel zu einander passen müssen, um eine chemische Wirkung auf einander ausüben zu können...*“[1], sollte er damit das Konzept der medizinischen Chemie für ein halbes Jahrhundert prägen. Die hypothetische Schlüssel-Schloss-Metapher beschreibt die spezifische Bindung von Enzym und Substrat und wurde 1958 durch das Postulat des *induced fit* von Daniel E. Koshland[2] erweitert.
Diese beiden Modelle waren wegbereitend für die aktuelle Forschung der medizinischen Chemie, die gerade innerhalb der letzten Jahrzehnte durch neu etablierte Methoden eine weitere Entwicklung erfuhr. Generell wird in der Wirkstoffforschung die Wechselwirkung eines Liganden mit einem *target*, der meist ein Rezeptor, Enzym oder Ionenkanal darstellt, untersucht. Heutzutage wird die Entwicklung eines neuen Wirkstoffs in *high-throughput screening* (HTS), fragmentbasiertes und strukturbasiertes Design unterteilt.
Beim fragmentbasierten Wirkstoffdesign[3] werden aus einer Liste verfügbarer Chemikalien diejenigen herausgesucht, die über gute physio-chemische Eigenschaften verfügen. Entscheidend ist hierbei, dass diese nur Massen bis zu 250 Da, im Gegensatz zur Wirkstoffgröße des HTS mit 300 - 500 Da, aufweisen. Für oral verabreichte Wirkstoffe sollten dabei die Richtlinien der *Rule of Five*[4] eingehalten werden, die Maßstab über die Bioverfügbarkeit sind. Die entstehende Bibliothek umfasst bis zu 2000 Fragmente, die durch beispielsweise NMR basierte Kompetitivmessungen auf 10-100 *hits* mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich selektiert wird. Diese *hits* werden durch Zusammenfügen der Fragmente mittels *structure-activity relationships* (SAR) Analysen optimiert, was zu einem sogenannten *lead* mit verbesserter Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich führt.[5-6] Der erhaltene, weiter optimierte *lead* durchläuft anschließend die präklinische Prüfung, die in den Phasen der klinischen Forschung mündet.
Ein anderes Prinzip bietet HTS, das in den 1990ern in der Industrie eine hohe Konjunktur erlebte. Bei diesem Verfahren werden bis zu eine Millionen Verbindungen in einmaligen Analysen vermessen, die Qualitäts- und Quantitätsansprüche dabei jedoch meist vernachlässigt und pharmakologische Parameter werden unzureichend berücksichtigt.[3] Weiterhin stellt die *hit-to-lead*-Optimierung ein großes Problem bei diesem Verfahren dar.
Im Gegensatz dazu steht das strukturbasierte Wirkstoffdesign. Ausgehend von einem natürlichen Liganden des *targets*, der Kristallstruktur eines Proteins oder, wenn nicht

vorhanden, einem Homologiemodell werden computergestützte Untersuchungen zur Findung und Optimierung eines Liganden durchgeführt, der gut in die Bindungsstelle passt.[7] Der anschließend synthetisierte Ligand wird daraufhin mittels verschiedener Methoden wie beispielsweise NMR und SPR in mehreren Optimierungszyklen auf seine Bindungsaffinität geprüft.

Neben der Pharmakodynamik, also der biologischen Wirkung eines Wirkstoffs, ist ebenfalls vor Eintritt eines Wirkstoffs in die klinischen Phasen die Pharmakokinetik eines Stoffs zu prüfen. Dazu gehören unter anderem die Plasmahalbwertszeit und die LADME-Parameter (*libertation*, *absorption*, *distribution*, *metabolism*, *excretion*), die Auskunft über die Wirkung des Wirkstoffs auf den Organismus geben.[8]

1.2 Der Humane Immundefizienzvirus (HIV)

Der Humane Immundefizienzvirus (HIV) ist Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), die zum ersten Mal 1981 bei Patienten in den USA diagnostiziert wurde.[9] Seit der Entdeckung des Virus im Jahre 1983 von Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier hat sich das Auftreten der Infektionen zu einer globalen Pandemie entwickelt.[10-11] Die WHO und UNAIDS publizierten im Jahre 2009, dass weltweit 33.3 Millionen Menschen mit HIV infiziert seien, wobei jährlich 2.6 Millionen Neuinfizierte gezählt würden (Abbildung 1). Die durch den Virus ausgelöste Krankheit AIDS forderte alleine im Jahr 2009 1.8 Millionen Todesopfer.

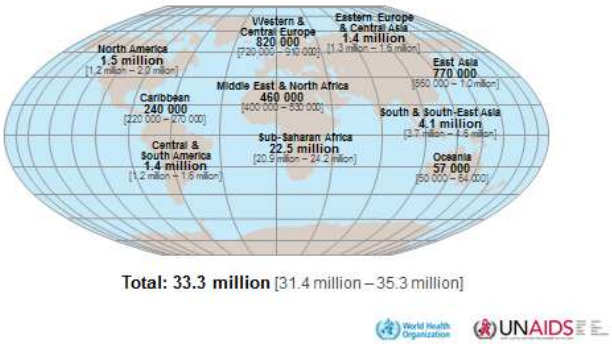


Abbildung 1: Globale Verteilung der HIV-Infektionen des WHO Berichts aus dem Jahr 2009. Weltweit sind 33.3 Millionen Menschen mit HIV infiziert, pro Jahr werden 2.6 Millionen Neuinfizierte gezählt.[12]

HIV lässt sich in zwei Arten unterteilen, dem Humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) und -2 (HIV-2), wobei letzteres erstmalig im Jahre 1985 identifiziert werden konnte. HIV-1 wiederum wird in verschiedene Subklassen unterteilt, die M-Gruppe (*major*), O-Gruppe (*outlier*),

N-Gruppe (*new*) und P-Gruppe. Außerdem unterliegt die M-Gruppe einer weiteren Differenzierung in 9 verschiedene Subtypen. Eine Coinfektion dieser Subtypen führt zu der rekombinanten Form CRF (*circulating recombinant form*). Ungefähr 98% der weltweiten Infektionen gehören der M-Gruppe an, die unterschiedlichen Subtypen sind geographisch gebunden. So ist in Amerika und Europa beispielsweise der Subtyp B dominierend, in Indien hingegen liegt hauptsächlich der Subtyp C vor. Auch das Auftreten der anderen Gruppen des HIV-1 ist ortsgebunden. Viren der O-Gruppe treten in West-Zentral-Afrika auf, die N- und P-Gruppe sind sehr selten und fast ausschließlich im Kamerun zu finden.

Der Ursprung von HIV-2 konnte 1989 aufgedeckt werden.[13-14] Mangaben, die in Westafrika als Haustiere gehalten werden und häufig mit dem Virus SIV_{sm} (SIV, Simianes Immundefizienzvirus), infiziert sind, sind die Überträger dieser Form des Humanen Immundefizienzvirus. Eine weitere Form des Virus, SIV_{smm}, wurde anschließend in weiteren Affen Westafrikas entdeckt. Die Herkunft des HIV-1 war lange Zeit unbekannt, bis sich herausstellte, dass das Virus SIV_{cpz}, dass Schimpansen befällt, eine enge Verwandtschaft mit HIV-1 aufweist und somit als Ursprung dieser Zoonose gilt.[15]

Das Humane Immundefizienzvirus ist ein Retrovirus und gehört der Gattung der Lentiviren an.[16] Im Inneren der Lipiddoppelschicht des 120 nm großen Virions (Abbildung 2) befindet sich ein konisch geformtes Capsid, welches aus p24 Proteinen aufgebaut ist. Im Inneren dieses Capsids befinden sich zwei Kopien positiver einzelsträngiger RNA (ssRNA). Das Genom besteht aus 9 Leserahmen, wovon *gag*, *pol* und *env* insgesamt 15 Proteine kodieren. *Gag* beinhaltet die Matrix, das Capsid, Nucleocapsid und das Linkerprotein p6. *Pol* kodiert die drei Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase, die essentielle Funktionen im viralen Replikationszyklus haben. Die beiden Proteine des *env* Gens sind das membranverankerte gp41 und daran gebundene gp120. Die sechs anderen Leserahmen sind akzessorische, regulatorische Gene und kodieren die Proteine Vif, Vpr, Nef, Tat, Rev und Vpu.

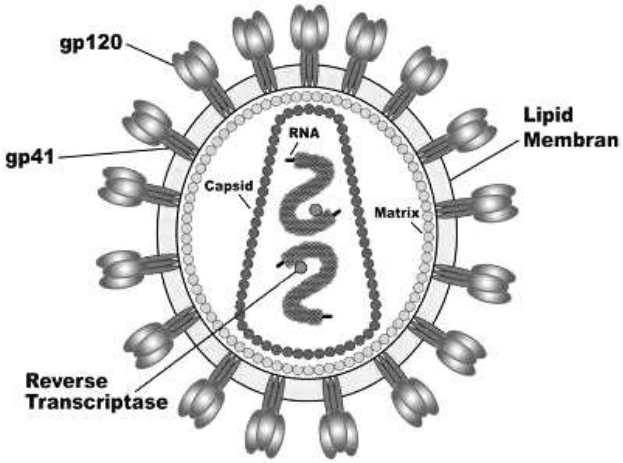


Abbildung 2: Schematische Darstellung des HI-Virions. Im Inneren der Membran befindet sich das Capsid, in dem zwei ssRNA Stränge und die viralen Enzyme vorliegen. Die beiden Glycoproteine gp41 und gp120 bilden die membranständigen Proteine.[17]

Die beiden Glycoproteine gp41 und gp120 werden beim Durchgang der zellulären Membran durch die Spaltung des Glycoproteins gp160 mit Hilfe der viralen Protease gebildet. Das gp41 ist in der viralen Membran verankert und bindet mit seiner extrazellulären Domäne nicht-kovalent an das gp120. Die entstehenden Heterodimere der beiden Glycoproteine liegen als Trimere vor.[18-19]

Das gp120 (Abbildung 3) ist ein hochglykosyliertes 120 kDa schweres Protein und baut sich alternierend aus fünf variablen Schleifen, den sogenannten V-*loops* (V1 bis V5), und fünf konservierten C-Regionen (C1 bis C5) auf.[20] Das Protein bildet eine globuläre Struktur aus 25 β-Faltblättern, fünf α-Helices und 10 *loops*. Diese Struktur formt sich zu einer *inner domain*, einer *outer domain* und der sogenannten *bridging sheet*, die die beiden anderen Domänen verbindet und erst rezeptorgebunden in dieser Konformation vorliegt.[21-24] Die *bridging sheet*, die die V1- und V2-*stems* und C4-Region beinhaltet, präsentiert ein Antikörper-neutralisierendes Epitop.

Die variablen V-*loops* weisen eine hohe Verschiedenheit der Sequenzen auf, was auf die starke Fehlerrate der Transkriptionsprozesse und eine dadurch bedingte hohe genetische Variabilität zurückzuführen ist.[25] Weiterhin zeigten Curlin *et al.*, dass sich auch die Länge der variablen *loops* und deren Glykosilierungsgrad im Laufe der Infektion verändern.[26] So wurden selbst bei Folgeisolaten aus demselben Patienten im Verlauf der Erkrankung signifikante Unterschiede der Sequenzen der V-*loops* detektiert.[16]

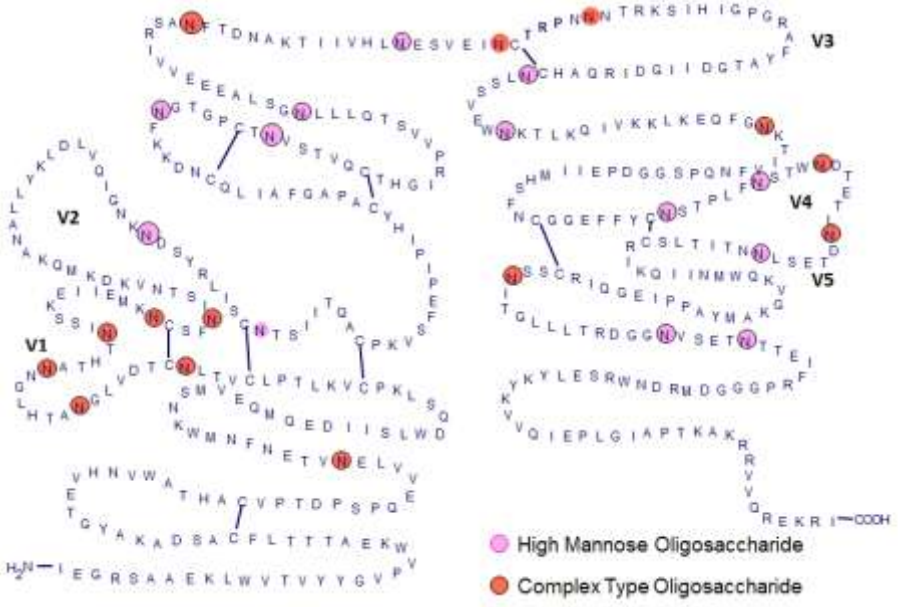


Abbildung 3: Schematische Struktur des gp120.[27] Das Protein besteht aus 5 variablen V-*loops* und 5 konservierten C-Regionen. Die möglichen Glykosilierungsstellen sind mit Kreisen markiert.

1.3 Replikationszyklus des HIV

Das Humane Immundefizienzvirus befällt $CD4^+$-Zellen, wie T-Helferzellen, Monocyten, Makrophagen und dendritischen Zellen.[28] Der Replikationszyklus wird in verschiedene Stufen eingeteilt: dem Eintritt (*entry*), der reversen Transkription, der Integration, der Zusammenlagerung (*assembly*) und zuletzt der Ausknospung (Abbildung 4 a-e).

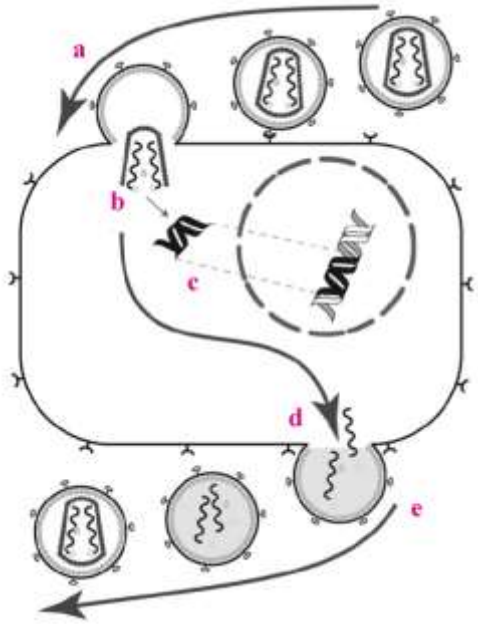


Abbildung 4: Replikationszyklus des HIV.[29] Mit a: *entry*, b: reverse Transkription, c: Integration, d: *assembly* und e: Ausknospung mit folgender Maturation.

Der erste Schritt des Replikationszyklus des Virus ist der *entry* (Abbildung 4a, Abbildung 5a), in dem zunächst eine Wechselwirkung des viralen gp120 mit dem CD4-Rezeptor der humanen Zelle stattfindet (Abbildung 5b). Durch die Bindung des gp120 zum CD4-Rezeptor wird eine Konformationsänderung induziert, wodurch ein zweites Epitop des gp120 freigelegt wird.[30-31] Die Corezeptoren des gp120 sind der CCR5- und CXCR4-Rezeptor, die der Familie der Chemokin-Rezeptoren angehören. Die Viren, die CCR5 als Corezeptor verwenden, werden R5-Isolate bzw. R5-Viren genannt, jene die CXCR4 bevorzugen, sind dementsprechend X4-Isolate bzw. X4-Viren.[32-34]
Die Frage, welcher Corezeptor bevorzugt wird, ist noch Gegenstand der Forschung. Es konnten R5-Isolate in der Frühphase von Infizierten festgestellt werden, während in späteren Phasen der Erkrankung X4-Isolate oder dualtropische Viren (X4R5-Isolate) häufiger isoliert wurden (Phenotyp-*shift*).[35-36] Bei den von Dubey *et al.* untersuchten Patienten in Indien konnte im Verlauf der Infektion eine Herabregulation von CCR5 auf Monozyten festgestellt werden, wobei die Expression von CXCR4 konstant blieb. Diese Regulation solle die infizierten Zellen vor zytotoxischen $CD8^+$-Zellen schützen.[37] Es konnte mehrfach belegt werden, dass X4-Isolate eine höhere Anzahl an positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren in der V3-*loop* aufweisen und daher Mutationen der gp120 Sequenz Grund für den Wechsel der Corezeptoren sind.[38-44,46] Rosen *et al.* fokussierten die Position 322 des gp120, die eine ionische Wechselwirkung mit der Position 440 der C4-Region eingeht.[45] Außerdem konnten Karlsson *et al.* zeigen, dass bei Patienten mit X4-Isolaten schneller die Krankheit AIDS ausbricht, wobei der Grund bis jetzt noch nicht geklärt werden konnte.[46]

Der nächste Schritt des Replikationszyklus ist die Bindung an den primären Rezeptor CD4 und Corezeptor CCR5 (Abbildung 5c), wodurch eine weitere Konformationsänderung im gp120 induziert wird. Die virale Determinante, die für die Interaktion mit dem CCR5 verantwortlich ist, wird der V3-*loop* des gp120 zugeschrieben.[47] Diese Konformationsänderung erlaubt der hydrophoben Fusionsdomäne des gp41 in die Membran der Wirtszelle einzudringen (Abbildung 5d).[48] Die drei gp41-Glycoproteine formen anschließend das sogenannte *trimer of hairpins* mit dem 6-helikalen Bündel-Motiv, so dass sich die virale Membran und die der Wirtszelle in unmittelbarer Nähe befinden (Abbildung 5e).[49] Durch diese Interaktionen kommt es zur Fusion der beiden Zellmembranen, wodurch das Capsid mit der viralen Erbinformation in die Wirtszelle eintreten kann (*uncoating*, Abbildung 5f).

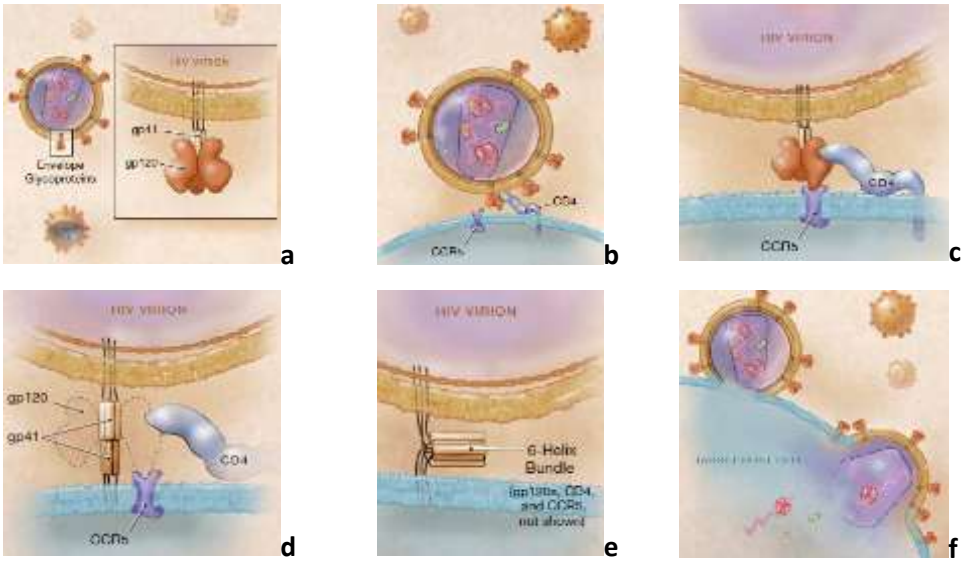


Abbildung 5: Detaillierte Abfolge des *entry*.[50] a: Virion mit den membranständigen Glycoproteinen, b: Wechselwirkung des gp120 mit dem Primärrezeptor CD4 an Wirtszelle, c: Interaktion des gp120 mit Corezeptor CCR5, d: Fusionsdomäne des gp41 an Wirtszelle, e: 6-helikales Bündel-Motiv des gp120 und gp41, f: Fusion der Zellmembranen.

Der nächste Schritt des Replikationszyklus ist die reverse Transkription, bei dem die virale Reverse Transkriptase die ssRNA in die provirale cDNA umschreibt (Abbildung 4b). Die cDNA wird, gebunden an die viruseigene Integrase als Nukleoproteinkomplex, in den Zellkern transportiert und mit Hilfe der viralen Integrase in die DNA der Wirtszelle insertiert (Abbildung 4c). Das virale Genom wird daraufhin vervielfältigt und die viruseigenen Proteine translatiert. Die Hüllproteine Env werden an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert, im Gegensatz dazu werden alle anderen viralen Proteine an den freien Ribosomen im Zytoplasma gefertigt. An der Wirtzellmembran kommt es, gesteuert vom Polyprotein Gag, anschließend zum *assembly* (Abbildung 4d). Dabei sammeln sich die virale RNA, *Precursor*-Proteine und die Glycoproteine gp41 und gp120 an der Membran, die durch Ausknospung, dem sogenannten *budding*, abschließend neue, noch unreife Virionen bilden (Abbildung 4e). Nach der Freisetzung aus der Wirtszelle erfolgt die Maturation zu infektiösen Viren über die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease und zeitgleicher struktureller Umlagerung zum konischen Capsid.

Die HIV-Erkrankung wird nach den *Centers of Disease Control* (CDC) in drei Stadien eingeteilt.[51] In der ersten symptomfreien Phase liegt der Anteil von $CD4^+$-Zellen über einem Wert von 500 Zellen/µL Blut. Dabei entstehen pro Tag bis zu 10^9 neue Viren, die jedoch vom noch intakten Immunsystem abgefangen werden können. Dieses Gleichgewicht bricht bei dem Übergang in die zweite, sogenannte symptomatische Phase ein. Die Anzahl der $CD4^+$-Zellen

liegt bei 200-499 Zellen/µL Blut. Grund für die Verminderung der $CD4^+$-Zellen ist einerseits eine eingeleitete Apoptose, zum anderen werden sie von zytotoxischen $CD8^+$-Zellen lysiert. Im AIDS-Stadium, der letzten und dritten Phase der Erkrankung, ist die Architektur der Lymphkoten zerstört und alle restlichen $CD4^+$-Zellen produzieren HI-Viren. Die Konzentration der $CD4^+$-Zellen liegt dabei unter der kritischen Grenze von 200 Zellen/µL Blut.

1.4 CCR5 – natürliche Liganden und Inhibitoren

CCR5 ist ein aus 352 Aminosäuren bestehender Chemokin-Rezeptor der 7-Helixtransmembranproteine (7TM), die zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören.[52-55] Zu finden ist dieser Rezeptor unter anderem auf T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen. Die Struktur beinhaltet drei extrazelluläre *loops* und vier intrazelluläre *loops*, die durch hydrophobe transmembrane Domänen unterteilt sind. Der N-Terminus befindet sich an der ersten extrazellulären *loop* (ECL1), der C-Terminus ist intrazellulär gelegen (Abbildung 6). Am N-Terminus, der reich an aciden Aminosäuren ist, befindet sich eine ungewöhnliche posttranslationale Modifikation bestehend aus vier sulfatierten Tyrosinen.[56]

Die genaue Struktur des CCR5 ist unbekannt, da es noch nicht möglich war, eine Kristallstruktur zu erhalten. Es wird aber davon ausgegangen, dass eine strukturelle Ähnlichkeit zum Rhodopsin vorhanden ist.[57] Kontrovers ist jedoch die Sequenzdiversität, da weniger als 30% Übereinstimmung der Homologie zwischen Rhodopsin und CCR5 vorliegt.[58]

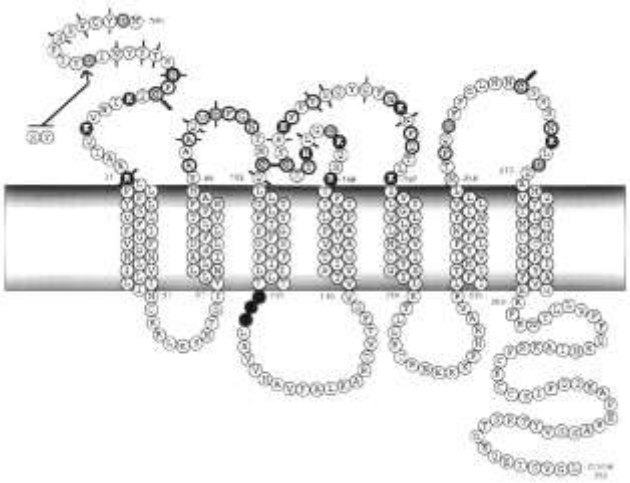


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur von CCR5, ein Chemokin-Rezeptor der Superfamilie der GPCRs.[59] Das Protein besteht aus drei extrazellulären und vier intrazellulären *loops*. Die schwarz eingefärbten Aminosäuren der ersten intrazellulären *loop* stellen die Bindungsstelle des gekoppelten G-Proteins dar. Am N-Terminus sind die vorliegenden sulfatierten Tyrosine hervorgehoben.

Die natürlichen Liganden des CCR5 sind die allosterischen Chemokine *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1α, (MIP)-1β und RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*).[32, 60-61] Durch die Bindung zwischen CCR5 und einem der Chemokine kommt es zur Dissoziation des intrazellulär gekoppelten G-Proteins (Guaninnucleotid-bindendes Protein).[62] Das G-Protein induziert daraufhin eine Signaltransduktion, wodurch es unter anderem zur Chemotaxis der Zellen kommt.[50]

Die Wechselwirkung des HI-Virus mit diesem Corezeptor findet am N-Terminus und der ECL2 des CCR5 statt.[63-64] Dabei wechselwirkt der N-Terminus mit der *bridging sheet* des gp120, wobei besonders den Asparaginsäuren 2 und 11 und den sulfatierten Tyrosinen 3, 10, 14 und 15 des CCR5 eine Interaktion zugeschrieben wird. Die sulfatierten Tyrosine 10 und 14 sind dabei essentiell zur Einleitung des Zellfusionsprozesses.[65] Lam *et al.* konnten NMR-spektroskopisch belegen, dass R298, N302, T303 des V3-*stem* und G441 der C4-Region der *bridging sheet* eine starke Bindung zum Tyrosin 14 aufweisen.[65] Während das gp120 nur an CD4 gebunden ist, ist die V3-*loop* noch flexibel, doch durch Wechselwirkungen mit der ECL2 des CCR5 wird eine Rigidität dieser Region und damit die Möglichkeit der viralen Fusion induziert.[66] Suphaphiphat *et al.* war es möglich, mittels ELISA und Reporter Gen Aktivitäts Assays an V3- und C4-Mutanten zu belegen, dass sowohl die V3-*loop* als auch Aminosäuren der C4-Region, interagierend mit CCR5, für die Fusion des Virus verantwortlich sind.[67] Auch Rizzuto *et al.* belegten mit einem synthetisierten Peptid dieser viralen Regionen, dass die betreffenden Aminosäuren nicht nur CCR5 sondern auch neutralisierende Antikörper bindet.[68-69] Gestützt wird diese Tatsache durch die Arbeiten von Wyatt *et al.* und Moore *et al.*, die unabhängig voneinander ein Zusammenwirken der V3-*loop* und der C4-Region durch strukturelle Nähe zeigen konnten.[70-71]

Kurz nach der Entdeckung, dass CCR5 einer der Corezeptoren des HIV ist, konnten Liu *et al.* eine Deletion von 32 Basenpaaren des CCR5-Gens (CCR5Δ32) identifizieren.[64] Durch diese Deletion entsteht ein verkürztes, nicht funktionsfähiges Protein, welches nicht an der Zelloberfläche präsentiert werden kann. Das Auftreten dieser Deletion ist geospezifisch und findet seinen Ursprung im Nordosten Europas, wo diese Besonderheit bei circa 20% der Bevölkerung vorkommt.[72] Menschen, die homozygot bezüglich CCR5Δ32 sind, sind hochresistent gegen eine HIV-Infektion und weisen keinerlei immunologische Defekte auf. In allen Fällen, in denen bei Menschen mit homozygoter Δ32-Deletion eine Infektion festgestellt wird, wurden diese durch X4-Viren befallen.[73] Heterozygote Menschen mit einem

CCR5Δ32-Allel und einem Wildtyp-Allel werden ebenfalls seltener mit HIV infiziert. Da Menschen mit einem oder zwei CCR5Δ32-Allelen keine weiteren Beeinträchtigungen ihrer Gesundheit aufweisen, ist die Entwicklung von CCR5-Inhibitoren ein bedeutender Punkt der aktuellen Forschung, um eine Inhibition des HIV-*entry* zu ermöglichen.[53, 74-75]
Ein weiterer Grund, die Entwicklung eines Inhibitors für CCR5 zu fokussieren, ist die derzeitige medikamentöse Behandlung von Infizierten. Die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) ist eine Komposition aus Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase und Protease, die im Jahr 2009 5.2 Millionen Menschen weltweit verabreicht bekamen.[76] Insgesamt stehen über 30 verschiedene Inhibitoren zur Verfügung, die verschieden miteinander kombiniert werden.[77] Dank dieser Therapie kann das Eintreten in die dritte Phase der Erkrankung (AIDS) hinausgezögert und damit die Lebensdauer der Infizierten gesteigert werden. Nachteile dieser Applikation sind jedoch einerseits die hohen Kosten dieser Therapie, die es für den Großteil der Infizierten unzugänglich macht und andererseits die starken Nebenwirkungen der Medikamente.[78] Der größte Nachteil liegt jedoch in der schnell eintreffenden Resistenzentwicklung, wodurch ständig neue Inhibitoren verabreicht werden müssen.[79]

Das aktuelle Forschungsfeld eines CCR5-Inhibitors ist weit gefächert, da sowohl Präparate zur Prophylaxe als auch zur Behandlung während einer Infektion von Interesse sind.[50] Außerdem stellen mögliche Medikamente einerseits Agonisten, die durch Bindung eine Aktivierung des Rezeptors fördern, dar. Andererseits sind Medikamente von Interesse, die inhibierend wirkende Antagonisten des CCR5 sind. Eine seltenere Ausnahme sind die nichtagonistisch-nichtantagonistischen „neutralen“ Inhibitoren.[50, 80]
Zu den wichtigsten Vertretern der Agonisten gehören die allosterischen Chemokinanaloga beziehungsweise Derivate von RANTES[81] wie PCS-RANTES[82], die an CCR5 binden und seine Internalisierung fördern. Saita *et al.* stellten einen weiteren Agonisten, das Triphenylphosphonioderivat YM-370749, vor, der ebenfalls in der Lage ist, die Internalisierung von CCR5 veranlassen und somit die virale Replikation zu inhibieren.[83]
Wesentlich häufiger vertreten sind jedoch die antagonistischen Inhibitoren des CCR5, die mit dem Suffix –viroc (*viral receptor occupancy*) gekennzeichnet werden. Der erste zugelassene Antagonist Maraviroc (Pfizer)[84] mit einem IC_{50} = 2 nM wird als Comedikament eingesetzt, insofern ein Nachweis von mindestens 80% R5-Viren vorliegt. Durch HTS und SAR-Analysen konnte der potente Antagonist Vicriviroc (Schering-Plough Corporation) identifiziert werden, der sich zur Zeit in der Phase III der klinischen Studien befindet.[85] Andere Antagonisten wie

beispielsweise Alpaviroc (GlaxoSmithKline) wurden entwickelt, jedoch während klinischer Studien als herz- und lebertoxisch befunden.[86] Jayasuriya *et al.* zeigten, dass auch natürliche Produkte als Inhibitoren eingesetzt werden können. Das Alkaloid Anibamin aus Bäumen der *Aniba species* konnte sich bei kompetitiven Bindungsstudien mit einem IC_{50} = 1 µM gegen das virale gp120 behaupten.[87]

Vertreter der Gruppe der nichtagonistisch-nichtantagonistischen „neutralen" Inhibitoren ist der humanisierte monoklonale Antikörper PRO140 (Progenics Pharmaceuticals), der bereits die Phase II der klinischen Studien erfolgreich abschließen konnte.[88]

2. Methoden

2.1 Peptidsynthese

Die von Robert B. Merrifield entwickelte Festphasensynthese ist ein Syntheseweg für Peptide an einem festen Träger.[89-90] Die Synthese basiert auf einer Verknüpfung der gewünschten Aminosäuren an einem Polystyrolharz, wobei das Peptid entgegen der biologischen Richtung vom C- zum N-Terminus synthetisiert wird. Der größte Vorteil dieser Methode besteht darin, dass das gewünschte Produkt bei jedem Schritt am Harz gebunden bleibt, so dass die jeweiligen Reaktionslösungen durch einfaches Waschen entfernt werden können. Der Syntheseweg besteht aus mehreren Schritten, um einen Kupplungszyklus zu durchlaufen (Abbildung 7).

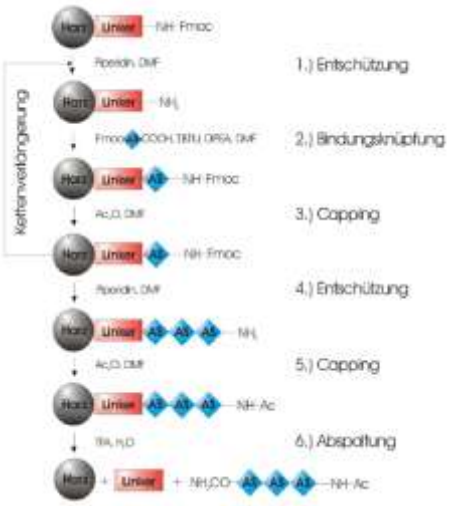


Abbildung 7: Schematischer Ablauf eines Kupplungszyklus der Festphasenpeptidsynthese. Ein Zyklus lässt sich in Entschützung der am Harz befindlichen Aminosäure, Kupplung einer zweiten Aminosäure und *capping* einteilen. Abschließend wird das erhaltene Peptid vom Harz abgespalten.

Nach der Entschützung mit Piperidin der Fmoc-geschützten Aminofunktion[91-92] der terminal am Harz befindlichen Aminosäure wird die in der Sequenz folgende Aminosäure hinzugegeben. Diese wird *in situ* mit *O*-(Benzotriazol-1-yl-)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) zum Aktivester an der Carboxyfunktion aktiviert, wodurch es zur Knüpfung einer neuen Amidbindung kommt.[93] Die nicht umgesetzten Aminofunktionen werden in einem nächsten Schritt, dem *capping*, mit Essigsäureanhydrid verestert, um keine Deletionsprodukte zu erhalten. Diese Zyklen werden solange durchlaufen, bis die gewünschte Sequenz am Harz erhalten wird. Abschließend wird das Peptid mit Trifluoressigsäure und

Tri*iso*propylsilan abgespalten, wobei gegebenenfalls die Seitenschutzgruppen ebenfalls mit abgespalten werden.[94]

Durch mikrowellenunterstützte Synthese lassen sich die Ausbeuten und Reinheiten der synthetisierten Peptide verbessern.[95-96]

2.3 Oberflächenplasmonenresonanz

Anfang der neunziger Jahre gelang es der Firma Biacore (Uppsala, Schweden) ein auf der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) beruhendes Sensorchip-Messsystem (Abbildung 8) zu etablieren, welches in der Lage ist, Interaktionen zwischen Biomolekülen zu beobachten.[97]

Die Oberflächenplasmonenresonanz wird erzeugt, indem Licht an einem Träger gemäß dem Totalreflexionsgesetz reflektiert wird und somit die Oberflächenplasmonen des auf dem Glasträger befindlichen dünnen Goldfilms angeregt werden und ein evaneszierendes Feld erzeugen.[98] In einem bestimmten Totalreflexionswinkel, dem SPR-Winkel, kommt es zur Resonanz der Plasmonen und somit einer Verstärkung des evaneszierenden Feldes.[99] Auf diesem Goldfilm ist eine Dextranmatrix aufgetragen, an der der zu untersuchende Rezeptor kovalent gebunden ist. Ein weiterer Bestandteil des Messsystems ist eine Flusszelle, in der sich der zu untersuchende Bindungspartner in Lösung befindet.[100-101] Ein Wechselwirkungsereignis zwischen diesen beiden Komponenten führt durch Änderung des Brechungsindex zu einer Änderung des SPR-Winkels. Da mit dem Auftreten von SPR eine Reduktion der Intensität des reflektierten Lichtes messbar ist, wird durch Änderung des Winkels die Verschiebung der Intensitätsmimima erfasst. Die Verschiebung des Intensitätsminimums der Totalreflexion ist also der den Messungen zugrunde liegende Parameter zur Verfolgung von Bindungsereignissen.

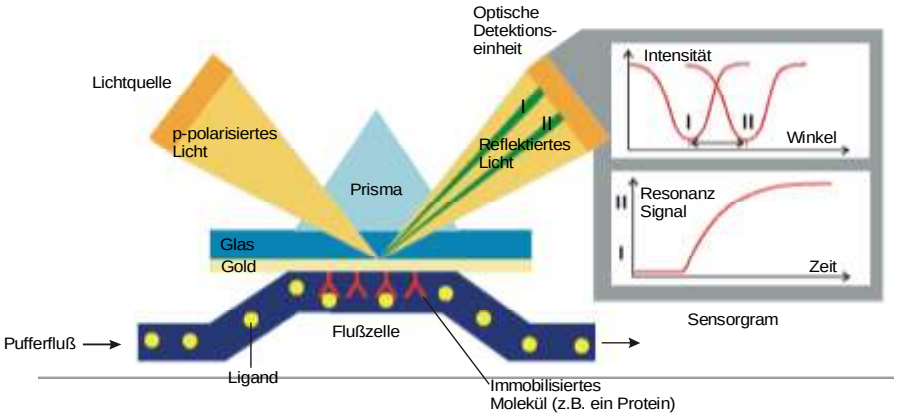


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines SPR-Messsystems. Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand werden durch Änderung des SPR-Winkels detektiert.[102]

Als Signal wird die zeitliche Veränderung des SPR-Winkels in RU (*response unit*) erfasst, wobei eine Massenänderung von etwa 1 pg einer Antwort von 1 RU entspricht. Da die Injektion der gelösten Komponente jedoch auch ohne spezifisches Bindungsereignis zu einer gewissen Veränderung des RU-Wertes führt, wird parallel zur Messung der Flusszelle stets eine Referenzzelle vermessen, auf der kein Bindungspartner immobilisiert wurde. Erst die Differenz dieser beiden RU-Werte stellt das Sensorgramm (Abbildung 9) dar. Die in Lösung befindliche Komponente wird durch die Flusszelle geleitet und der RU-Wert steigt, sofern eine Assoziation stattfindet. Nach einer leichten Dissoziation des Bindungspartners, induziert durch Beendigung der Injektion, wird mit Hilfe einer geeigneten Lösung regeneriert. Das Sensorgramm ist die Auftragung der RU-Werte von der Injektion bis zur Regeneration gegen die Zeit.

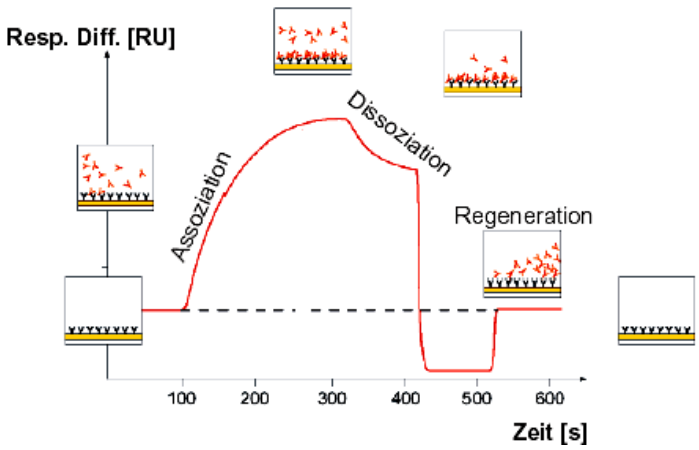


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines SPR-Sensorgramms. Nach der Assoziation eines Bindungspartners an einen immobilisierten Bindungspartner erfolgt die Dissoziation. Die Regeneration wird mittels einer Regenerationslösung eingeleitet.[102]

Die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D lässt sich bestimmen, indem eine Konzentrationsreihe vermessen wird und die maximale RU-Antwort gegen die Konzentration aufgetragen wird. Durch Anpassung eines 1:1-Bindungsmodell (*One-Site-Binding*, Gleichung 1) an die experimentellen Datenpunkte kann die Dissoziationskonstante ermittelt werden.

$$RU = RU_{\max} \cdot \frac{c_B}{(K_D + c_B)}$$

Gleichung 1: *One-Site-Binding*-Modell. Wobei RU = *response unit*, c_B = Konzentration der gelösten Komponente und K_D = thermodynamische Dissoziationskonstante.

2.2 Durchflusszytometrie

Allgemein dient die Durchflusszytometrie als optisches Messverfahren der Charakterisierung von Einzelzellen, die mit Fluoreszenzmarkern gefärbt sein können.

Um die Analyse von einzelnen Zellen gewährleisten zu können, bedient sich dieses Verfahren der hydrodynamischen Fokussierung.[103-104] Dabei werden die fluoreszenzmarkierten Zellen mittels eines Hüllstroms in die Messkammer zum Analysepunkt transportiert, was dazu führt, dass die Zellen einzeln die Kammer durchlaufen. In der Kammer befindet sich ein Laser als optische Lichtquelle, der auf den Fluss der Zellsuspension gerichtet ist. Die eingesetzten Argon- oder Heliumneonlaser (z.B. FL1-FITC-A =488 nm, FL2-PE-A = 633 nm) werden durch Reflexionsspiegel verstärkt und die Wellenlänge mit Hilfe eines Prismas eingestellt. Die am Kreuzungspunkt von Lichtstrahl und markierter Zelle verursachten Fluoreszenzanregungen und Streulichteffekte werden detektiert. Die Lichtstreuung wird hierbei sowohl im Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) bei einem Winkel von 0 - 10° als auch im Seitwärtsstreulicht (*Sidewards Scatter*, SSC) bei 90° erfasst (Abbildung 10). Mit Hilfe des FSC lässt sich die Größe der Zellen bestimmen, der SSC ist ein Indikator der Granularität der Zelle.

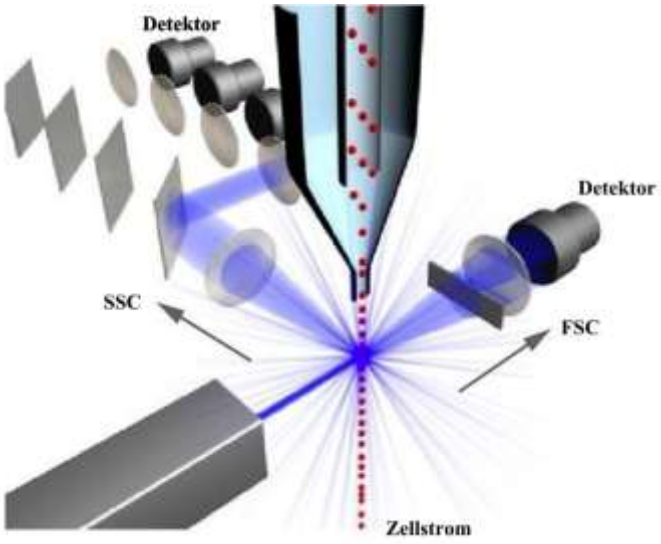


Abbildung 10: Aufbau einer durchflusszytometrischen Messkammer. Der auf die Zellprobe auftreffende Laserstrahl wird gestreut und im SSC und FSC detektiert.[105]

Die Zellen werden mit Antikörpern gegen ein auf den Zellen vorhandenes Antigen markiert. Diese Antikörper sind in der Regel mit Fluorochromen wie dem Phycoerythrin (PE) konjugiert, deren Fluoreszenz zur Detektion genutzt wird. Dabei muss das Absorptionsmaximum der Fluorochrome der Wellenlänge des verwendeten Lasers entsprechen.

Die Messwerte, die jeweils eine Zelle mit bestimmten Parametern repräsentieren, können einerseits in einer Häufigkeitsverteilung (Histogramm) als Einparameterdarstellung wiedergegeben werden. Andererseits bietet sich die Möglichkeit, die Daten in einem Punkthistogramm, dem sogenannten Dotplot (Zweiparameterdarstellung) darzustellen. Die Dotplots sind x,y-Diagramme, in denen jede gemessene Zelle als ein Punkt wiedergegeben ist und die resultierenden Punktwolken jeweils Zellen mit ähnlichen Eigenschaften repräsentieren. Es können verschiedene Parameter wie SSC, FSC oder die Kanäle der einzelnen Laser FL-1 und FL-2 gegeneinander aufgetragen werden. In den Diagrammen kann eine Eingrenzung (*gating*) vorgenommen werden, um nur solche Zellen zu analysieren, die bei der Auswertung von Interesse sind.

Um die erhaltenen Fluoreszenzdaten der Durchflusszytometrie zu quantifizieren, werden sogenannte *Beads* zur Hilfe gezogen.[106-107] Diese *Beads* sind kleine Kugeln unterschiedlicher Populationen, die mit vier definierten Anzahlen an Fluorochromen konjugiert sind. Werden die *Beads* vermessen, können die erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Populationen gegen die definierten Fluorochromanzahl aufgetragen werden und mittels einer linearen Regression und eine Kalibriergerade erstellt werden, die eine Quantifizierung der gebundenen Fluorophore über die gemessene Fluoreszenzintensität erlaubt.[108-110]

2.4 Sättigungstransfer-Differenz-STD-NMR-Spektroskopie

Die Sättigungstransfer-Transfer-STD-NMR-Spektroskopie ist eine Methode zur Detektion von Bindungsereignissen zwischen Proteinen und kleinen Liganden.[111-112] Diese Technik kann sowohl zum *screening* von Substanzbibliotheken eingesetzt werden als auch zur Identifikation von Bindungsepitopen und Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D.

Bei dieser NMR-Technik wird ausgenutzt, dass Proteine mit einer Masse größer als 10 kDa kleine T_2-Relaxationszeiten und daraus resultierend große Linienbreiten außerhalb des spektralen Bereichs kleiner Moleküle aufweisen. Wird eine selektive Pulskaskade im sogenannten *on-resonance*-Spektrum in diesem spektralen Bereich eingestrahlt, kommt es durch Spindiffusion zu einer selektiven Sättigung über das gesamte Protein. Ist in diesem Moment ein kleines Molekül an das Protein gebunden, wird die Sättigung vom Protein auf den Liganden übertragen, wobei die Intensität der Sättigung abhängig vom Abstand des Proteins und seinem Liganden ist.

Neben dem *on-resonance*-Spektrum wird ein *off-resonance*-Spektrum aufgenommen, bei dem ein Sättigungspuls außerhalb des spektralen Fensters bei 40 ppm eingestrahlt wird. Dieses Spektrum weist normale Signalintensitäten auf und dient als Referenz. Das Differenzspektrum des *off-resonance*- und *on-resonance*-Spektrums zeigt ausschließlich die Signale der Ligandprotonen, die an der Bindung zum Protein beteiligt sind (Abbildung 11).

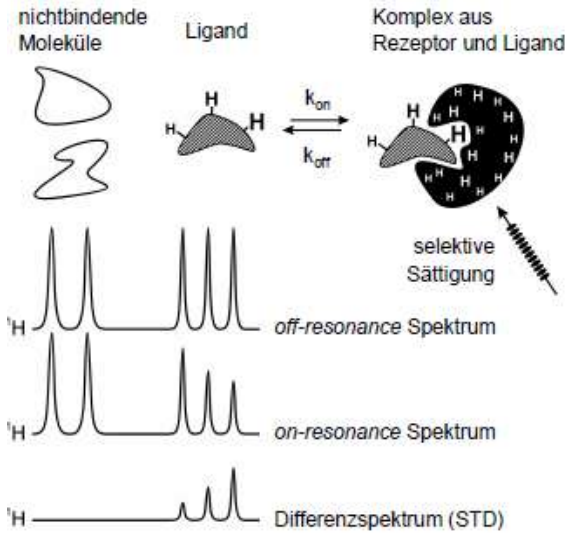


Abbildung 11: Prinzip der STD-NMR-Spektroskopie. Im *on-resonance*-Spektrum wird das Protein selektiv gesättigt. Die Sättigung wird auf gebundene Liganden übertragen, die in Lösung zu verminderten Ligandsignalen im Spektrum führen. Im *off-resonance*-Spektrum führt ein Sättigungspuls außerhalb des spektralen Fensters zu einem Spektrum mit normalen Signalintensitäten. Das Differenzspektrum zeigt die Ligandprotonen, die an der Bindung zum Protein beteiligt sind.

Die Intensitäten der Ligandsignale unterliegen der Abhängigkeit, dass die Kreuzrelaxationsrate der Protonen umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands des Proteins ist. Dies bedeutet, dass Protonen, die näher am Protein liegen, intensive Signale im STD-Spektrum bedingt durch eine höhere Sättigung ergeben. Durch diese Abstandsabhängigkeit ist es möglich, ein Bindungsepitop zu erstellen.

Die thermodynamische Dissoziationskonstante lässt sich bestimmen, indem eine Titrationsreihe mit verschiedenen Ligandkonzentrationen aufgenommen wird. Aus den STD-Effekten kann anschließend der STD-Amplifikationsfaktor bestimmt werden (Gleichung 2).

$$STD_{ampl} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \frac{[L]_0}{[P]_0}$$

Gleichung 2: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors STD_{ampl}. Mit I_0: Signalintensität im *off-resonance*-Spektrum, I_{sat}: Signalintenstiät im *on-resonance*-Spektrum, $[L]_0$: Gesamtligandkonzentration und $[P]_0$: Gesamtproteinkonzentration.

Durch Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors gegen die Ligandkonzentration $[L]_0$ und Anpassung des *One-Site-Binding*-Modells an die Datenpunkte wird die Dissoziationskonstante K_D ermittelt.

2.5 Sättigungstransfer-Doppeldifferenz-STDD-NMR-Spektroskopie

Durch diese Variante der STD-NMR-Spektroskopie ist es möglich, membranständige Proteine, als Liposomen oder an intakten Zellen vorliegend, zu vermessen.[113] Da die Komplexe aus Protein und Ligand in diesem Fall eine sehr hohe Masse und somit hohe Spindiffusion aufweisen, kann Sättigungstransfer auf weitere kleine Moleküle auftreten. Um diese unerwünschten Signale aus dem Spektrum zu eliminieren, wird das sogenannte Doppeldifferenzverfahren angewandt. Dazu wird ein STD-Spektrum aufgenommen, in dem sich einzig die Liposomen befinden. Ein weiteres STD-Spektrum mit Liposomen und Ligand wird erstellt, von dem das STD-Spektrum mit Liposomen subtrahiert wird. Das erhaltene STDD-Spektrum enthält nur die Ligandsignale, die an das membranständige Protein gebunden sind (Abbildung 12).

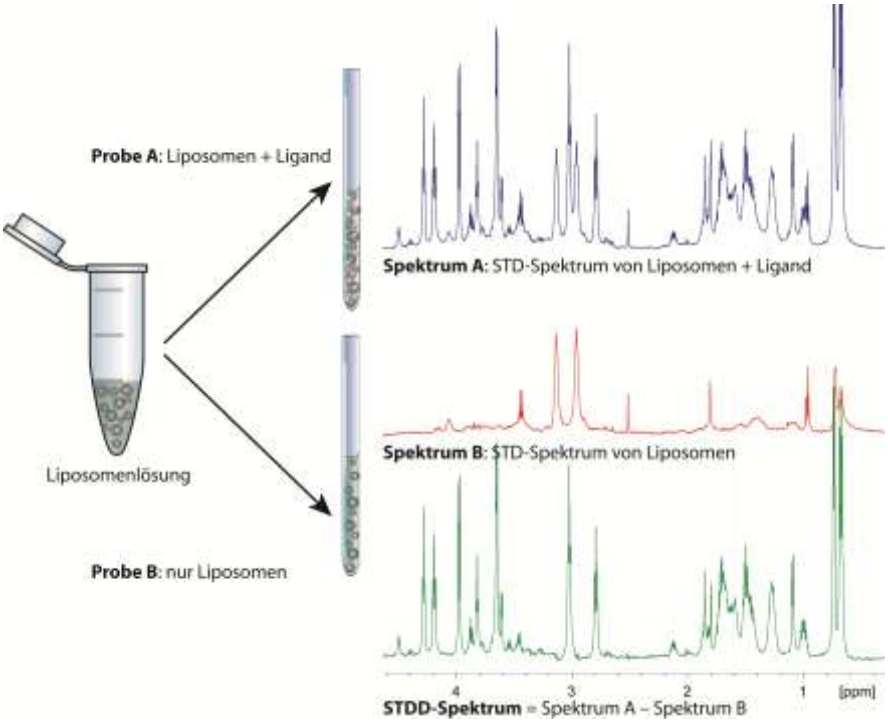


Abbildung 12: Prinzip der STDD-NMR-Spektroskopie.[114] Ein Spektrum, welches nur Signale von Liposomen enthält, wird vom STD-Spektrum von Liposomen und Ligand subtrahiert. Das erhaltene STDD-Spektrum zeigt die Signale der bindenden Ligandprotonen.[113]

2.6 Konformationsanalyse von Peptiden

Die Konformation von Peptiden in wässriger Lösung lässt sich mithilfe NMR-spektroskopischer Methoden analysieren.[115] Die Konformation des Peptidrückgrats lässt sich über die Torsionswinkel ϕ und ψ beschreiben (Abbildung 13).[116]

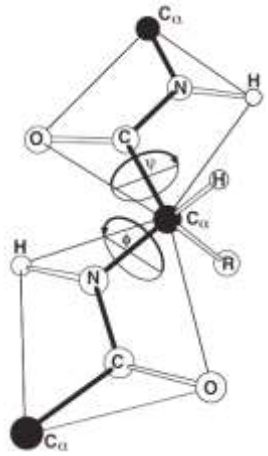


Abbildung 13: Torsionswinkel ϕ und ψ des peptidischen Rückgrats, die Auskunft über die Konformation von Peptiden geben.[117]

Da ^3J-Kopplungskonstanten abhängig vom Torsionswinkel sind, lassen sich die Torsionswinkel durch Ermittlung der Kopplungskonstanten aus NMR-Spektren bestimmen. Der Zusammenhang wird durch die Karplus-Beziehung[118] (Gleichung 3) beschrieben, wobei ϕ der Karpluswinkel ist und A, B und C empirische Karpluskoeffizienten darstellen:

$$^3J(\phi) = A\cos^2\phi + B\cos\phi + C$$

Gleichung 3: Karplus-Beziehung.

Durch Parametrisierungen und quantenmechanische Berechnungen lässt sich Gleichung 3 nach dem Torsionswinkel ϕ auflösen und ergibt mit den Karpluskoeffizienten für Peptide folgende Karplus-Gleichung:

$$\phi = 60° \pm ar\cos\left[\frac{1.3}{13.4} \pm \sqrt{\left(\frac{1.3}{13.4}\right)^2 - \left(\frac{1.5 - J}{6.7}\right)}\right]$$

Gleichung 4: Karplus-Gleichung.

Gleichung 4 ergibt maximal vier Lösungen für den Torsionswinkel. In Anbetracht des Ramachandran-Plots sind jedoch nicht alle Werte möglich, da nur gewisse Bereiche vollständig erlaubt sind oder im sogenannten *outer limit* liegen.[119]

Neben der Ermittlung von Torsionswinkeln aus skalaren Kopplungskonstanten, besteht die Möglichkeit aus dipolaren Relaxationen zweier Kerne interatomare Abstände zu ermitteln.[120-122] Mittels des Nuklearen Overhauser Effektes (NOE) aus NOESY-NMR-Experimenten können Abstände zweier Kerne S und I erfasst werden. Das NOESY-Experiment ist eine 2D-Korrelation über dipolare Kopplungen. Die darin observierten NOE-Effekte werden durch die Kreuzrelaxation vermittelt, die durch Null- und Zweiquantenübergänge entsteht. Die Solomon-Gleichung (Gleichung 5) beschreibt die Verstärkung der Intensität des NOE-Signals, die mit der Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} korreliert.[123]

$$f_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} \equiv \frac{\gamma_S}{\gamma_I}\left[\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^I + W_2}\right]$$

Gleichung 5: Solomon-Gleichung. Wobei f_I = Verstärkung der Intensität des NOE-Signals von Kern I, γ = gyromagnetisches Verhältnis des Kerns, σ_{IS} = Kreuzrelaxationsrate, ρ_{IS} = Eigenrelaxationsrate, W_0 = Nullquantenübergangswahrscheinlichkeit und W_2 = Zweiquantenübergangswahrscheinlichkeit.

Die Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} ist die Differenz der Zweiquantenübergangswahrscheinlichkeit W_2 und der Nullquantenübergangswahrscheinlichkeit W_0 und ist somit proportional zum Aufbau

des NOEs, während die Eigenrelaxationsrate ρ_{IS} den Abfall des der Signalintensitäten und damit auch der observierten NOEs darstellt. Aus Gleichung 6 geht hervor, dass eine direkte Korrelation zwischen Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} und dem Abstand r_{IS} zweier Kerne existiert.[124]

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0 \propto \gamma^4 \left\{ \frac{6}{1+4\omega_0^2\tau_c^2} - 1 \right\} \frac{\tau_c}{r_{IS}^6}$$

Gleichung 6: Berechnung der Kreuzrelaxationsrate eines NOEs. Wobei ω_0 = Lamorfrequenz, τ_c = Korrelationszeit und r_{IS} = Abstand zwischen den Kernen I und S.

Werden NOESY-NMR-Messungen durchgeführt, können Abstandsinformationen zweier Protonen erhalten werden. Während der Mischzeit baut sich der NOE zunächst auf, bis ein Maximum erreicht wird, bei dem Kreuzrelaxationsrate und Eigenrelaxationsrate gleich hoch sind (Gleichung 5). Anschließend dominiert die Eigenrelaxationsrate, so dass bei weiter steigender Mischzeit ein Abfall des NOEs detektiert wird. Das NOESY-Spektrum zeigt Kreuzsignale, deren Volumina $V_{crosspeak}$ proportional zum NOE sind. Werden die Peakvolumina der NOE-Kontakte gegen die Mischzeiten aufgetragen, entsteht eine Aufbaukurve.[125] Durch Anpassen einer doppelt exponentiellen Funktion (Gleichung 7) an die Aufbaukurve, kann aus der Steigung die Kreuzrelaxationsrate bestimmt werden. Das Produkt der Parameter P0 und P1 ergibt die Kreuzrelaxationsrate.

$$V_{crosspeak} = P0 \cdot e^{-P2 t_m} \cdot (1 - e^{-P1 t_m})$$

Gleichung 7: Doppelt exponentielle Funktion zur Anpassung der Aufbaukurve. Mit $V_{crosspeak}$ = Kreuzpeakvolumen und t_m = Mischzeit. P0, P1 und P2 sind dimensionslose Parameter.

Der Zusammenhang zwischen der Kreuzrelaxationsrate und dem Abstand zweier Protonen ist in Gleichung 6 wiedergegeben. Da die Korrelationszeit meist unbekannt ist, werden die Abstände mittels eines Referenzabstandes ermittelt (Gleichung 8).

$$r_{IS} = r_{ref} \left(\frac{\sigma_{ref}}{\sigma_{IS}} \right)^{-6}$$

Gleichung 8: Berechnung des Abstandes zweier Kerne. Mit r_{IS} = Abstand und σ_{IS} = Kreuzrelaxationsrate.

Als Referenzprotonenpaar bieten sich vicinale, aromatische Protonen an, da sie einen festen Abstand aufweisen. Der Referenzabstand wird aus einer Computersimulation ermittelt, um so anschließend die erwünschten Abstände errechnen zu können.

Aus der Gleichung 6 geht hervor, dass die Intensität des NOEs eine Funktion des Produktes von Lamorfrequenz und Korrelationszeit ist. So durchläuft die Kurve einen Nulldurchgang, wenn das Produkt ungefähr 1.12 beträgt (Abbildung 14) und sich die beiden Quantenübergangswahrscheinlichkeiten gegenseitig aufheben. Anschließend erfolgt eine negative Verstärkung der Intensitäten. Der Nulldurchgang ist näherungsweise abhängig von der Größe der Moleküle, wobei u.a. die Form des Moleküls und die Viskosität der Lösung eine Rolle spielen. Bei einer Spektrometer-Frequenz von 500 MHz liegt der Nulldurchgang bei 800-1400 g/mol.

Im Gegensatz zu den Intensitäten der NOEs steht der Verlauf der ROE-Intensitäten.[124] ROEs werden mittels eines ROESY-NMR-Experimentes erhalten, in dem anstelle der longitudinalen Relaxation die transversale Relaxation in Gegenwart eines Spinlockfeldes $T_{1\rho}$ eines Zweispinsystems erfasst wird. Da sich die Kreuzrelaxationsrate des ROEs anders als beim NOE verhält, verändert sich die Intensität der ROEs dahingehend, dass diese stets ein positives Vorzeichen tragen (Abbildung 14). Die Kreuzrelaxationsrate ist auch bei diesem Experiment proportional zu r_{IS}^{-6} (Gleichung 9).

$$\sigma_{IS} \propto \gamma^4 \left\{ \frac{3}{1+\omega_0^2\tau_c^2} + 2 \right\} \frac{\tau_c}{r_{IS}^6}$$

Gleichung 9: Kreuzrelaxationsrate eines ROEs. Wobei ω_0 = Lamorfrequenz, τ_c = Korrelationszeit und r_{IS} = Abstand zwischen den Kernen I und S.

Daher stellt das ROESY-NMR-Experiment eine gute Alternative bei Molekülen mit einer Masse um ~1000 g/mol zum NOESY-NMR-Experiment dar.

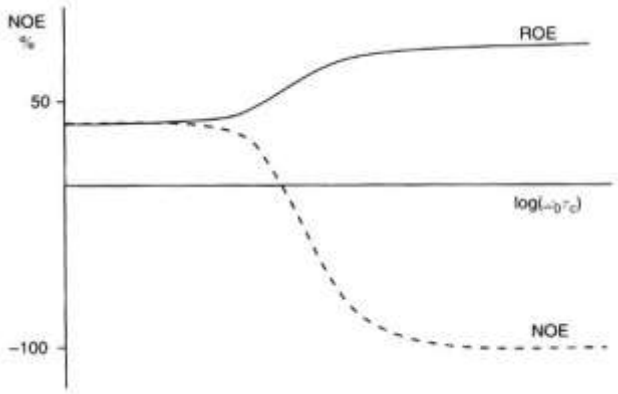


Abbildung 14: Abhängigkeit der Intensität des NOEs und ROEs von dem Produkt aus Lamorfrequenz ω_0 und Korrelationszeit τ_0. Im Gegensatz der NOE Intensitäten nehmen die Intensitäten der ROEs stets positive Werte an.[126]

Ein Problem der ROESY-NMR-Experimente stellt das Auftreten von TOCSY-Artefakten aufgrund des Spinlockfeldes während der ROESY-Sequenz dar. Weiterhin beeinflussen die *offset*-Effekte die Intensitäten der Kreuzsignale und lässt somit keine eindeutige Integration zu. Um diese Probleme zu umgehen, kann die Pulssequenz EASYROESY verwendet werden.[127] In dieser Pulssequenz werden durch Anlegen eines Hochfeld- und Tieffeld-Spinlocks die *offset*-Effekte verringert, so dass eine quantitative Integration ermöglicht wird und die TOCSY-Artefakte unterdrückt werden.

Die spektroskopisch erhaltenen Winkel und Abstände liefern jedoch nur eine Struktur, die der zeitlich gemittelten Konformation des Peptids entspricht. Um dieses Problem zu umgehen, werden *distance geometry* (DG)-Algorithmen verwendet, bei denen die NMR-Daten als Beschränkungen (*constraints*) zur Berechnung der Konformationen Verwendung finden. Das verwendete Programm CYANA (*combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications*) berechnet mit einem ECEPP-Kraftfeld[128] aus den Winkel- und Abstandsbeschränkungen als einzige Freiheitsgrade Konformationen unter Einhaltung realistischer Bindungslängen und –winkel.[129-133] Da die Rechnungen im Torsionswinkelraum stattfinden, werden Bindungslängen, Chiralitäten und Planaritäten auf dem Optimalwert festgehalten. Diese randomisierten Strukturen werden anschließend mit Hilfe des Programmzusatzes REDAC (*redundant dihedral angle constraints*) optimiert, indem durch Variationen der Torsionswinkel unter Vorlage der Abstände die Strukturen angepasst werden. Die erhaltenen Zielfunktionswerte sind ein Maß darüber, inwieweit die Beschränkungen erfüllt werden.

2.7 *Molecular Modeling*

Mit Hilfe des *Molecular Modeling* können dreidimensionale Molekülstrukturen durch computergestützte Techniken simuliert, dargestellt und analysiert werden. Weiterhin sind auch komplexe Systeme wie Protein-Protein-Wechselwirkungen oder dynamische Untersuchungen modellierbar.

Kristallographische Daten oder mittels Computer erstellte neue Strukturen werden mit Hilfe der auf einem Kraftfeld basierenden Moleküldynamik-Rechenverfahrens bezüglich ihrer Konformation und ihrem dynamischen Verhalten optimiert.[134] Dabei dienen Optimierungsalgorithmen der Findung von Konformationen minimaler potentieller Energie des Moleküls. Molekülgeometrien und –energien werden unter der Annahme, dass Bindungen und Bindungswinkel Standardwerte annehmen, berechnet.

Einen besonderen Aspekt stellen *Molecular Dynamics* (MD)-Simulationen biologischer Strukturen dar. Annahme hierfür ist, dass die Wechselwirkungen den Gesetzen der klassischen Physik unterliegen. Die Bewegungen der einzelnen Komponenten eines Systems werden numerisch schrittweise für alle Teilchen gleichzeitig erfasst.[117, 135]

Bei diesen Simulationen wird vorab ein Volumen, die *waterbox*, definiert, in dem der zu untersuchende Komplex in wässriger Lösung vorliegt. Weiterhin wird eine ausreichende Konzentration an Ionen hinzugefügt, um das System im neutralen Zustand vorliegen zu haben. Diese *waterbox* wird unter periodischen Randbedingungen als vierdimensionaler Torus aufgestellt, um Randeffekte an den Wänden der *waterbox* zu umgehen.[136] Basierend auf Grundlagen der statistischen Mechanik können verschiedene Ensembles erstellt werden, in denen physikalische Größen wie die Temperatur (T), das Volumen (V), die Energie (E) oder die Teilchenzahl (N) über den gesamten Zeitraum konstant gehalten werden. So stellt das kanonische Ensemble ein System dar, in dem während der Simulation die Teilchenzahl, das Volumen und die Temperatur unverändert bleiben (NVT-Ensemble) und einzig die Energie variabel bleibt.

Das Programm Desmond (Schrödinger, D.E. Shaw Research) integriert vor der eigentlichen Simulation optional eine Minimierung, wodurch das System in ein lokales Energieminimum geführt wird. Anschließend erfolgt die eigentliche Simulation, in der alle Atome des Systems nach einer berechneten Kraft, ausgeübt von den umgebenden Atomen, bewegt werden. Die Simulationszeit liegt dabei im Nanosekundenbereich und die Energie und Trajektorie des Systems wird in Abständen von Femtosekunden erfasst.

Nach Beendigung der Simulation ermöglicht das *Simulation Quality Analysis Panel* einen Überblick der totalen und potentiellen Energie, der Temperatur, des Drucks und des Volumens während der Simulationszeit. Außerdem bietet *Simulation Event Analysis* die Möglichkeit, die Entfernung von Schweratomen über die gesamte Simulation zu berechnen und somit mögliche Interaktionen zu interpretieren.[137]

3. Aufgabenstellung

Der CCR5-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus. Nach dem ersten Kontakt zum humanen CD4-Rezeptor dient CCR5 als Corezeptor des viralen Proteins gp120. Da Menschen mit einem oder zwei CCR5Δ32 Allelen keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch HIV-Kontakt aufweisen, bietet sich der Ansatz, diesen Corezeptor zu inhibieren, um eine virale Infektion zu unterbinden.[53, 74-75]

Im Rahmen dieser Dissertation sollten *in-silico*-Sequenzen des viralen Oberflächenproteins gp120 identifiziert werden, die mögliche inhibitorische Fähigkeiten zum CCR5-Rezeptor aufweisen. Diese Sequenzen sollten als Peptidbibliothek synthetisiert werden. Anschließend sollte mittels Oberflächenplasmonenresonanz eine qualitative Aussage über die möglichen Interaktionen dieser Peptide zum CCR5-Rezeptor getroffen werden und eine Leitstruktur gefunden werden, die das größte inhibitorische Potential aufweist. Da es sich bei dem Rezeptor um einen Siebentransmembranrezeptor handelt, werden sämtliche Bindungsstudien mit Zellen durchgeführt, die CCR5 überexprimieren. Um eine quantitative Aussage der Bindungsstudien fällen zu können, sollten die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Anzahl an CCR5-Rezeptoren untersucht werden. Anschließend sollte diese optische Methode genutzt werden, um Bindungsstudien durchzuführen und die thermodynamische Dissoziationskonstante der Leitstruktur zu ermitteln.

Die Dissoziationskonstante, die durchflusszytometrisch bestimmt wurde, sollte mit einer weiteren Methode, der STDD-NMR-Spektroskopie, verifiziert werden.

Ein wichtiger Anhaltspunkt zur Findung eines *entry*-Inhibitors ist die Verbesserung der Dissoziationskonstanten durch Mimikrieren der Leitstruktur. Aus diesem Grund sollte die Struktur des Leitpeptids mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Dazu sollten Abstände und Winkel innerhalb des Peptids ermittelt werden und *in-silico* die Konformation berechnet werden. Einen Vergleich sollte eine *Molecular Dynamics*-Simulation geben, in der sich die Leitstruktur im interagierenden Zustand am CCR5-Rezeptor befindet. Da es sich bei dem viralen gp120 um ein Protein mit teilweise variabler Sequenz handelt, sollte eine Homologie der betreffenden Sequenz aufgestellt werden. Insofern in der Leitstruktur variable Aminosäuren auftreten, sollten die Homologen ebenfalls mittels einer *Molecular Dynamics*-Simulation untersucht werden, um festzustellen, welchen Einfluss die mögliche Varianz der Sequenz auf die Wechselwirkung zum CCR5-Rezeptor ausübt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von einer *in-silico* Analyse des Komplexes aus gp120 mit dem Corezeptor CCR5[58] sollte untersucht werden, welche Bereiche des viralen Proteins neben der literaturbekannten V3-*loop* eine Wechselwirkung mit dem humanen Rezeptor eingehen. In Abbildung 15 sind der CCR5-Corezeptor (*colored by atomtype*) und das gp120 (rot koloriert) abgebildet. Rechts im Bild ist die V3-*loop* zu erkennen, die eine starke Interaktion zum humanen Corezeptor eingeht. Die Aminosäuren des gp120 außerhalb der V3-*loop* wurden dahingehend analysiert, ob eine Entfernung unter 3 Å zum CCR5 vorliegt, da unterhalb dieser Entfernung davon auszugehen ist, dass Wechselwirkungen wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen. Um die Aminosäuren des gp120 hervorzuheben, die eine Wechselwirkung zum CCR5 in Bezug auf ihre Entfernung eingehen können und nicht der V3-*loop* angehören, wurden diese in blau koloriert.

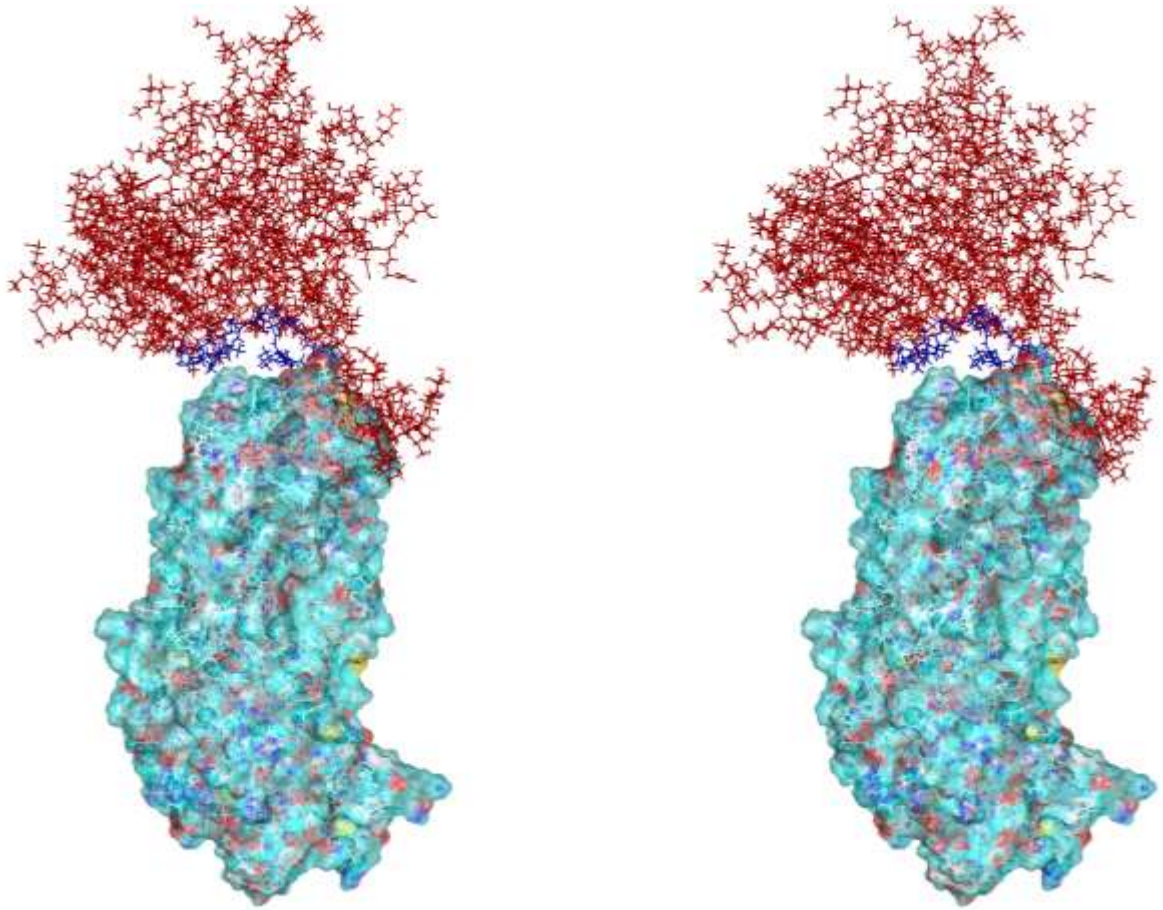


Abbildung 15: *Crossed-eye*-Darstellung des Komplexes des Corezeptors CCR5 (*colored by atomtype*) und gp120 (rot koloriert). Die Aminosäuren des gp120, die näher als 3 Å zum humanen Corezeptor sind und nicht der V3-*loop* angehören, sind in blau koloriert.

Bei näherer Betrachtung dieser Region (Abbildung 16) stellte sich heraus, dass es sich bei diesen Aminosäuren um zwei verschiedene Sequenzen des gp120 handelt. Zum einen zeigt die Sequenz ^{204}ACPKVS^{209} der C1-Region (Peptid **1**) eine wechselwirkende Nähe zum CCR5, zum anderen weist die Sequenz ^{436}APPIEGQI^{443} der C4-Region (Peptid **2**) eine Nähe zum Corezeptor auf, die eine Interaktion der beiden Proteine zulässt. Aus diesem Grund sollten die Peptid **1**, Peptid **2** und Analoga in dieser Arbeit synthetisiert und anschließend bezüglich ihrer Affinitäten zum Corezeptor CCR5 untersucht werden.

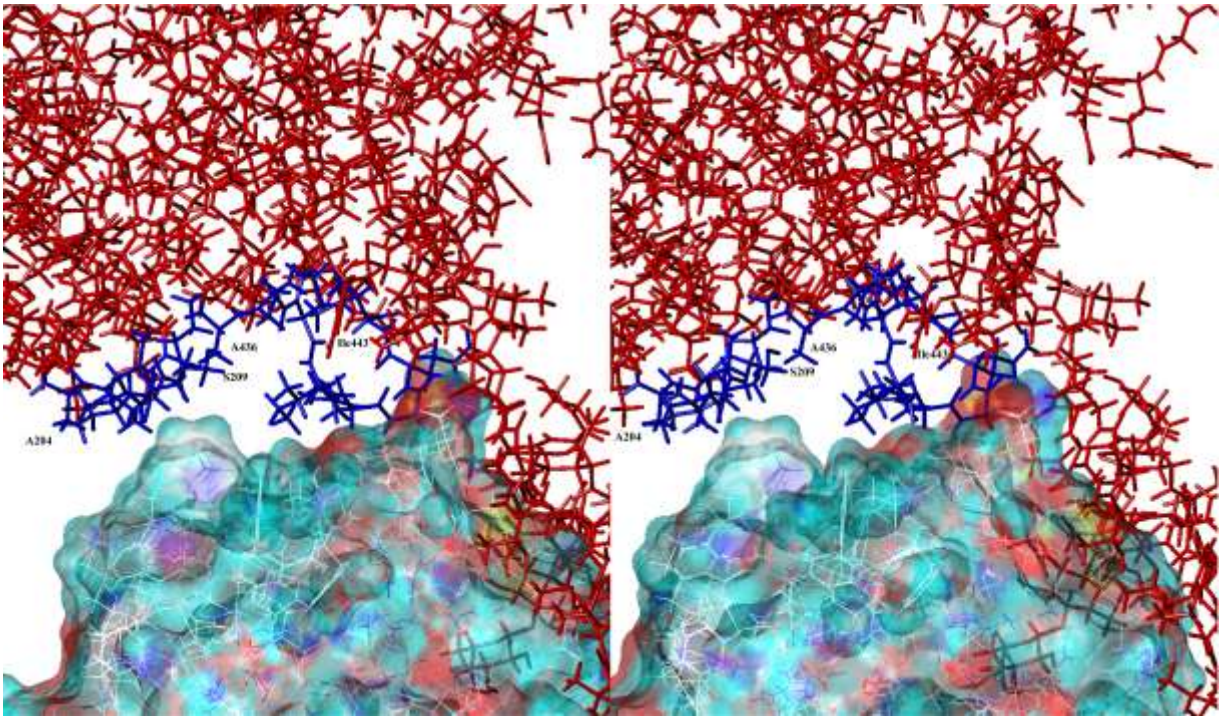


Abbildung 16: *Crossed-eye*-Darstellung des Komplexes bestehend aus CCR5 (*colored by atomtype*) mit gp120 (rot). Die Aminosäuren des gp120, die eine Entfernung zum Corezeptor unter 3 Å aufweisen, sind in blau koloriert. Es handelt sich hierbei um die Sequenzen ^{204}ACPKVS^{209} und ^{436}APPIEGQI^{443} des gp120.

4.1 Synthese und Analyse der Peptiden

Die Peptide wurden mit Hilfe automatisierter Festphasenpeptidsynthese (7.2.1, AAV 1 und AAV 2) unter Verwendung von Rink-Amid-AM-Polystyrolharz als feste Phase hergestellt, wobei einige der Synthesen mikrowellenunterstützt abliefen. Das durch die Sequenz bedingte C205 wurde mit einem Serin aus Gründen der Handhabbarkeit substituiert (S). Als Aktivator diente TBTU und als Aktivatorbase wurde DIPEA, beides gelöst in DMF, verwendet. Ein zusätzlicher *capping*-Schritt mit Essigsäureanhydrid in DMF diente zur Acetylierung nicht umgesetzter Aminosäuren nach dem Kupplungsschritt. Die Peptide wurden anschließend mit einer Lösung aus TFA, TIPS und Wasser vom Harz abgespalten (7.2.1, AAV 4) und mit einem

ungeschützten N-Terminus und einem Carbonsäureamid am C-Terminus erhalten. Die Reinigung erfolgte zunächst mittels einer Etherextraktion nach 7.2.1, AAV 5, wobei unpolare Nebenprodukte abgetrennt wurden. Abschließend wurden die Peptide mit Hilfe RP-HPLC gereinigt, bis diese eine Reinheit von mindestens 95% aufwiesen (7.2.1, AAV 6).
Die Peptide sind in Tabelle 1 tabellarisch zusammengefasst. Es sind sowohl ihre Lage der gp120 Sequenz als auch die erhaltenen Ausbeuten nach der Reinigung angeführt.

Tabelle 1: Übersicht der synthetisierten Peptide, der jeweiligen Region im gp120, der Sequenzen und Ausbeuten nach der Reinigung.

Peptid	Region gp120	Sequenz	Ausbeute [%]
1	C1	ACPKVS	34
2	C4	APPIEGQI	22
3	C1	A<u>S</u>PKVS	54
4	C4	GSGSAPPI	6
5	C4	GSGSEGQI	7
6	C4	MYAPPIEGQIEG	4
7	C4	GSGSPIEGQI	2

Die Peptide **1**-**3** konnten in hohen Ausbeuten hergestellt werden, wohingegen die Ausbeuten der Peptide **4**-**7** gering ausfielen. Grund hierfür könnte sein, dass die Peptide **4**-**7** mit Hilfe eines anderen Syntheserobotors hergestellt wurden.

4.2 SPR-Messungen der Peptidbibliothek mit GHOST(3)-Zellen

Mit Hilfe der SPR-Messungen wurde die synthetisierte Peptidbibliothek in Hinblick auf die Bindungsaffinitäten zum CCR5-Rezeptor qualitativ untersucht (Tabelle 2). Bei Peptiden, bei denen eine Bindung detektiert wurde, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Für die Peptide **3** und **4** konnte keine Affinität zum CCR5 detektiert werden. Die anderen Peptide zeigten Wechselwirkungen zum Rezeptor. Die Interaktionen wurden jedoch bei dieser Bindungsstudie nicht quantifiziert.

Tabelle 2: Übersicht der SPR-Ergebnisse der untersuchten Peptide 2-7.

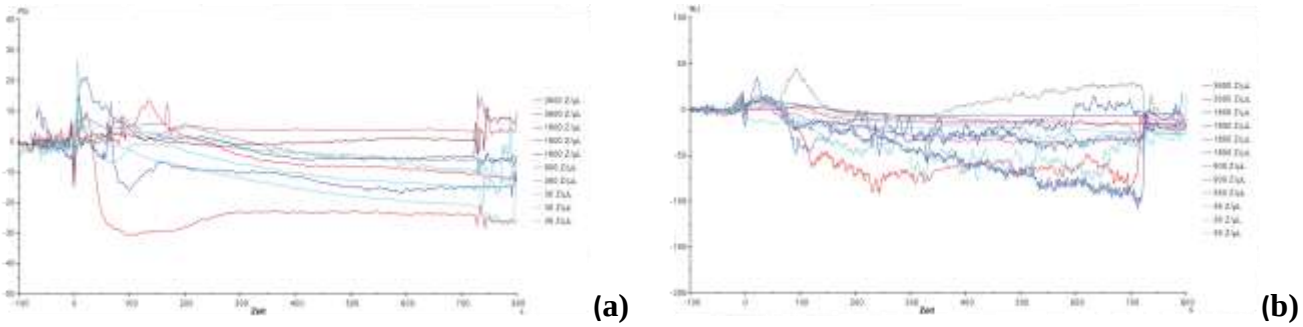
Peptid	Sequenz	Bindungsaffinität zum CCR5	Negativkontrolle
2	APPIEGQI	starke Bindung	keine Bindung
3	ASPKVS	keine Bindung	/
4	GSGSAPPI	keine Bindung	/
5	GSGSEGQI	Bindung	unspezifische Interaktion
6	MYAPPIEGQIEG	starke Bindung	keine Bindung
7	GSGSPIEGQI	starke Bindung	keine Bindung

Die Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz wurden an einem Biacore *J* (GE Healthcare) durchgeführt. Es wurde jeweils das Peptid auf einen SPR-Chip immobilisiert (7.6.1) und anschließend die Affinität von Zellen in Lösung analysiert (7.6.2). Bei allen Messungen wurden Doppelt- bis Mehrfachbestimmungen mit Zellkonzentrationen von 3600, 1800, 900, 360 und 36 Z/µL durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten GHOST(3)-Hi5-Zellen und deren Parentalzellen des *NIH AIDS Research & Reference Reagent Program* leiten sich von humanen Osteosarkomzellen ab. GHOST(3) steht für *green fluorescent osteosarcoma cell*, diese Zellen beinhalten ein GHOST(3)-Indikatorpanel mit einem Promotor, der bei einer HIV-Infektion aktiviert wird. Neben einer Expression des CD4-Rezeptors bei beiden Zellarten liegt bei den GHOST(3)-Hi5-Zellen weiterhin eine Expression des CCR5-Corezeptors vor.[138] Außerdem verfügen die GHOST(3)-Hi5-Zellen über Resistenzgene gegen Zytostatika.
Die GHOST(3)-Hi5-Zellen dienten zur Messung von Interaktionen der Peptide und dem CCR5-Rezeptor, während die Parentalzellen zur Negativkontrolle Verwendung fanden.

4.3.1 SPR-Messungen der C1-Region des gp120

Da die Region ^{204}ACPKVS^{209} entsprechend des Peptids **1**, die *in-silico* eine Bindung zum CCR5-Rezeptor eingeht, ein Cystein beinhaltet, wurde die Aminosäure C205 zur besseren Handhabung gegen ein Serin getauscht. Mit dem Peptid **3**, das der Sequenz ^{204}A<u>S</u>PKVS^{209} der C1-Region des gp120 entspricht, wurden SPR-Bindungsstudien mit GHOST(3)-Hi5-Zellen durchgeführt. Es konnten 53.2 fmol des Peptids durch Amidkupplung des N-Terminus auf einen SPR-Chip immobilisiert werden. Aus den Sensorgrammen der Abbildung 17a, b wird ersichtlich, dass dieser Teil des Proteins keine Wechselwirkung mit dem CCR5-Rezeptor eingeht. Die erhaltenen Sensorgramme weisen weder positive RU-Antworten auf, noch sind diese konzentrationsabhängig. Aus diesem Grund wurde die Sequenz der C1-Region für weitere Untersuchungen verworfen.



(a) **(b)**

Abbildung 17: SPR-Bindungskurven von Peptid 3 (A<u>S</u>PKVS) mit CCR5 exprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen. Es wurden zwei Durchführungen der Messung durchgeführt (a, b). Aus den Sensorgrammen geht hervor, dass keine spezifische Bindung stattfand. Es wurden Zellkonzentrationen von 3600 Z/µL (rot), 1800 Z/µL (blau), 900 Z/µL (mangenta), 360 Z/µL (grau) und 36 Z/µL (cyan) vermessen.

4.3.2 SPR-Messungen der C4-Region des gp120

Zunächst wurde Peptid **2** der Sequenz ^{436}APPIEGQI^{443} der C4-Region des gp120 mittels SPR mit GHOST(3)-Hi5-Zellen vermessen, wobei vorab 81.1 fmol des Octapeptids immobilisiert werden konnten. Die Sensorgramme sind in Abbildung 18a, b dargestellt. Bei der niedrigsten Zellkonzentration (36 Z/µL, cyan) konnten RU-Antworten von ungefähr 5 RU erhalten werden, gefolgt von der Konzentration von 360 Z/µL (grau) mit 10 RU. Bei der Konzentration von 900 Z/µL (mangenta) konnten RU-Antworten um 15 RU detektiert werden, die RU-Antworten der zweithöchsten Konzentration (1800 Z/µL, blau) lagen bei etwa 30 RU. Die RU-Antworten der höchsten Zellkonzentration (3600 Z/µL, rot) lagen im Bereich von 40 RU. Somit sind die RU-Antworten der Zellen in beiden Sensorgrammen stark

konzentrationsabhängig, was einer spezifischen Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand entspricht.

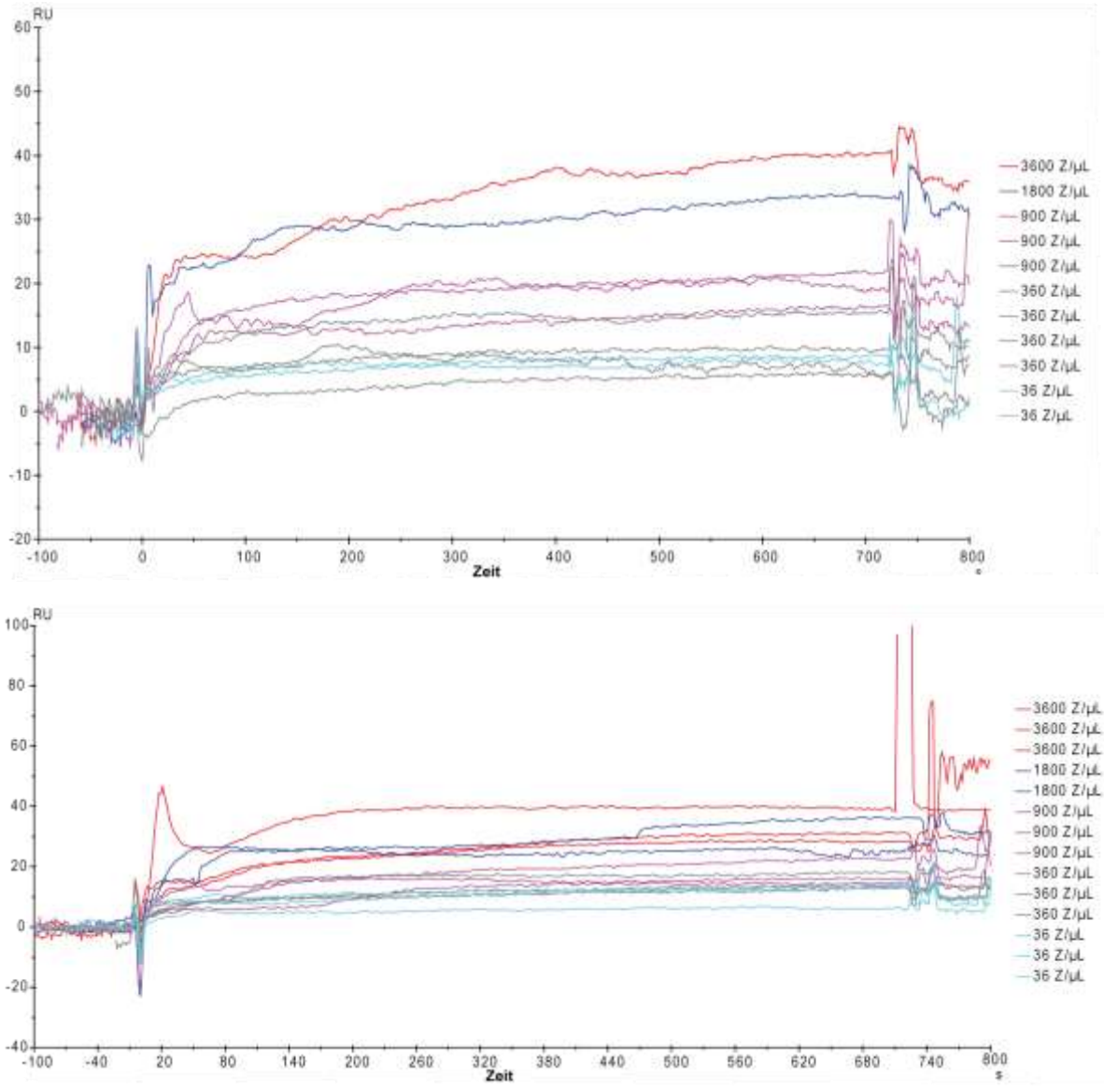


Abbildung 18: SPR-Sensorgramme des Peptids 2 (APPIEGQI). Die Messung wurde zweimal durchgeführt (a, b). Es wurden Konzentrationen von 3600 (rot), 1800 (blau), 900 (mangenta), 360 (grau) und 36 (cyan) Zellen/µL vermessen.

Neben den GHOST(3)-Hi5-Zellen wurden ebenfalls Parentalzellen mit gleichen Zellkonzentrationen vermessen. Diese Zellen exprimieren den CCR5-Rezeptor nicht und dienen somit einer Negativkontrolle.

Die Sensorgramme (Abbildung 19) des Peptids **2** mit den Parentalzellen weisen keine spezifische Bindung auf. Die Kurven unterliegen keiner Konzentrationsabhängigkeit und haben nicht den typischen Verlauf einer Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand, der durch

eine Anfangssteigung und einem Sättigungsplateau charakterisiert ist. Daraus geht hervor, dass die Wechselwirkung zwischen GHOST(3)-Hi5-Zellen und **2** spezifischer Natur ist.

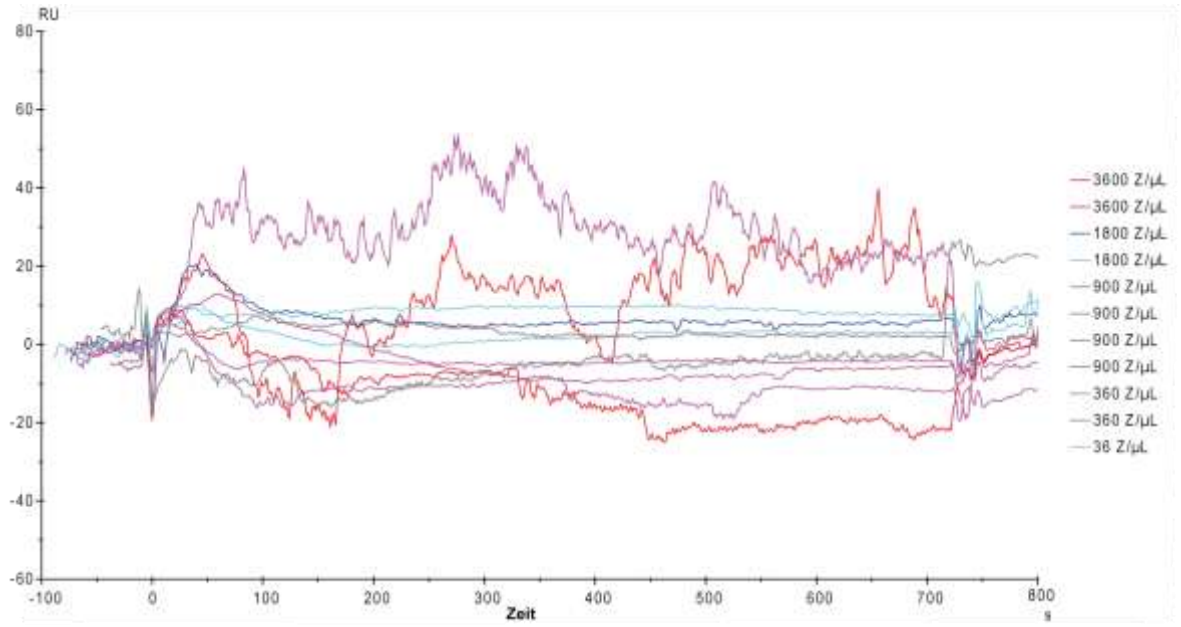
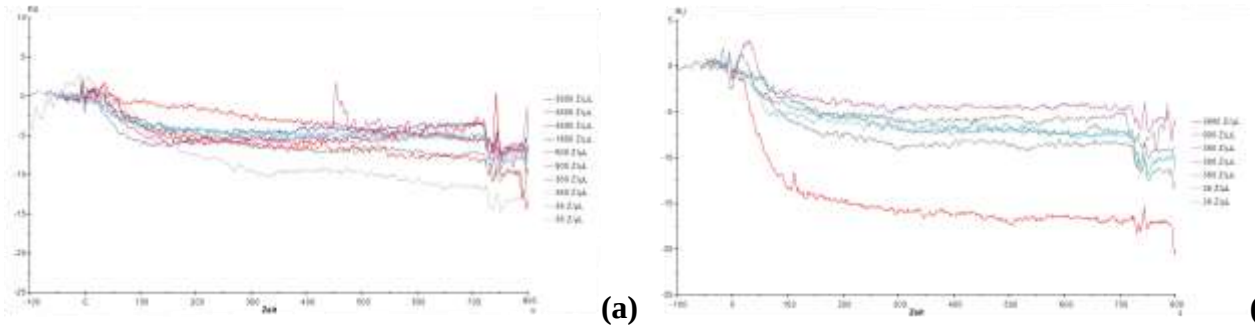


Abbildung 19: Negativkontrollsensorgramme des Peptids 2. Mit rot: 3600 Z/µL. blau: 1800 Z/µL, mangenta: 900 Z/µL, grau: 360 Z/µL und cyan: 36 Z/µL.

Um das Bindungsmotiv des Peptids **2** näher zu untersuchen, wurde die Sequenz in zwei Peptide unterteilt. Da sequenzbedingt die Peptide lediglich am N-Terminus an den Chip mittels Amidkupplung immobilisiert werden können, wurde N-terminal ein GSGS-Motiv eingeführt, damit die Peptide für die Zellen leichter zugänglich sind.

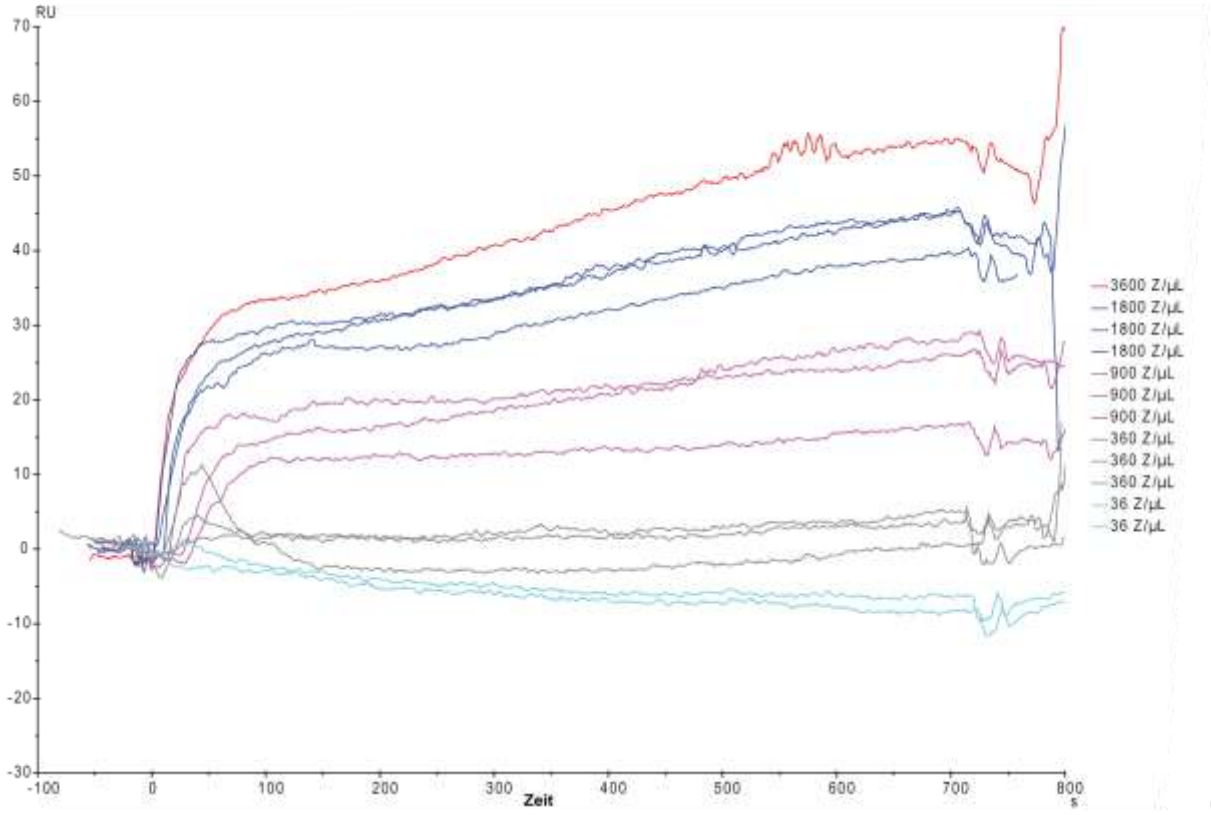
Die erste Hälfte der Sequenz von Peptid **2** findet sich in dem Octapeptid **4** ($GSGS^{436}APPI^{439}$) wieder. Von diesem Octapeptid konnten 144.6 fmol auf einen SPR-Chip immobilisiert werden. Die anschließenden SPR-Messungen mit GHOST(3)-Hi5-Zellen zeigten, dass dieser Teil des Leitmotivs keine Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor eingeht (Abbildung 20a, b). Begründen lässt sich dies durch die nicht konzentrationsabhängigen RU-Antworten, die im niedrigen negativen Bereich lagen und somit keine spezifische Wechselwirkung repräsentieren.



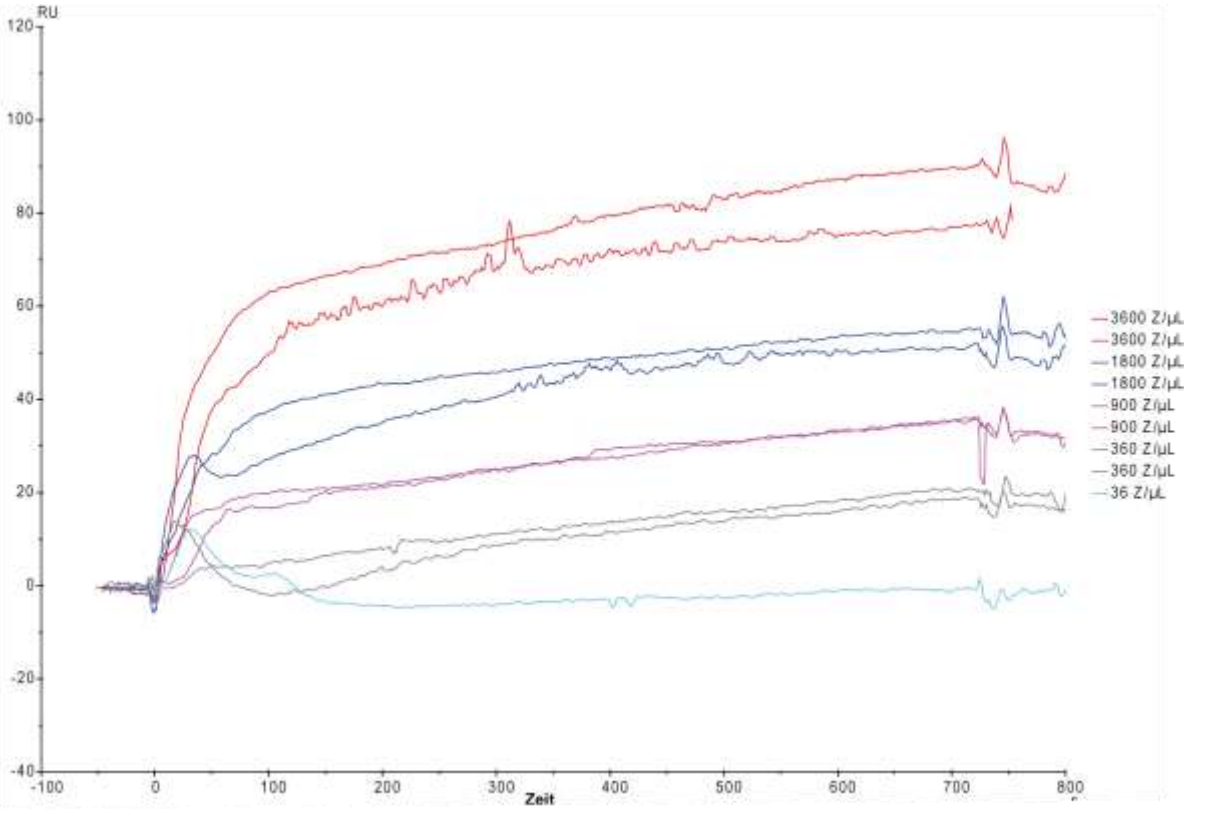
(a) **(b)**

Abbildung 20: SPR-Sensorgramme des Peptids 4. Es wurde eine Doppelbestimmung (a, b) der Messung durchgeführt. Die Zellkonzentrationen betrugen 3600 (rot), 1800 (blau), 900 (mangenta), 360 (grau) und 36 (cyan) Zellen/µL.

Das Peptid **5** (GSGS^{440}EGQI^{443}) spiegelt die zweite Hälfte des Motivs des Peptids **2** wieder. Auch in dieser Sequenz wurde N-terminal das GSGS-Motiv angefügt. Es konnten 162.7 fmol des Peptids auf einen SPR-Chip immobilisiert werden. Die mit GHOST(3)-Hi5-Zellen vermessenen Sensorgramme sind in Abbildung 21a, b dargestellt. In dem ersten Sensorgramm konnte eine maximale RU-Antwort von 55 RU detektiert werden, wobei die Ausschläge der RU-Antworten bei der Konzentration 3600 Z/µL von Zellaggregaten herrühren. Die einzelnen Konzentrationen sind, mit kleinen Abweichungen, bezüglich ihrer RU-Antworten reproduzierbar. Die starke Konzentrationsabhängigkeit der RU-Antworten zeigt, dass die Wechselwirkung von Peptid **5** und CCR5-Rezeptor spezifischer Natur ist. Im zweiten Sensorgramm liegt die maximale RU-Antwort bei deutlich höheren Werten. Grund hierfür ist eine unspezifische Interaktion der Zellen mit dem Immobilisat, was bei sehr hohen Zellkonzentrationen auftreten kann. Ab der Konzentration von 1800 Z/µL sind die RU-Antworten bereits identisch zu denen des ersten Sensorgramms und unterliegen auch dort einer reproduzierbaren Konzentrationsabhängigkeit.



(a)



(b)

Abbildung 21: SPR-Sensorgramme des Peptids 5. Die Messung wurde zweimal durchgeführt (a, b). Die Konzentrationen der vermessenen GHOST(3)-Hi5-Zellen lagen bei 3600 (rot), 1800 (blau), 900 (mangenta), 360 (grau) und 36 (cyan) Zellen/µL.

Um die Bindungskurven der GHOST(3)-Hi5-Zellen mit dem Peptid näher analysieren zu können, wurden mit **5** ebenfalls Negativkontrollen mit Parentalzellen durchgeführt. Die Sensorgramme sind in Abbildung 22 zu sehen. Die Kurven mit einer Konzentration von 3600 Z/µL weisen sehr hohe RU-Antworten auf, was für eine unspezifische Wechselwirkung sprechen könnte. Alle anderen Konzentrationen, bis auf die niedrigste mit 36 Z/µL, liegen mit ihren RU-Antworten in einem ähnlichen Bereich wie die Messungen mit GHOST(3)-Hi5-Zellen. Die Verläufe der Sensorgramme weichen jedoch von den SPR-Messungen mit GHOST(3)-Hi5-Zellen ab, da die anfänglichen Steigungen der Assoziation anders verlaufen und die Kurven kein Sättigungsplateau erreichen, sondern linear ansteigen. Diese Merkmale sind ein Indiz einer unspezifischen Wechselwirkung mit der Zelloberfläche. Es ist daher davon auszugehen, dass das Peptid **5** sowohl unspezifische als auch spezifische Interaktionen mit den Zellen aufweist.

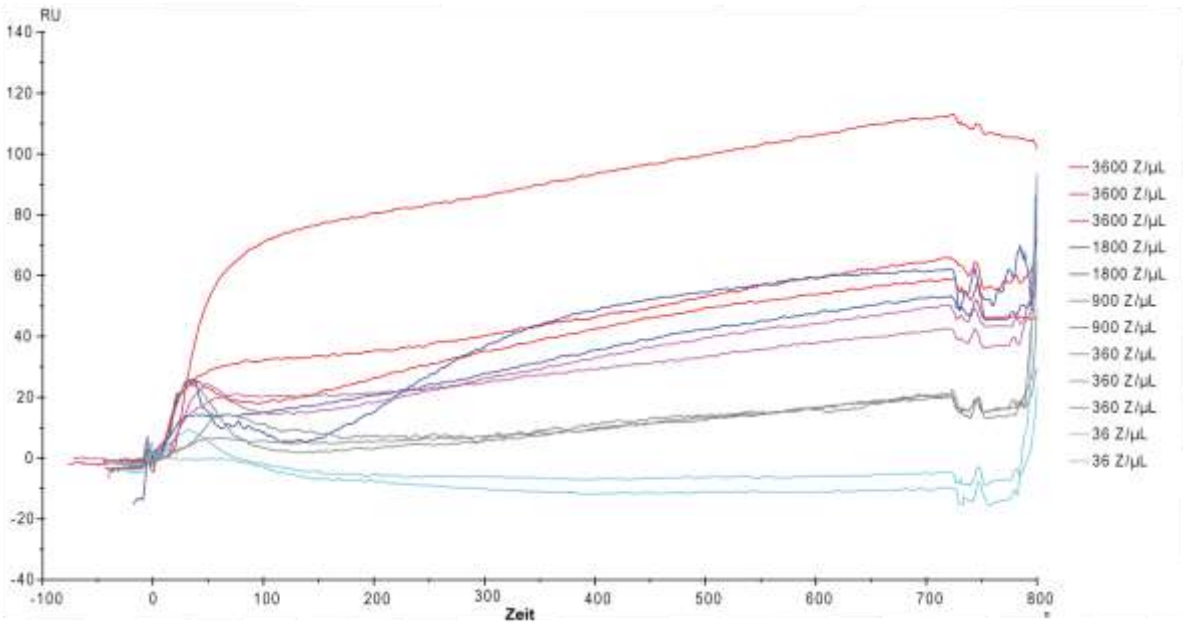
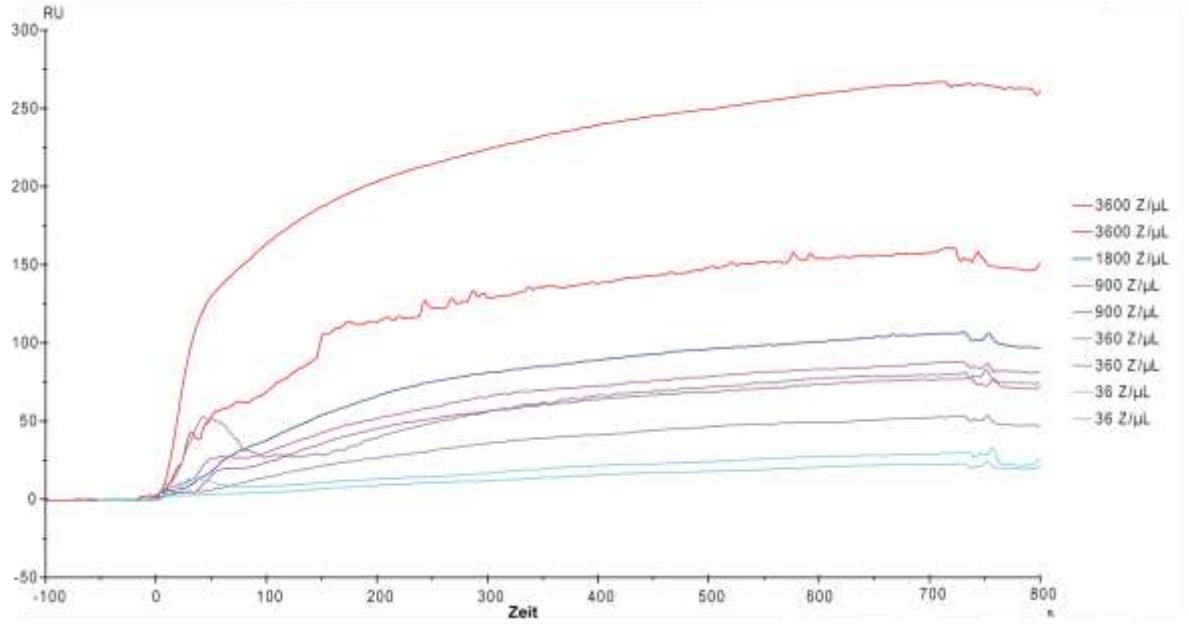


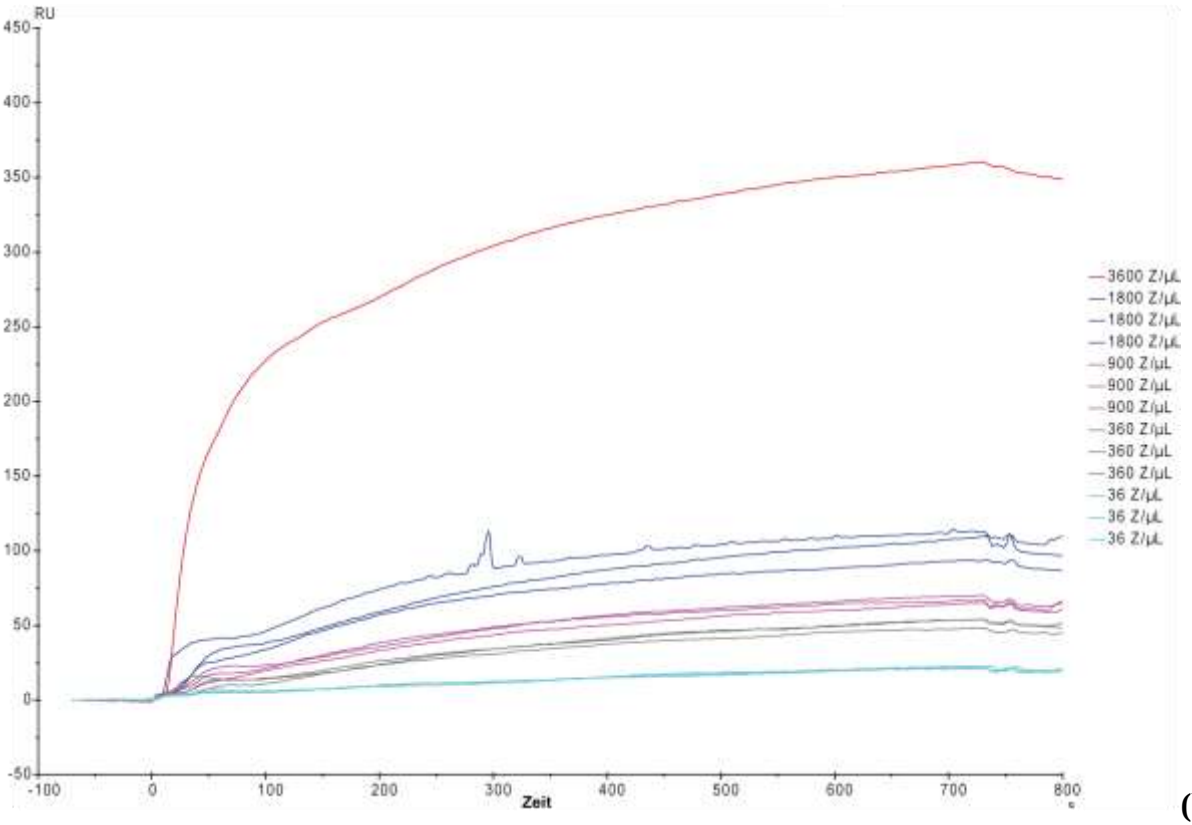
Abbildung 22: SPR-Negativkontrolle des Peptids 5. Mit rot: 3600 Z/µL. blau: 1800 Z/µL, mangenta: 900 Z/µL, grau: 360 Z/µL und cyan: 36 Z/µL.

Die Leitstruktur **2** wurde weiterhin am C- und N-Terminus um jeweils zwei Aminosäuren verlängert, woraus das Dodecapeptid **6** (^{434}MYAPPIEGQIEG^{445}) resultierte. Auch dieses Peptid wurde mittels SPR mit GHOST(3)-Hi5-Zellen vermessen, nachdem 138.5 fmol auf einen SPR-Chip immobilisiert werden konnten. In den Sensorgrammen (Abbildung 23a, b) treten durch eine zu hohe Zellkonzentration, wie bereits erwähnt, unspezifische Interaktionen bei der Konzentration von 3600 Z/µL auf. Die RU-Antworten sinken darauffolgend bei der Zellkonzentration von 1800 Z/µL auf Werte von 100 RU und folgen mit abnehmender

Konzentration einer Konzentrationsabhängigkeit, die durch mehrfache Durchläufe der gleichen Konzentration reproduziert werden konnten.



(a)



(b)

Abbildung 23:SPR-Sensorgramme des Peptids 6. Es wurden Zellkonzentrationen von 3600 Z/µL (rot), 1800 Z/µL (blau), 900 Z/µL (mangenta), 360 Z/µL (grau) und 36 Z/µL (cyan) in einer Doppelbestimmung (a, b) analysiert.

Das Sensorgramm der Negativkontrolle mit Parentalzellen (Abbildung 24) zeigt, dass die Wechselwirkung von **6** mit diesen Zellen unspezifisch ist. Es findet zwar ein Bindungsereignis mit RU-Antworten bis Werten von 30 RU statt, jedoch unterliegen die Sensorgramme keiner Konzentrationsabhängigkeit. So liegt der RU-Wert der Konzentration von 1800 Z/µL beispielsweise in der gleichen Größenordnung wie der der Kurven mit einer Konzentration von 36 Z/µL. Daher ist davon auszugehen, dass die Interaktion von **6** mit GHOST(3)-Hi5-Zellen, im Gegensatz zu der Negativmessung, eine spezifische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ist.

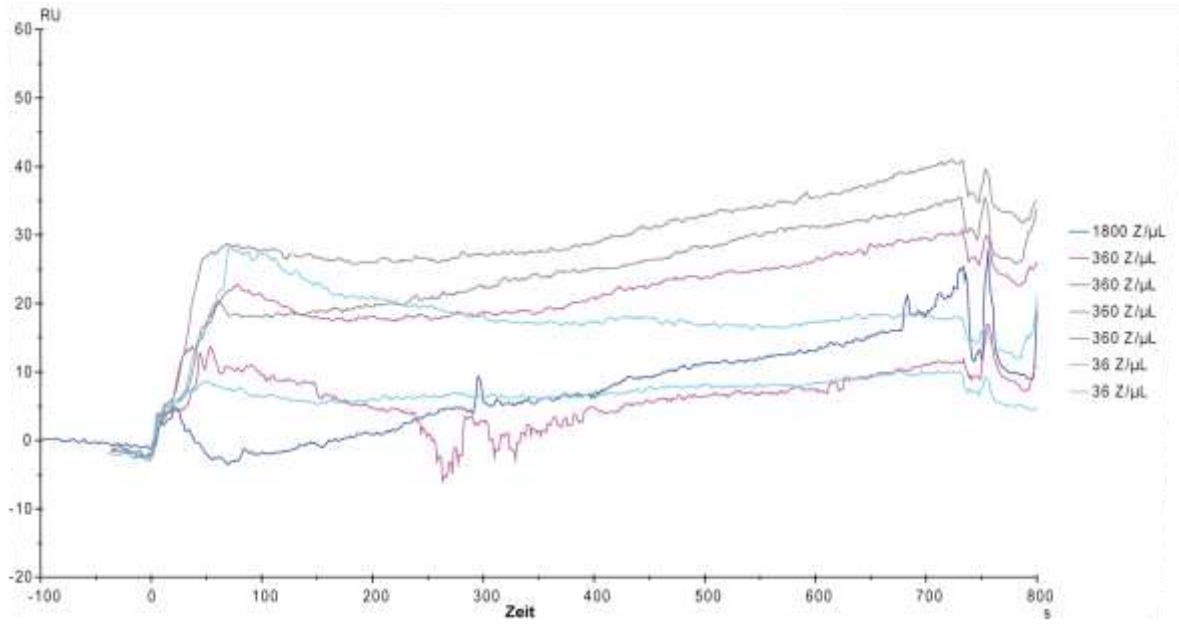


Abbildung 24: SPR-Negativkontrolle des Peptids 6. Mit blau: 1800 Z/µL, mangenta: 900 Z/µL, grau: 360 Z/µL und cyan: 36 Z/µL.

Abschließend wurde die Leitstruktur **2** dahingehend modifiziert, dass das Motiv des Peptids **5** um die zwei direkten, zum N-Terminus benachbarten, Aminosäuren und einem GSGS-Motiv verlängert wurde. Dieses resultierende Decapeptid **7** ($GSGS^{438}PIEGQI^{443}$) wurde auf einen SPR-Chip immobilisiert (153.3 fmol) und dann mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz mit GHOST(3)-Hi5-Zellen vermessen (Abbildung 25). Der hohe anfängliche Ausschlag der RU-Antwort bei der Konzentration von 3600 Z/µL (rot) wurde vermutlich durch Zellaggregate verursacht. Auch in diesem Sensorgramm folgen die RU-Antworten einer Konzentrationsabhängigkeit, wobei bei den hohen Konzentrationen von 3600 und 1800 Z/µL die RU-Antworten den gleichen Sättigungsbereich erreichen.

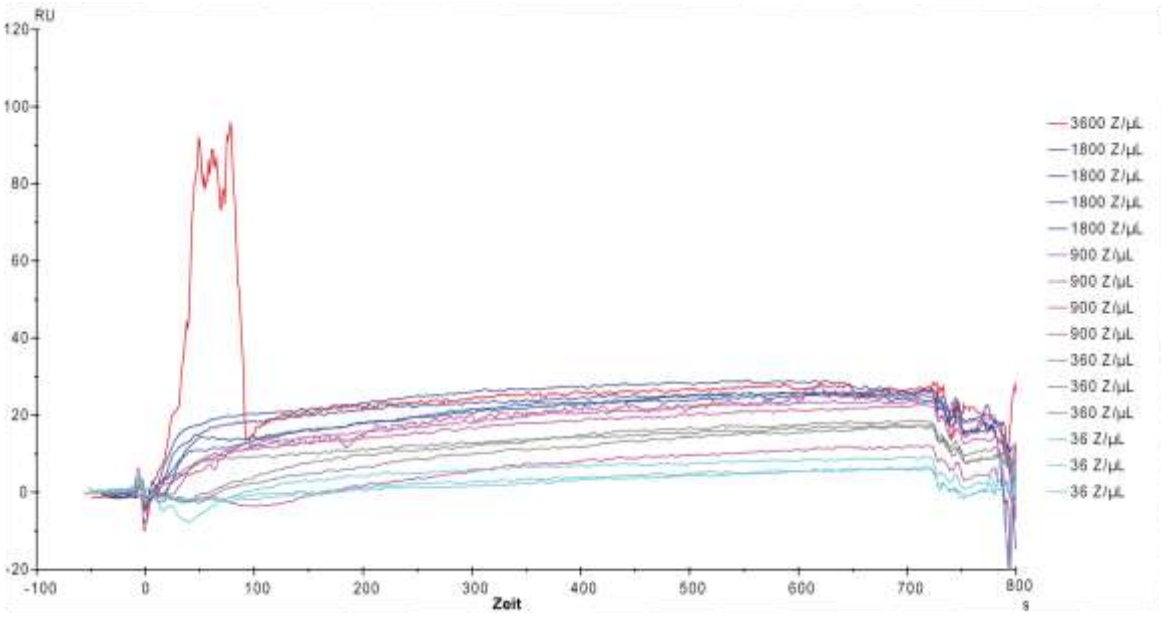


Abbildung 25: SPR-Sensorgramm des Peptids 7. Es wurden Messungen bei Konzentrationen von 3600 Z/µL (rot), 1800 Z/µL (blau), 900 Z/µL (mangenta), 360 Z/µL (grau) und 36 Z/µL (cyan) durchgeführt.

Aus dem Sensorgramm der Negativkontrolle des Peptids **7** (Abbildung 26) geht hervor, dass die RU-Antworten bei verschiedenen Konzentrationen willkürliche Werte annehmen. Die höchsten Konzentrationen (3600 und 1800 Z/µL) erreichen lediglich Werte um 0 RU, wohingegen die niedrigeren Konzentrationen, wie beispielsweise die Konzentration von 360 Z/µL (grau), Werte um 20 RU erreichen. Diese konzentrationsunabhängige Negativkontrolle belegt, dass die Bindungsstudien von **7** und GHOST(3)-Hi5-Zellen spezifische Interaktionen repräsentieren.

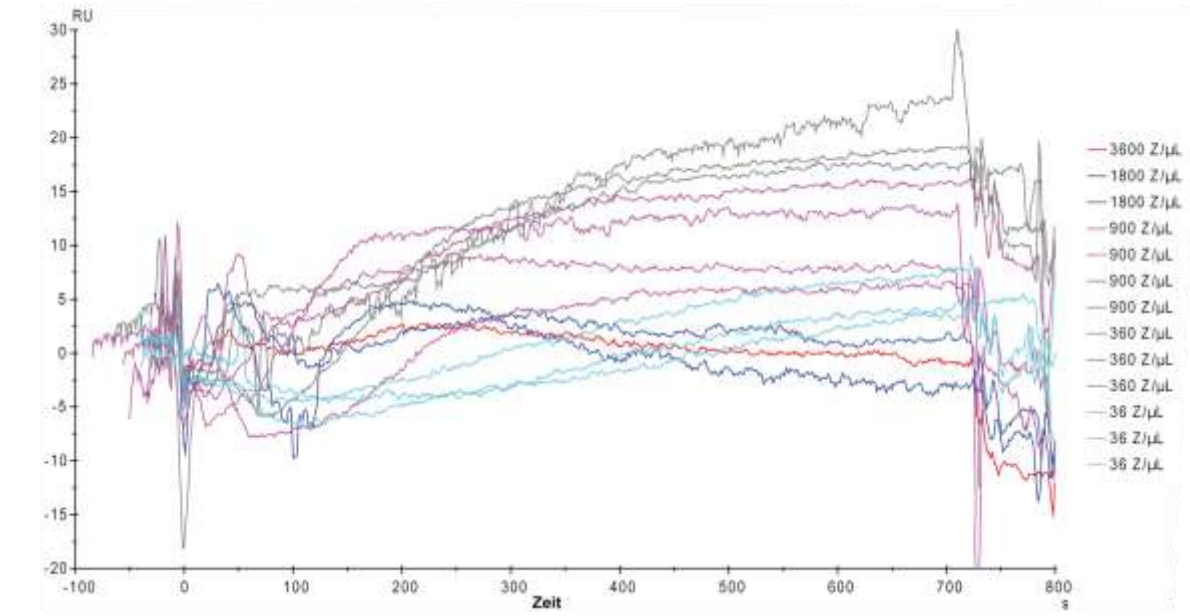


Abbildung 26: SPR-Sensorgramme der Negativkontrolle von Peptid 7. Die Zellkonzentrationen betrugen 3600 Z/µL (rot), 1800 Z/µL (blau), 900 Z/µL (mangenta), 360 Z/µL (grau) und 36 Z/µL (cyan).

4.3.3 Auswertung der SPR-Daten

Bei der durchgeführten Form der SPR-Messungen ist es nicht möglich, das *One-Site-Binding*-Modell (Gleichung 1) an die aus den Sensorgrammen resultierenden Datenpunkte anzupassen. Da die Zellen eine Größe von 17 µm aufweisen, ist davon auszugehen, dass eine Zelle mit mehr als nur einem immobilisierten Peptid gleichzeitig in Interaktion tritt. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Messgeräte lediglich Massenzunahmen am Chip bis zu einer Entfernung von 0.3 µm der angelagerten Vesikel detektieren.[139] Bei den verwendeten eukaryotischen Zellen, die größer als der optimale Größenbereich von 0.3 µm sind, ragt ein beachtlicher Anteil aus dem Messbereich heraus, der nicht vom Gerät erfasst werden kann. Auch kann nicht festgelegt werden, wie viele zelluläre Rezeptoren sich auf der Seite der Zelle befinden, die gerade zu den immobilisierten Peptiden ragt. Daher ist eine quantitative Aussage der Rezeptorkonzentration unmöglich zu treffen. Außerdem ist davon auszugehen, dass während der Injektion die Zellen durch Scherkräfte innerhalb kürzester Zeit zerrissen werden können und nur noch Membranfragmente der Zelle wechselwirken.

Ein weiterer Nachteil dieser Form der Oberflächenplasmonenresonanz ist, dass die zu untersuchenden Peptide immobilisiert werden. Grund hierfür ist, dass der CCR5-Rezeptor als Siebenhelixtransmembranrezeptor nicht immobilisiert werden kann, ohne dessen Funktion zu zerstören. Durch die Immobilisierung der Peptide ist nicht deren komplettes Motiv für den Rezeptor zugänglich, was die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor stark beeinflussen kann. Daher wurde in dieser Arbeit bei kurzen Peptidfragmenten von vier Aminosäuren ein GSGS-Motiv N-terminal angefügt, um eine räumliche Näherung des CCR5-Rezeptors zu gewährleisten. Doch auch die Dextranmatrix kann die immobilisierten Peptide so weit abschirmen, dass eine Interaktion zum zellulären Rezeptor gestört ist.

Aus diesen Gründen soll an dieser Stelle nicht, wie üblich, die Dissoziationskonstante K_D mittels des *One-Site-Binding*-Modells bestimmt werden, sondern lediglich eine qualitative Aussage über die spezifischen Bindungen der Peptide mit dem CCR5-Rezeptor getroffen werden. Daher werden in den anschließenden Bindungsisothermen die RU-Antworten gegen die Zellkonzentrationen und nicht gegen die Rezeptorkonzentration aufgetragen. Es wird bei allen Auftragungen das *One-Site-Binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst, um einen möglichen Kurvenverlauf zu verdeutlichen, die Ergebnisse werden jedoch nicht angeführt, da dieses Meßsystem keine Quantifizierung der Datenpunkte zulässt.

In Abbildung 27 sind die gemittelten RU-Antworten des Peptids **2** gegen die Zellkonzentrationen der GHOST(3)-Hi5-Zellen aufgetragen, wobei beide in Abbildung 18

gezeigten Messungen als Doppelbestimmung dargestellt sind. Weiterhin wurde ein Nullpunkt eingefügt. Es ist zu erkennen, dass die repräsentierten Wechselwirkungen bis zu einer Zellkonzentration von 1800 Z/µL einem spezifischen Kurvenverlauf folgen und bei diesem Wert einen Sättigungsbereich erreichen. Der weitere Kurvenverlauf der Datenpunkte ist linear und somit liegen unspezifische Interaktionen vor. Dies lässt sich auch damit begründen, dass die Abweichungen der RU-Antworten der beiden Messungen bei höheren Zellkonzentrationen stärker voneinander abweichen.

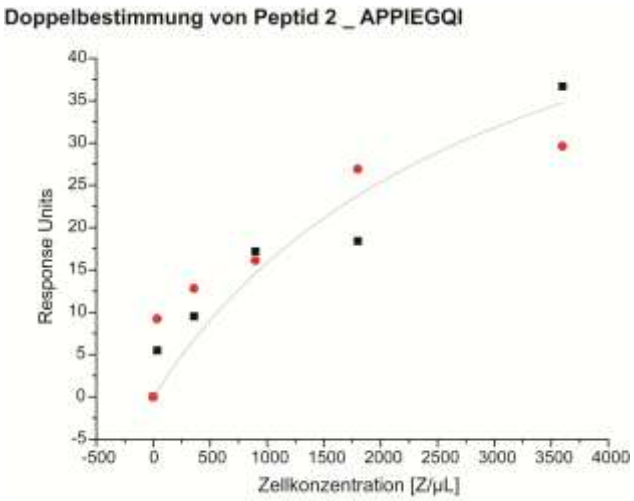


Abbildung 27: Auftragung der RU-Antworten des Peptids 2 gegen die Zellkonzentration. Es wurden beide SPR-Messungen als Doppelbestimmung graphisch dargestellt.

Die Doppelbestimmung des Peptids **5** ist in Abbildung 28 dargestellt. Es wurden die gemittelten RU-Antworten gegen die Zellkonzentration aufgetragen. Die Abweichung der Datenpunkte bei den einzelnen Zellkonzentrationen liegt bei etwa 10 RU, bei der höchsten Zellkonzentration sogar etwa bei 20 RU. Nichtsdestotrotz sind die beiden Verläufe der Datenpunkte ähnlich. Die anfängliche Steigung beider Messungen ist recht flach. Bei einer Zellkonzentration von etwa 3000 Z/µL zeichnet sich ein Sättigungsbereich der spezifisch verlaufenden Kurve bei ungefähr 50 RU ab. Der spezifische Kurvenverlauf der gezeigten Datenpunkte ist nicht so stark ausgeprägt wie der des Peptids **2**. Auch liegt der Sättigungsbereich bei weit höheren Zellkonzentrationen, wohingegen die RU-Antworten höhere Werte aufweisen. Es kann daher angenommen werden, dass die Abwesenheit der ersten vier Aminosäuren (^{436}APPI^{439}) der Leitstruktur **2** zu einem Verlust der spezifischen Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor führt. Auf der anderen Seite kann die Wechselwirkung, die das APPI-Motiv ausübt, keinen starken Beitrag zur Gesamtinteraktion liefern, da bei den

SPR-Messungen des Peptids **4** der Sequenz GSGSAPPI keine Wechselwirkungen detektiert werden konnten.

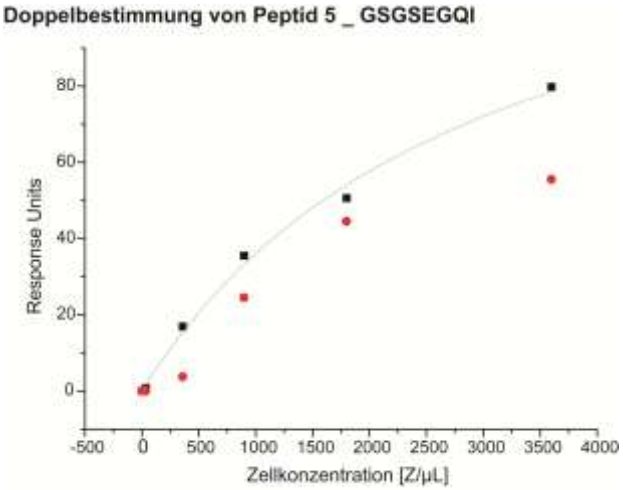


Abbildung 28: Doppelbestimmung der SPR-Messungen des Peptids 5. Es sind die RU-Antworten gegen die Zellkonzentrationen aufgetragen.

Um den Einfluss des APPI-Motivs näher zu erläutern, wurde das Peptid **7** mit der Sequenz GSGSPIEGQI vermessen, dessen Auftragung der erhaltenen RU-Antworten gegen die Zellkonzentrationen in Abbildung 29 gezeigt ist. Der Verlauf der Datenpunkte stellt sehr ausgeprägt den Kurvenverlauf einer spezifischen Wechselwirkung dar. Die anfängliche Steigung ist steil und erreicht bei einer Zellkonzentration von etwa 1800 Z/µL ein Sättigungsplateau. Die RU-Antworten liegen zwischen den Werten der vorangegangenen Messungen von Peptid **2** und **5** bei einem maximalen Wert von etwa 25 RU. Dies lässt darauf schließen, dass innerhalb des APPI-Motivs die hier untersuchten Aminosäuren P438 und I439 neben dem ^{440}EGQI^{443}-Motiv einen erheblichen Beitrag zur gesamten Interaktion zum CCR5 beisteuern.

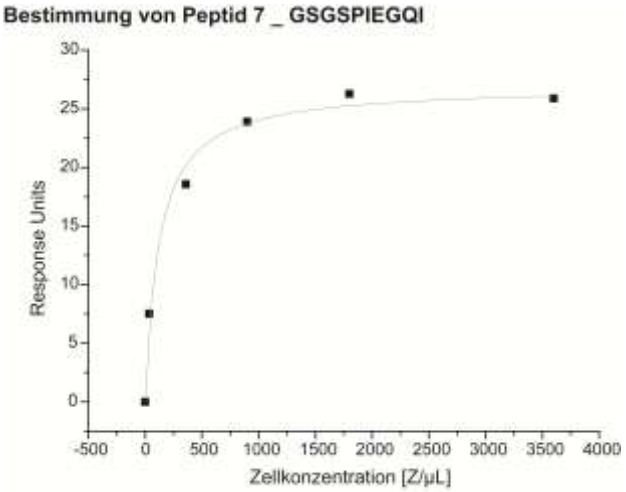


Abbildung 29: Auftragung der RU-Antworten des Peptids 7 gegen die Zellkonzentrationen.

Weiterhin wurde das Peptid **6** der Sequenz ^{434}MYAPPIEGQIEG^{445} vermessen, von dessen Doppelbestimmung die RU-Antworten gegen die Zellkonzentrationen in Abbildung 30 aufgetragen wurden. Die Datenpunkte zeichnen einen Kurvenverlauf einer spezifischen Wechselwirkung ab, die bei einer Zellkonzentration um 3000 Z/µL einen linearen Anstieg erfährt. Dabei liegen die RU-Antworten im Sättigungsbereich bei ungefähr 100 RU. Die RU-Werte sind bei den einzelnen Messungen relativ identisch, es sind lediglich Abweichungen von 10 RU zu verzeichnen. Durch diese Messung sollte untersucht werden, ob die jeweils zwei zum N- bzw. C-Terminus gelegenen benachbarten Aminosäuren Wechselwirkungen zum CCR5 aufweisen, obwohl diese im Homologiemodell (Abbildung 16) etwas weiter vom Rezeptor entfernt liegen. Der Verlauf der Datenpunkte dieser Messung ist etwa identisch mit dem des Peptids **2**. Einziger signifikanter Unterschied ist, dass die RU-Antworten bei Peptid **6** wesentlich höhere Werte annehmen. Daher lässt sich sagen, dass auch die erweiternden Aminosäuren der Sequenz eine Wechselwirkung zum CCR5 aufweisen.

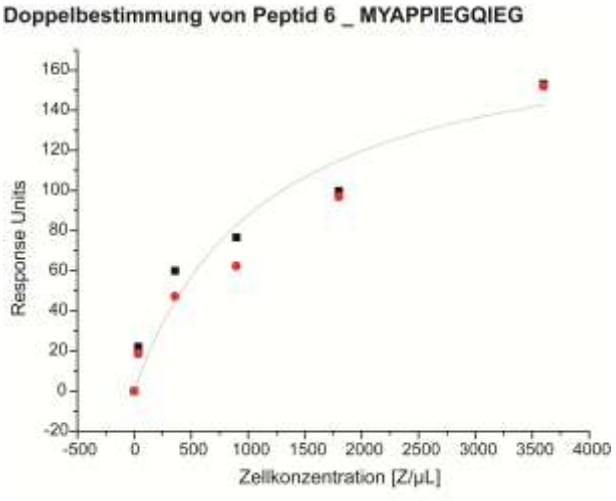


Abbildung 30: Auftragung der RU-Antworten des Peptids 6 gegen die Zellkonzentrationen. Die Doppelbestimmungen sind graphisch vereint.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die SPR-Messungen einen qualitativen Aufschluss über die Interaktionen der untersuchten C4-Region des gp120 zum CCR5-Rezeptor gaben. So konnte herausgefunden werden, dass das Leitmotiv ^{436}APPIEGQI^{443} mit dem Rezeptor wechselwirkt. Besonders die Sequenz EGQI des Peptids **5** steuert einen Beitrag zur Interaktion bei, während die Sequenz APPI des Peptids **4** einen Einbruch der Wechselwirkung bewirkt. Doch scheinen nicht alle Aminosäuren des APPI-Motivs einen Einbruch herbeizuführen, da die Messungen des PIEGQI-Motivs des Peptids **7** sehr starke spezifische Wechselwirkungen aufwiesen. Auch die Messungen der zum N- und C-Terminus jeweils zwei Aminosäuren verlängerte Sequenz MYAPPIEGQIEG ließ eine spezifische Wechselwirkung mit dem CCR5-Rezeptor verzeichnen.

Im Folgenden sollen quantitative Analysen einen Einblick über die Bindungsaffinität der Leitstruktur **2** zum CCR5-Rezeptor geben.

4.3 Durchflusszytometrie mit GHOST(3)-Zellen

Mit dieser Technik wurde die Anzahl an CCR5-Rezeptoren pro GHOST(3)-Hi5-Zelle auf 40000 Rezeptoren pro Zelle quantifiziert. Anschließend wurde mit dieser Methode eine Bindungsstudie durchgeführt und die thermodynamische Dissoziationskonstante zwischen CCR5-Rezeptor und Leitstruktur **2**, die mit dem Fluorophor Cy3 markiert wurde, bestimmt.

Die Arbeiten zur Durchflusszytometrie wurden an einem FACS CantoII (Becton Dickinson, Heidelberg) der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg, durchgeführt. Bei den Messungen wurden GHOST(3)-Hi5-Zellen, die durch stabile Transfektion den CCR5-Rezeptor exprimieren, und untransfizierte Parentalzellen des *NIH AIDS Research & Reference Reagent Program* verwendet.

4.3.1 Quantitative Bestimmung des CCR5-Rezeptors

Die Durchflusszytometriemessungen gaben Aufschluss darüber, wie viele CCR5-Rezeptoren von den verwendeten GHOST(3)-Hi5-Zellen exprimiert werden, um Bindungsstudien mit den Zellen quantitativ auswerten zu können. Durch Kalibrierung des FACS-Geräts mit *Beads* ist es möglich, die gemessene Fluoreszenz der Zellen mit einer aufgestellten Kalibriergerade zu quantifizieren und dadurch die Anzahl der Rezeptoren zu bestimmen. Wichtig bei dieser Technik ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (mAB) zum Markieren der Zellen, um eine spezifische Wechselwirkung zum Rezeptor gewährleisten zu können. Bei den durchgeführten Messungen wurde ein spezieller Klon (7.5.1) verwendet, der die aktive Konformation des CCR5-Rezeptors erkennt.

Zunächst erfolgte eine Kalibrierung des FACS CantoII mithilfe von QuantiBrite™ PE-*Beads* (Becton Dickinson, Heidelberg). Diese *Beads* sind kleine Kugeln, die in den vier unterschiedlich hohen Stufen *Low*, *MedLow*, *HighLow* und *High* mit einer vom Hersteller definierten Menge an PE-Fluorophoren konjugiert sind. Die *Beads* wurden vorab unter den gleichen Gerätebedingungen wie anschließend die Zellen vermessen. In Tabelle 3 sind die gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten der *Beads* mit unterschiedlichen Populationen an konjugiertem Fluorophor gelistet.

Tabelle 3: Mittlere Fluoreszenzintensitäten der vermessenen *Beads* mit unterschiedlichen Populationen an konjugiertem Fluorophor. Die *Beads* sind mit vier vom Hersteller definierten *Low-*, *MedLow-*, *HighLow-* und *High*-Populationen an PE-Fluorophoren konjugiert.

Fluorochrompopulation der *Beads*	gemessene mittlere Fluoreszenzintensität	Log mittlere Fluoreszenzintensität, PE-A
Low	73	1.86
MedLow	643	2.81
HighLow	2724	3.44
High	7360	3.87

Die erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten der vier Populationen wurden gegen die vom Hersteller definierte Menge an PE-Molekülen/*Bead* aufgetragen und eine lineare Regression berechnet (Abbildung 31).

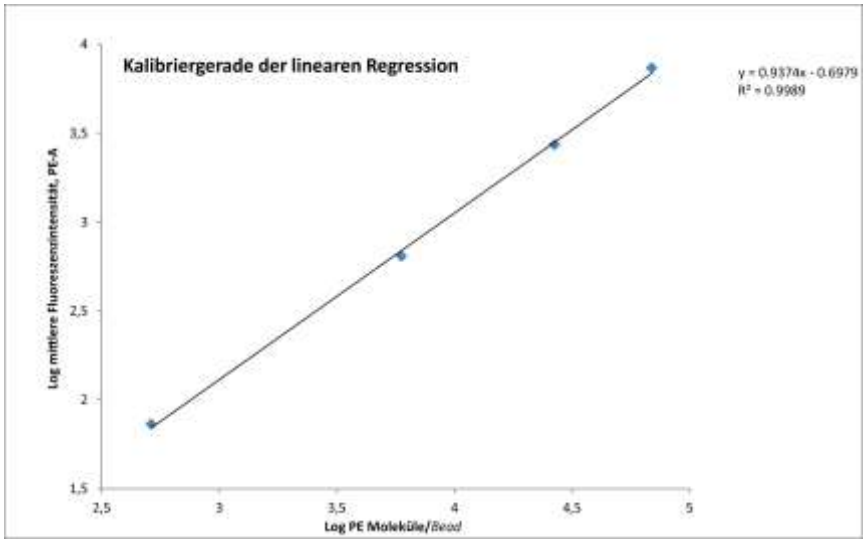


Abbildung 31: Kalibriergerade durch eine lineare Regression der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der *Beads* sind gegen vom Hersteller definierte Mengen an PE-Moleküle/*Bead* aufgetragen.

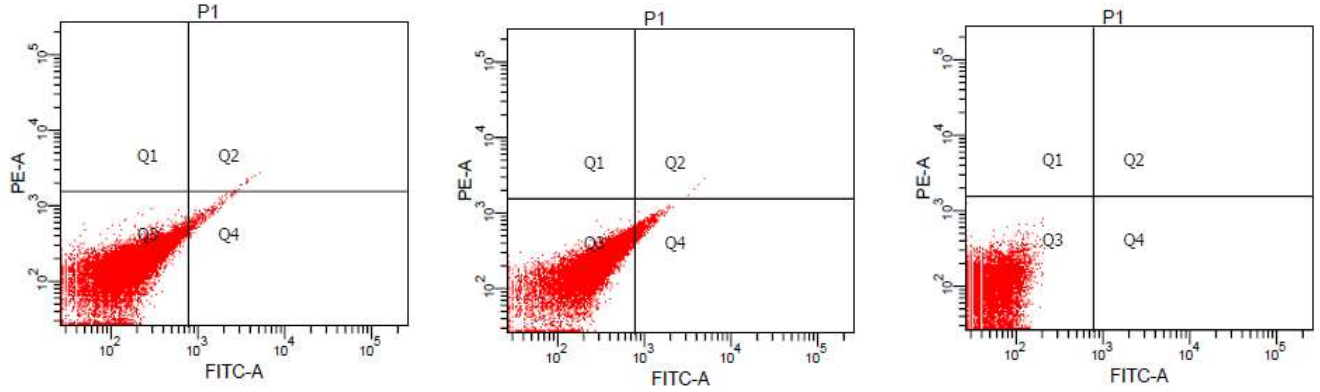
Es wurden Parental- und GHOST(3)-Hi5-Zellen, die nach dem Auftauen nur einmal passagiert wurden, am FACS CantoII vermessen. Die Parentalzellen stellen die Negativkontrolle dar, da diese Zellen nicht mit dem CCR5-Expressionsvektor transfiziert sind. Einerseits wurden GHOST(3)-Hi5-Zellen, die ohne Selektionsmittel (Zytostatika) wuchsen und andererseits GHOST(3)-Hi5-Zellen, die mit Selektionsmittel im Medium wuchsen, verwendet. Die weitere

Wachstumsbehandlung der Zellen war identisch. Dadurch sollte aufgeklärt werden, inwieweit sich das Selektionsmittel auf die Rezeptorexpression des CCR5 und Wachstumsverhalten der Zellen auswirkt. Es wurde von jeder Zelllinie eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Z/mL eingestellt. Jeweils ein Aliquot wurde anschließend mit einem PE-konjugierten, monoklonalem *mouse* IgG2a eingefärbt, ein anderes Aliquot jeder Zelllinie blieb unbehandelt.

Die sechs Aliquots der Zellen Parental, GHOST(3)-Hi5 und GHOST(3)-Hi5 + Selektion wurden durchflusszytometrisch vermessen. Abbildung 32 zeigt die Dotplots der einzelnen Messungen, in denen der PE-A-Kanal gegen den FITC-A-Kanal aufgetragen ist. Die ungefärbten Zellen der Negativkontrollen befinden sich alle im linken unteren Quadranten Q3 und sind daher PE-negativ. Eine leichte Verschiebung der Population in den rechten unteren Quadranten Q4 auf der FITC-A-Achse ist nicht ungewöhnlich und wird mit dem *leaking*-Phänomen erklärt. Bei diesem Phänomen veranlasst der Reportergen-Promotor auch ohne eine HIV-Infektion eine geringe konstitutive Expression des GFP. Die Morphologie und das Erscheinen im Dotplot der GHOST(3)-Hi5-Zellen, die mit dem Selektionsmittel kultiviert wurden, unterscheiden sich deutlich von dem der Zellen ohne Selektionsmittel. Da die Zellen nach der Behandlung mit dem Selektionsmittel nicht passagiert wurden, sind vermutlich auch tote bzw. sterbende Zellen im Ansatz.

Der Dotplot der Negativmessung der gefärbten Parentalzellen zeigt keine Veränderung der Zellen verglichen mit dem Dotplot der zweifach negativen Messung der Parentalzellen ohne Antikörper. Die Messung der GHOST(3)-Hi5-Proben mit PE-konjugiertem Antikörper zeigen einen *shift* der Zellen in den oberen linken Quadranten Q1 und sind damit PE-positiv. Es ist jedoch ersichtlich, dass sich jeweils zwei Zellpopulationen gebildet haben, die nicht homogen bezüglich der CCR5-Expression zu sein scheinen, da eine Population weniger PE-fluoreszierend ist als die andere.

Parental GHOST(3)-Hi5 GHOST(3)-Hi5 + Selektion



Parental mit mAB GHOST(3)-Hi5 mit mAB GHOST(3)Hi5 + Selektion mit mAB

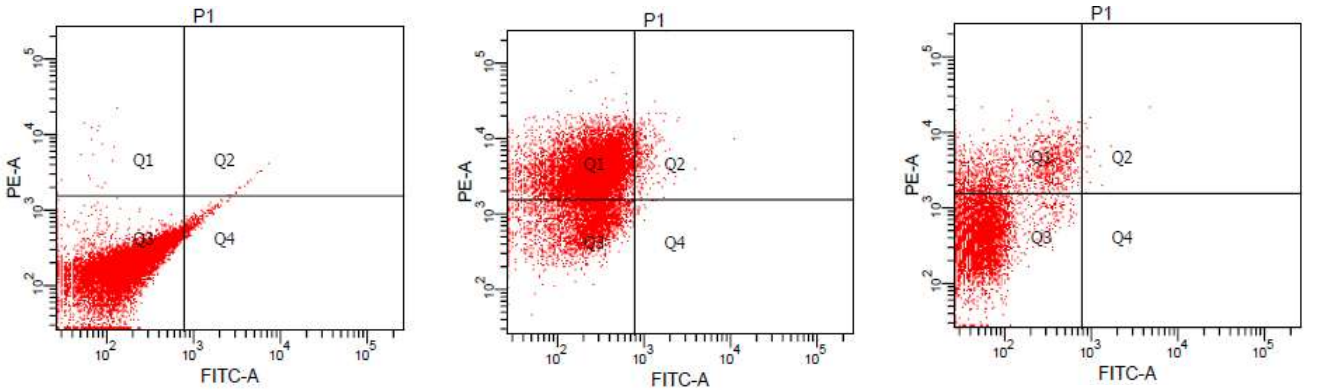
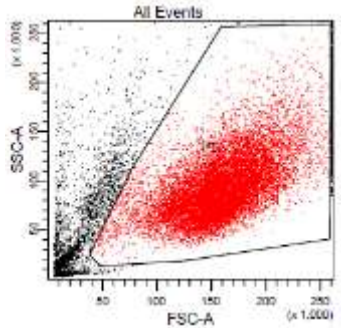


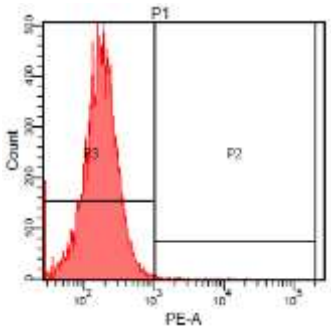
Abbildung 32: Dotplots der Zelllinien Parental, GHOST(3)-Hi5 und GHOST(3)-Hi5 + Selektion, jeweils mit und ohne Färbung mit dem PE direkt konjugiertem Maus monoklonalem Antikörper gegen den humanen CCR5-Rezeptor. Es wurde der PE-A-Kanal gegen den FITC-A-Kanal aufgetragen.

Exemplarisch für alle Messungen sind in Abbildung 33 die Dotplots, in dem der *Sidewards Scatter* (SSC) gegen den *Forward Scatter* (FSC) aufgetragen ist, und Histogramme mit monoklonalem, PE-konjugierten Antikörper gefärbten Parentalzellen und GHOST(3)-Hi5-Zellen gezeigt. In den Dotplots erfolgte die Eingrenzung (*gating*-Strategie) der zu betrachtenden Zellpopulation, in den Histogrammen wurde anschließend die Anzahl der Zellen gegen die mittleren Fluoreszenzintensitäten gemessen. Im Histogramm der GHOST(3)-Hi5-Zellen ist eine Schulter zu erkennen, die nicht in die Quantifizierung miteinbezogen wurde, da es sich wahrscheinlich um eine Population handelt, die weniger Rezeptoren exprimiert und daher eine geringere Fluoreszenz aufweist.

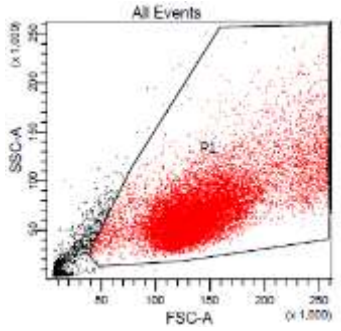
Dotplot: Parental mit mAB



Histogramm: Parental mit mAB



Dotplot: GHOST-Hi5(3) mit mAB



Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit mAB

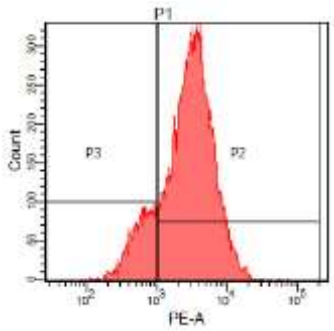


Abbildung 33: *Gating*-Strategie (SSC-A/FSC-A) und Histogramme (PE-A-Kanal) von mit dem monoklonalem PE-konjugierten Antikörper eingefärbten Parentalzellen und GHOST(3)-Hi5-Zellen. In den Histogrammen sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die Counts aufgetragen.

Aus den gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten konnte mittels der vorher aufgestellten linearen Regression der Kalibriergeraden eine Quantifizierung der Rezeptoranzahl auf der Zelloberfläche erstellt werden, die als Anzahl CCR5-Rezeptor/Zelle in Abbildung 34 dargestellt ist. Die Negativkontrollen ohne Färbung mit Antikörper weisen eine geringe Fluoreszenz auf. Dies begründet sich mit der Annahme, dass die Zellen eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Grund hierfür ist einerseits die geringe Expression des GFPs, welches ebenfalls durch das Phänomen der Spektralüberlappung im FL2-PE-A-Kanal sichtbar sein kann. Andererseits wurden alle Zellen während des Wachstums mit FKS behandelt, was ebenfalls zu einer Fluoreszenz führen kann. Daher wurden die Werte der Negativkontrollen von etwa 500 Rezeptoren pro Zelle als Hintergrund gesetzt. Die GHOST(3)-Hi5-Zellen weisen einen Wert von 39811 Rezeptoren pro Zelle auf. Die GHOST(3)-Hi5-Zellen, die mit Selektionsmittel kultiviert wurden, besitzen lediglich 3345 Rezeptoren. Die oben angeführte Annahme, dass sich die Zellen durch das Kultivieren mit Selektionsmittel in einem schlechten Zustand befinden, wird durch diesen Wert gestützt.

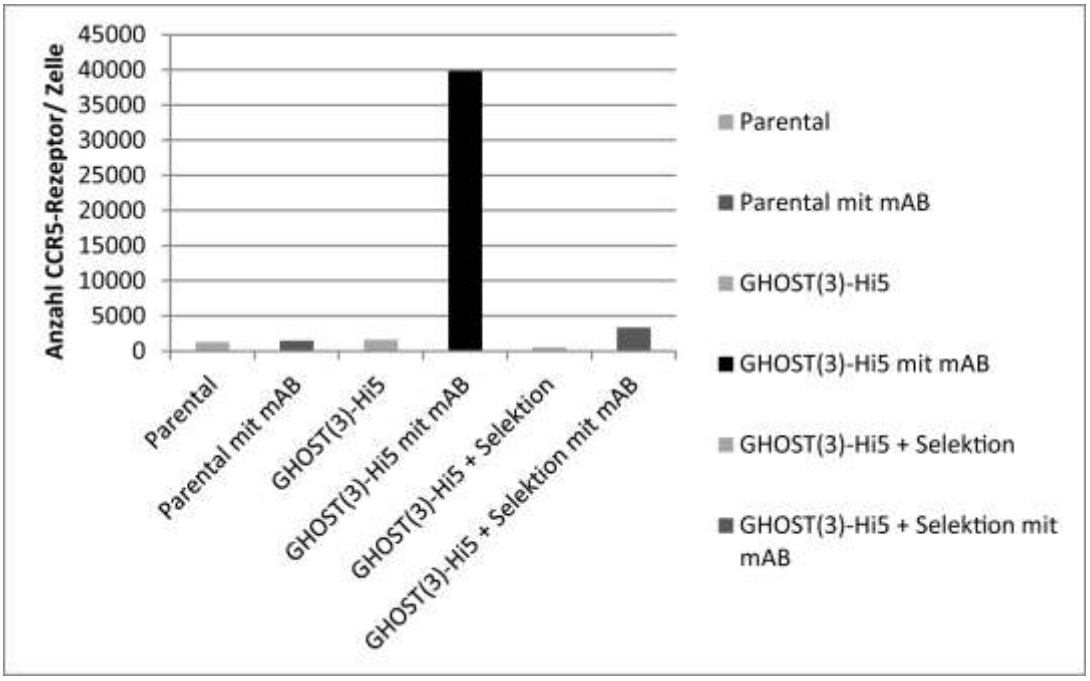
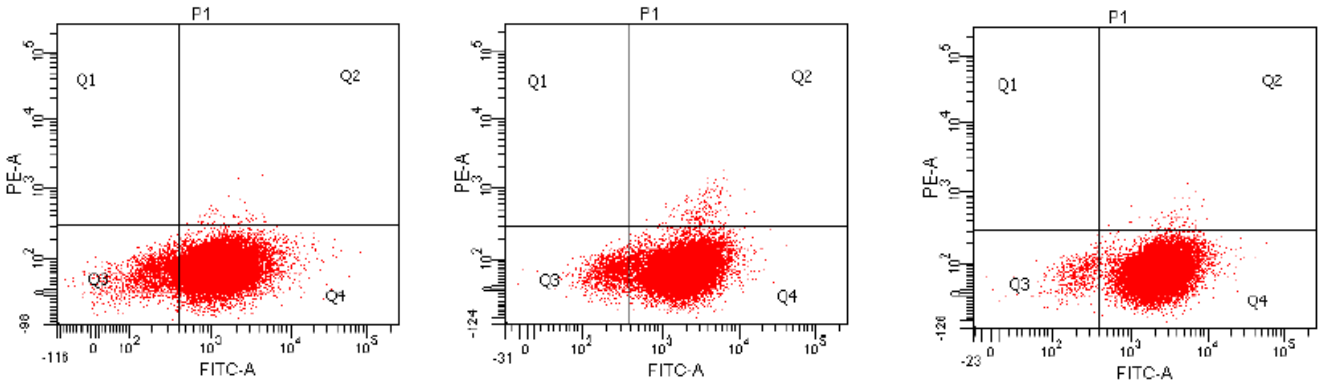


Abbildung 34: Ergebnis der Messung zur quantitativen Durchflusszytometrie. Die Anzahl der CCR5-Rezeptoren pro Zelle für die verschiedenen Zelllinien ist abgebildet (grau: Zellen, dunkelgrau: Zellen mit monoklonalem Antikörper, schwarz: Zellen mit der höchsten Anzahl an CCR5-Rezeptoren, mit monoklonalem Antikörper).

Um zu untersuchen, ob die Expression des CCR5-Rezeptors bei längerem Kultivieren der Zellen beeinflusst wird, wurden die Zellen weitere drei Male passagiert. Anschließend wurden sie unter den gleichen Bedingungen erneut analysiert.

In Abbildung 35 sind die erhaltenen Dotplots aller vermessenen Zellen gezeigt, in denen der PE-A-Kanal gegen den FITC-A-Kanal aufgetragen ist. Auch bei dieser Messung ist deutlich zu erkennen, dass alle Zellen zwei Populationen mit unterschiedlicher Fluoreszenz im FITC-A-Kanal aufweisen. Im Vergleich zu der ersten Messung sind die Zellen bei allen Proben homogener bezüglich ihrer Fluoreszenzeigenschaften. Die Dotplots der Negativkontrollen liegen alle im rechten unteren Quadranten Q4 und weisen daher keine Fluoreszenz im PE-A-Kanal auf. Die beiden gefärbten GHOST(3)-Hi5-Zellproben erfahren im Dotplot einen *shift* in den rechten oberen Quadranten Q2 und sind damit PE-positiv, wohingegen die gefärbten Parentalzellproben im Quadranten Q4 liegen und keine PE-Fluoreszenz aufweisen. Weiterhin ist zu erkennen, dass die sich GHOST(3)-Hi5-Zellen mit Selektionsmittel in einem besseren Zustand als im ersten Experiment befinden und sich nicht von den anderen GHOST(3)-Hi5-Zellen unterscheiden.

Parental GHOST(3)-Hi5 GHOST(3)-Hi5 + Selektion



Parental mit mAB GHOST(3)-Hi5 mit mAB GHOST(3)Hi5 + Selektion mit mAB

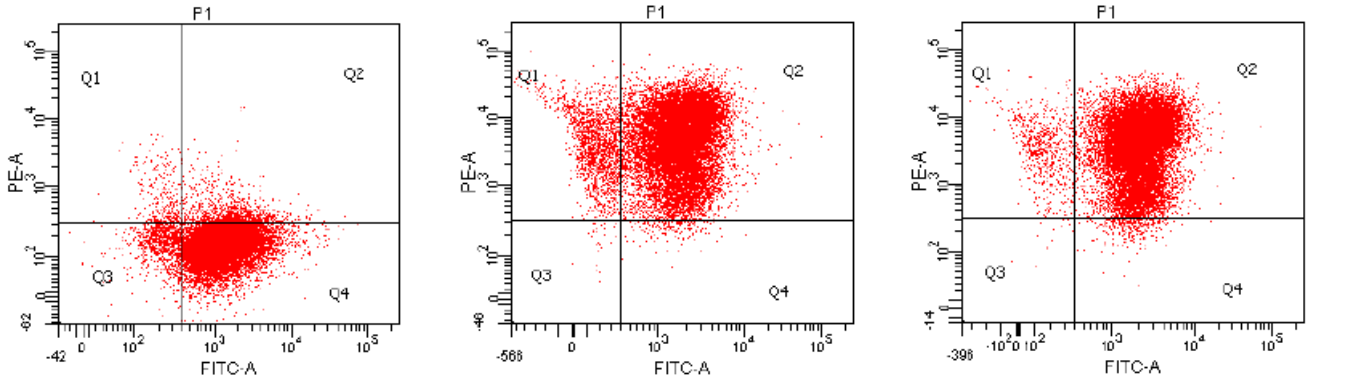
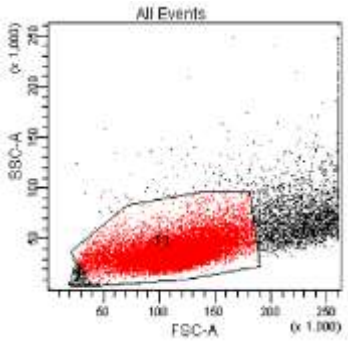


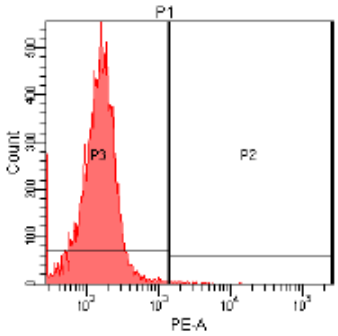
Abbildung 35: Dotplots der zweiten Messung von Parentalzellen, GHOST(3)-Hi5-Zellen und GHOST(3)-Hi5-Zellen + Selektion nach drei Passagen in Kultur, jeweils mit und ohne Färbung mit dem PE direkt konjugiertem Maus monoklonalen Antikörper gegen den humanen CCR5-Rezeptor. Es wurde der PE-A-Kanal gegen den FITC-A-Kanal aufgetragen.

In Abbildung 36 sind beispielhaft die Dotplots, in denen SSC-A gegen FSC-A aufgetragen sind, und die Histogramme der gefärbten Parentalzellen und GHOST(3)-Hi5-Zellen gezeigt. Die linke Schulter des Histogramms der GHOST(3)-Hi5-Zellen weist auf Zellen mit niedrigerer Rezeptorexpression hin und wurde nicht in die Bestimmung der Rezeptoranzahl pro Zelle miteinbezogen.

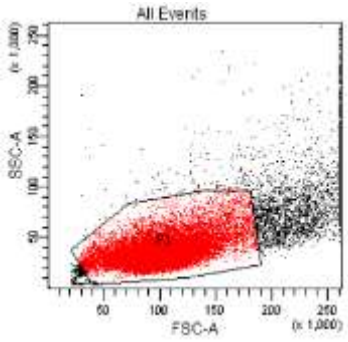
Dotplot: Parental mit mAB



Histogramm: Parental mit mAB



Dotplot: GHOST(3)-Hi5 mit mAB



Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit mAB

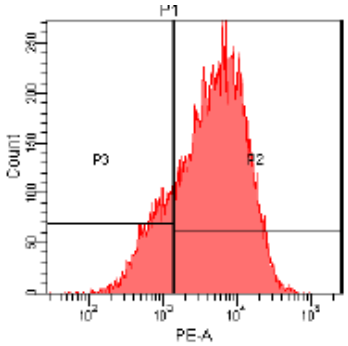


Abbildung 36: *Gating*-Strategie (SSC-A/FSC-A) und Histogramme (PE-A-Kanal) der mit monoklonalem Antikörper eingefärbten Parental- und GHOST(3)-Hi5-Zellen. In den Histogrammen sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die Counts aufgetragen.

Das Gerät wurde, wie bei der ersten Messung, mit QuantiBrite™ PE-*Beads* kalibriert und eine lineare Regression erstellt. Dadurch war es möglich, die gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten zu quantifizieren. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse zusammengetragen. Die Negativkontrollen besitzen eine geringe Fluoreszenz, was zu einer durchschnittlichen Rezeptoranzahl von 300 pro Zelle führt. Diese Anzahl ist aus oben angeführten Gründen als Autofluoreszenz der Zellen zu betrachten. Die Quantifizierung ergab für die GHOST(3)-Hi5-Zellen eine Rezeptoranzahl von 37050 pro Zelle; für die GHOST(3)-Hi5-Zellen, die mit Selektionsmittel behandelt wurden, wurden 29093 Rezeptoren pro Zelle ermittelt. Für die GHOST(3)-Hi5-Zellen bedeutet dies, dass die Anzahl der CCR5-Rezeptoren gleichbleibend ist und somit auch ein häufigeres Passagieren der Zellen keinen Einfluss auf die Expressionsfähigkeit hat. Bei den GHOST(3)-Hi5-Zellen mit Selektionsmittel konnte eine Verbesserung der Expressionsfähigkeit festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die quantitative Rezeptorbestimmung gut mit dem

Wert von etwa $5 \cdot 10^4$ Rezeptoren pro Zelle, den Lee *et al.* beschrieb[140], übereinstimmt und das dreimaliges Passagieren der Zellen keinen Einfluss auf deren Rezeptorexpression darstellt.

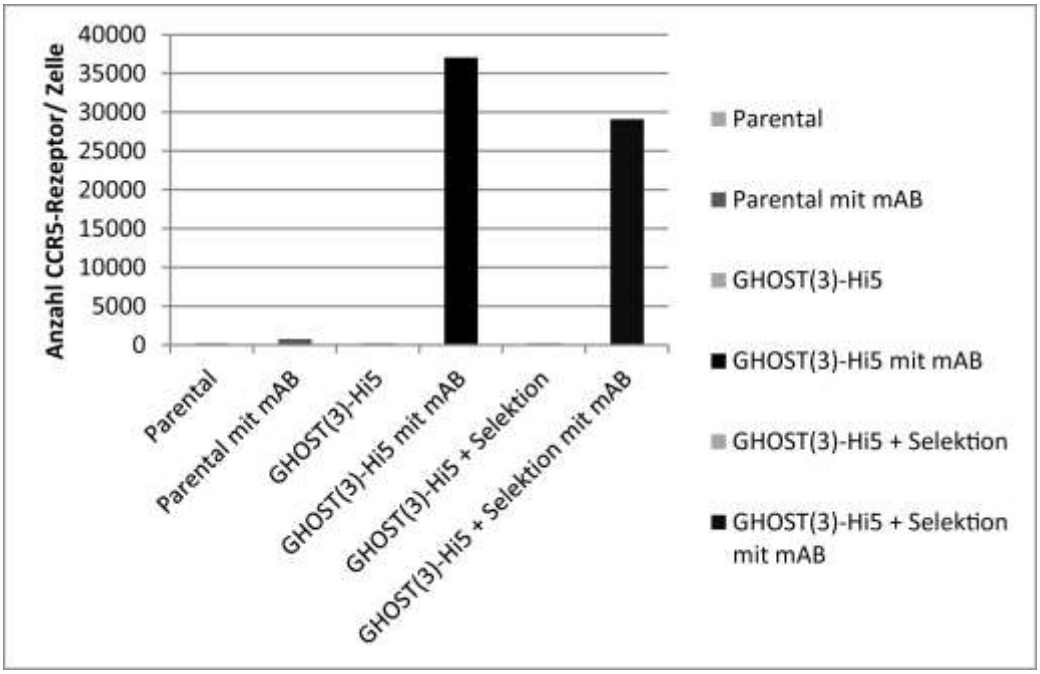


Abbildung 37: Übersicht der Ergebnisse zur quantitativen Durchflusszytometrie. Die Anzahl der CCR5-Rezeptoren pro Zelle sind für alle vermessenen Zellen angeführt (grau: Zellen, schwarz: Zellen mit monoklonalem Antikörper).

4.3.2 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Mit Hilfe dieses Messverfahrens ist es möglich, die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D eines Liganden und seinem Rezeptor zu ermitteln. Der Ligand stellt in diesem Fall ein Peptid dar, das mit genau einem Äquivalent eines Fluorophors markiert ist. In dieser Arbeit wurde die Leitstruktur **2** der C4-Region des gp120 mit dem Cy3-Fluorophor markiert. Bedingt durch die Struktur des Peptids wurde das Fluorophor Cy3-NHS-ester an den N-Terminus gekuppelt und somit eine Einfachkupplung durchgeführt. Dies machte es möglich, pro Fluoreszenzsignal der Messung von einer 1:1-Bindung zwischen Rezeptor und Ligand auszugehen.

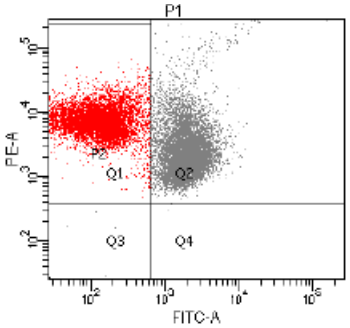
Um die Dissoziationskonstante eines Liganden bestimmen zu können, wurde eine Konzentrationsreihe des zuvor hergestellten Cy3-markierten Octapeptids **2+Cy3** mit CCR5-überexprimierenden GHOST(3)-Hi5-Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Die erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen wurden gegen die Konzentrationen von **2+Cy3** aufgetragen. Durch die Annahme, dass je ein Ligand mit nur

einem Fluorophor markiert ist, konnte das *One-Site-Binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst und somit die Dissoziationskonstante ermittelt werden.

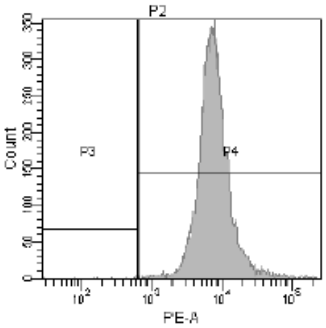
Es wurden GHOST(3)-Hi5-Zellen mit Lösungen von **2+Cy3** mit den Konzentrationen von 10 mM, 1 mM, 500 µM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 500 nM und 100 nM vermessen. Als Negativkontrollen dienten einerseits Parentalzelllösungen mit 10 mM und 100 nM **2+Cy3**, als auch die beiden Zellarten ohne Peptidlösung. Es wurden Messungen mit Zellkonzentrationen von $1 \cdot 10^6$ Z/mL durchgeführt.

Bei den Messungen wurden in den SSC-A/FSC-A-Dotplots *gates* gelegt, um nur die lebendigen Zellen zu berücksichtigen. Die Messungen der Zellen sind als Dotplots, in denen der PE-A-Kanal gegen den FITC-A-Kanal aufgetragen ist, dargestellt (Abbildung 38). In den Dotplots ist ersichtlich, dass zwei Zellpopulationen vorlagen. Die Zellpopulation der Quadranten Q1 und Q3 sind GFP-negativ, wohingegen die Zellpopulation im Quadranten Q2 bzw. Q4 GFP-positiv ist. Um Fehler in der Bestimmung der Dissoziationskonstanten auszuschließen, wurden nur die Zellen im Quadranten Q1 bzw. Q3 der Dotplots und deren mittlere Fluoreszenzintensitäten in den Histogrammen abgebildet, die sie keine Autofluoreszenz aufwiesen. Aus den Histogrammen des PE-A-Kanals und den Quadranten Q1 und Q3 der Dotplots geht hervor, dass die Fluoreszenz mit sinkender Peptidkonzentration abnimmt, bis bei einer Konzentration von 10 µM keine Fluoreszenz im PE-A-Kanal mehr observiert werden kann. Da ab dieser Konzentration keine Fluoreszenz mehr detektiert wurde, sind Ergebnisse der niedrigeren Konzentrationen nicht mit angefügt.

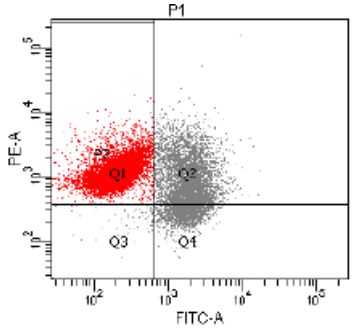
Dotplot: GHOST(3)-Hi5 mit 10 mM **2+Cy3**



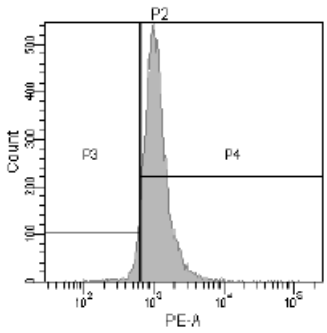
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 10 mM **2+Cy3**



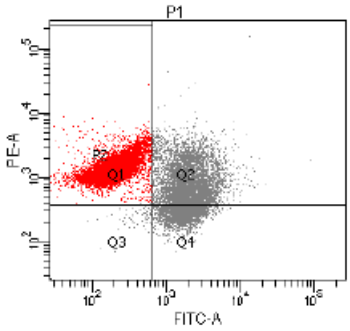
Dotplot: GHOST(3)-Hi5 mit 1 mM **2+Cy3**



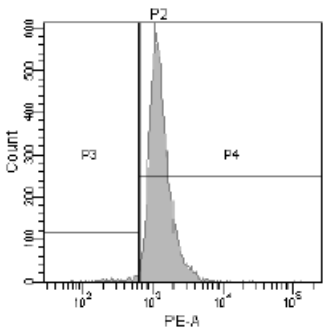
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 1 mM **2+Cy3**



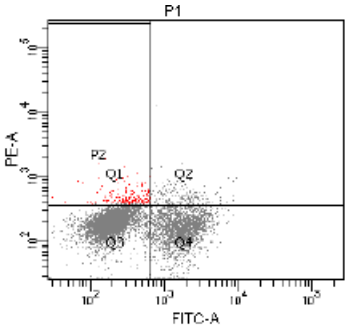
Dotplot: GHOST(3)-Hi5 mit 500 µM **2+Cy3**



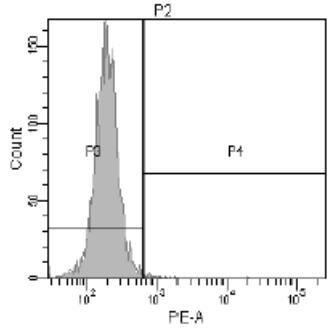
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 500 µM **2+Cy3**



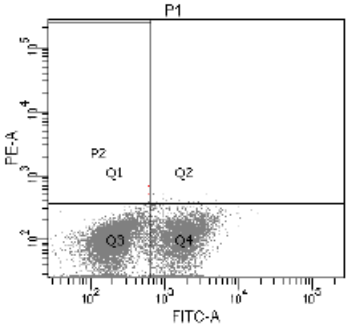
Dotplot: GHOST(3)-Hi5 mit 100 µM **2+Cy3**



Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 100 µM **2+Cy3**



Dotplot: GHOST(3)-Hi5 mit 10 µM **2+Cy3**



Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 10 µM **2+Cy3**

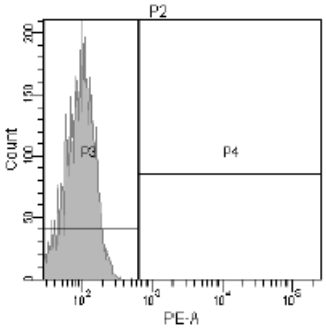
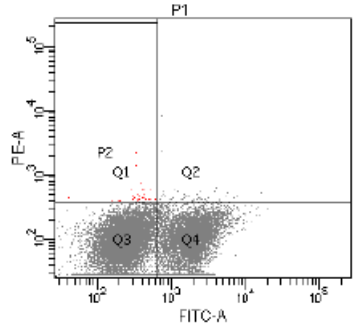


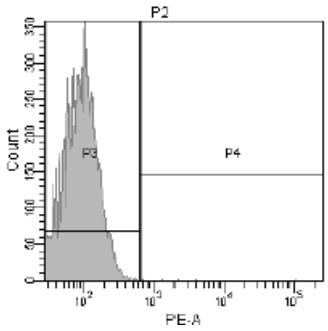
Abbildung 38: Dotplots (PE-A/FITC-A) und Histogramme (PE-A-Kanal) der Messung von GHOST(3)-Hi5-Zellen gefärbt mit einer Konzentrationsreihe von 10 mM, 1 mM, 500µM, 100 µM, 10 µM des Peptids 2+Cy3. In den Histogrammen sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Zellen in den Quadranten Q1 und Q3 abgebildet.

Um eine unspezifische Wechselwirkung ausschließen zu können, wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt. Einerseits wurden nur Zellen ohne Peptidlösung vermessen, was in Abbildung 39 dargestellt ist. Bei den Negativkontrollen treten im FITC-A-Kanal des Dotplots zwei Populationen auf, es liegen aber nirgends PE-positive Zellpopulationen vor. Aus den Histogrammen (PE-A-Kanal) geht hervor, dass die Zellen PE-negativ sind.

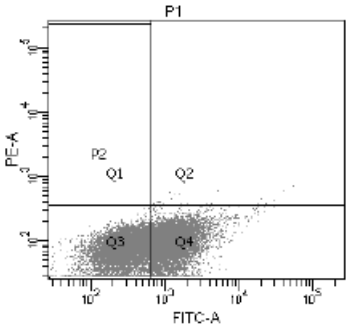
Dotplot: GHOST(3)-Hi5



Histogramm: GHOST(3)-Hi5



Dotplot: Parental



Histogramm: Parental

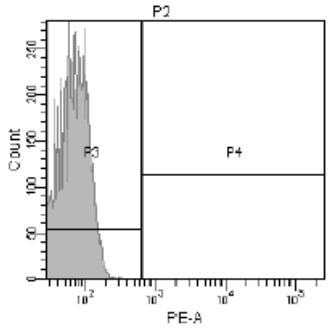
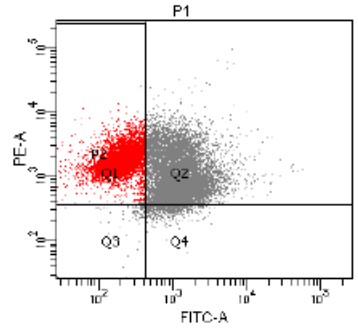


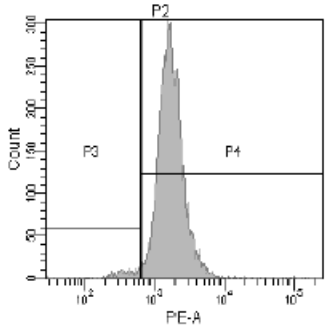
Abbildung 39: Negativkontrolle der durchflusszytometrischen Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Dotplots (PE-A/FITC-A) und Histogramme des PE-A-Kanals von GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen, die nicht mit 2+Cy3 gefärbt wurden. In den Histogrammen sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Zellen in den Quadranten Q1 und Q3 der Dotplots abgebildet.

Um die Spezifität der Wechselwirkung zu untersuchen, wurden andererseits auch Parentalzellen, die mit Peptidlösungen der Konzentrationen von 10mM und 100 nM gefärbt wurden, vermessen (Abbildung 40). Parentalzellen, die mit 10 mM **2+Cy3** gefärbt wurden, waren PE-positiv. Im Histogramm der Quadranten Q1 und Q3 ist die mittlere Fluoreszenzintensität jedoch geringer als die der GHOST(3)-Hi5-Zellen, die ebenfalls mit der gleichen Konzentration von 10 mM **2+Cy3** gefärbt wurden. Bei der Konzentration von 10 µM **2+Cy3** zeigen die Parentalzellen kein Signal im PE-A-Kanal.

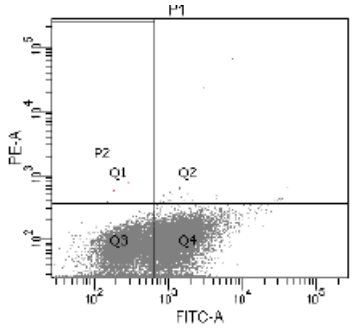
Dotplot: Parental mit 10 mM **2+Cy3**



Histogramm: Parental mit 10 mM **2+Cy3**



Dotplot: Parental mit 10 nM **2+Cy3**



Histogramm: Parental mit 10 nM **2+Cy3**

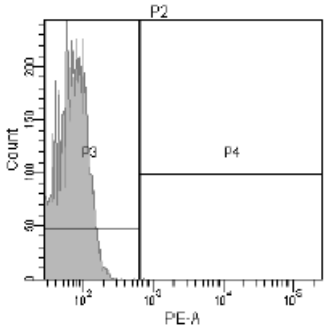


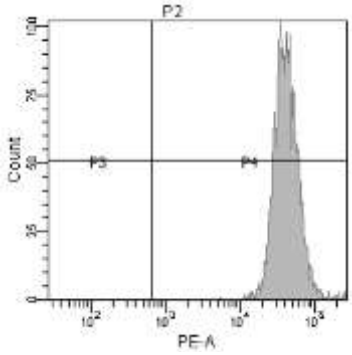
Abbildung 40: Dotplots (PE-A/FITC-A) und Histogramme (PE-A-Kanal) der Negativkontrolle der durchflusszytometrischen Messung der Dissoziationskonstanten. Es wurden Parentalzellen, die mit Peptidlösungen mit Konzentrationen von 10 mM und 100 nM gefärbt wurden, vermessen. In den Histogrammen sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Quadranten Q1 und Q3 abgebildet.

Diese Negativmessung zeigt, dass das Peptid **2+Cy3** auch unspezifische Wechselwirkungen mit den Zellen eingeht. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Messung mit GHOST(3)-Hi5-Zellen und einer Ligandkonzentration von 10 mM liegt bei 9617, die Intensität der gleichen Peptidkonzentration mit Parentalzellen liegt bei 2112. Dementsprechend geht aus diesen Mittelwerten hervor, dass die Wechselwirkung zu ungefähr 20% unspezifisch ist. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sowohl das Fluorophor als auch das Peptid einen hohen hydrophoben Charakter aufweisen und daher eine unspezifische Interaktion mit beispielsweise der Zellmembran eingehen können.

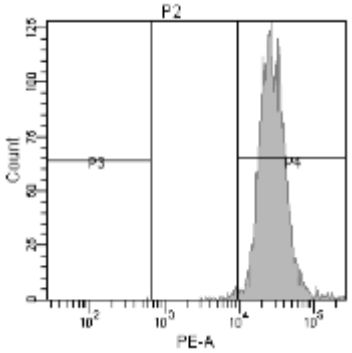
Da die Zellen ab einer Ligandkonzentration von 2 µM keine Anfärbung mehr zeigten, war es nicht möglich, eine eindeutige graphische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die Peptidkonzentrationen zu erhalten. Diese Messung diente dementsprechend als Anhaltspunkt, in welchem Konzentrationsbereich nachfolgende Messungen erfolgen mussten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Ligand **2+Cy3** zu 20% unspezifische Wechselwirkungen mit den vermessenen Zellen eingeht.

Aus diesem Grund wurde erneut eine Messung zur Bestimmung der Dissoziationskonstante durchgeführt. Diesmal wurden die Konzentrationen des Cy3-markierten Peptids den Ergebnissen der vorangegangenen Messung angeglichen. Es wurden Zellen, die mit der Konzentrationsreihe von 12.0, 9.6, 7.7, 6.6, 3.1, 1.3, und 0.8 mM des Peptids **2+Cy3** gefärbt wurden, vermessen. Als Negativkontrolle diente eine Messung von ungefärbten GHOST(3)-Hi5-Zellen. Die Zellkonzentrationen betrugen jeweils $1 \cdot 10^6$ Z/mL. Dabei wurde im SSC-A/FSC-A-Dotplot ein *gate* gelegt, um nur die lebendigen Zellen zu berücksichtigen. Im PE-A/FITC-A-Dotplot wurden GFP-positive Zellen ausgeschlossen, um die starke Autofluoreszenz auszuschließen und nur die mittlere Fluoreszenzintensität der GFP-negativen Zellen zu betrachten. Die Histogramme des PE-A-Kanals (Abbildung 41) zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von den Ligandkonzentrationen. In einigen Histogrammen ist eine Schulter zu verzeichnen, die auf die Spektralüberlappung und dessen unzureichende Kompensation im FITC-A-Kanal zurückzuführen ist. Daher wurde eine Beschränkung vorgenommen, so dass nur die mittlere Fluoreszenzintensität im P4-*gate* in der Auswertung berücksichtigt wurde.

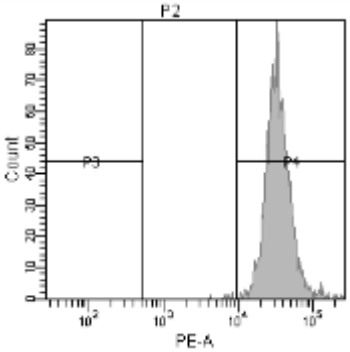
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 12.0 mM **2+Cy3**



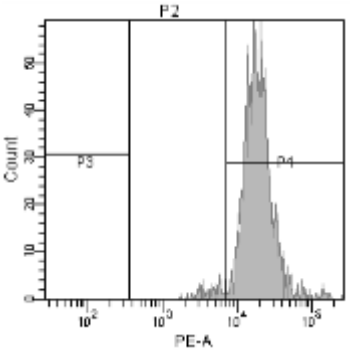
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 9.6 mM **2+Cy3**



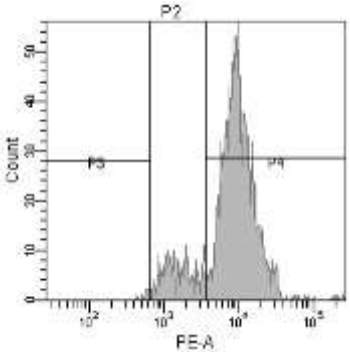
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 7.7 mM **2+Cy3**



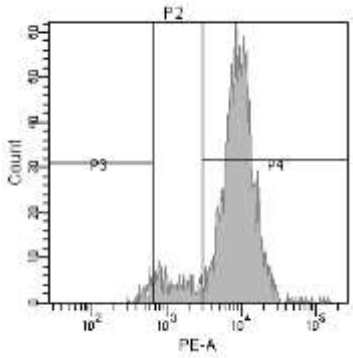
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 6.6 mM **2+Cy3**



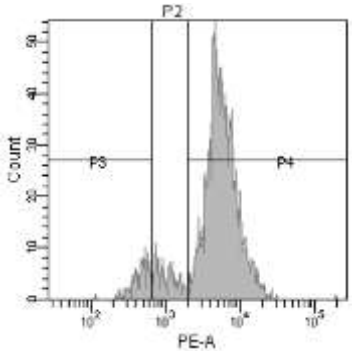
Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 3.1 mM **2+Cy3**



Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 1.3 mM **2+Cy3**



Histogramm: GHOST(3)-Hi5 mit 0.8 mM **2+Cy3**



Histogramm: GHOST(3)-Hi5, Negativkontrolle

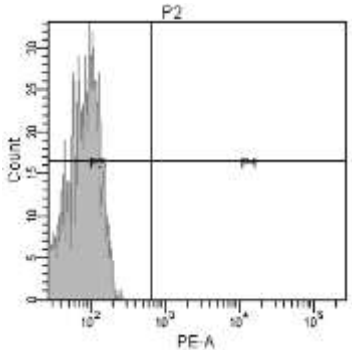


Abbildung 41: Histogramme zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Es wurden Zellen, die mit der Konzentrationsreihe von 12.0, 9.6, 7.7, 6.6, 3.1, 1.3, und 0.8 mM des fluoreszenzmarkierten Peptids 2+Cy3 gefärbt wurden, vermessen. Als Negativkontrolle diente eine Messung der ungefärbten GHOST(3)-Hi5-Zellen. Nur Zellen im P4-*gate* wurden berücksichtigt.

Die vermessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten des P4-*gates* wurden gegen die Konzentrationen des fluorophormarkierten Peptids aufgetragen und das *One-Site-Binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst (Abbildung 42).

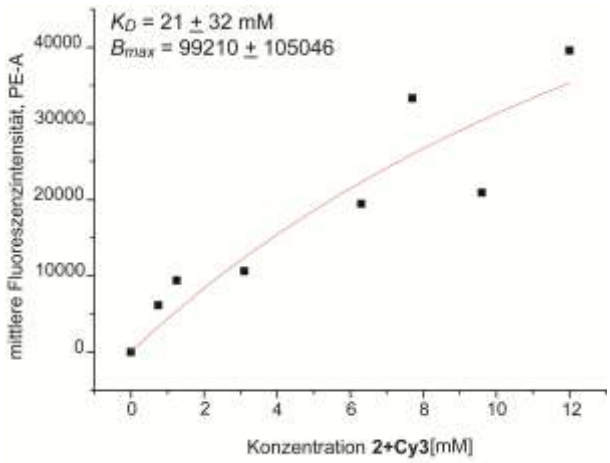


Abbildung 42: Berechnung der thermodynamischen Dissoziationskonstanten K_D des fluoreszenzmarkierten Peptids 2+Cy3. Es wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die Ligandkonzentrationen aufgetragen und das *One-Site-Binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst.

Aus der Auftragung der Abbildung 43 ergibt sich ein K_D von 21 ± 32 mM. Die Fehler der B_{max}- und K_D-Werte liegen jedoch sehr hoch und auch die angepasste Funktion weist eine hohe mittlere Abweichung auf, weshalb ein zusätzlicher künstlicher Datenpunkt zur Stabilisierung in die Auftragung mit einbezogen wurde. Dazu wurde der errechnete B_{max}-Wert von 100000 (Abbildung 42) bei einer hohen Konzentration gesetzt. Da die Konzentration, bei der eine Sättigung der mittleren Fluoreszenzintensität vorliegt, nur geschätzt werden konnte, wurden zwei Graphen mit einerseits einer Ligandkonzentration von 100 mM (Abbildung 43a) und andererseits mit einer Konzentration von 200 mM (Abbildung 43b) aufgestellt und das *One-Site-Binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst.

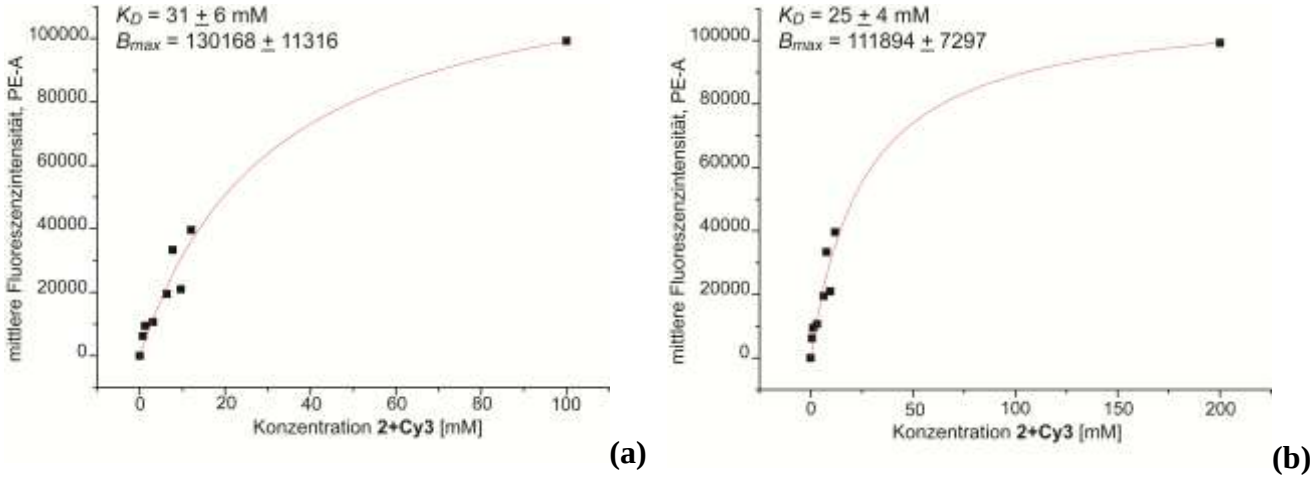


Abbildung 43: Berechnung der Dissoziationskonstanten des Peptids 2+Cy3. Es wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die Ligandkonzentrationen aufgetragen und jeweils ein künstlicher Datenpunkt gesetzt. Dieser Datenpunkt liegt in beiden Graphen bei einer mittleren Fluoreszenzintensität von 100000. Die Konzentration, bei der eine Sättigung der Fluoreszenz auftritt, wurde in der Berechnung (a) auf 100 mM und in (b) auf 200 mM gesetzt. Das *One-Site-Binding*-Modell wurde an die Datenpunkte angepasst.

Die daraus resultierende Dissoziationskonstante liegt im Graphen (a) bei 31 ± 6 mM und im Graphen (b) bei 25 ± 4 mM und ist somit in der gleichen Größenordnung des Wertes der vorherigen Auftragung in Abbildung 42. Die B_{max}-Werte liegen mit 111894 – 130168 der mittleren Fluoreszenzintensität in dem Bereich, der als Sättigungsintensität vorgegeben wurde. Der B_{max}-Wert der Auftragung mit einer Sättigungsligandkonzentration von 200 mM liegt jedoch näher an dem vorab definierten Wert und weist auch einen niedrigeren Fehler auf. Daher ist davon auszugehen, dass die Sättigungskonzentration des Liganden bei 200 mM liegt und somit eine Dissoziationskonstante K_D von 25 mM aufweist.

4.4 STDD-NMR-Spektroskopie der Leitstruktur 2 und Liposomen

Die durchflusszytometrisch bestimmte Dissoziationskonstante des Peptids **2+Cy3** wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie verifiziert. Es konnte durch eine STDD-NMR-Titration eine Bindungskurve erstellt werden.

4.4.1 Präparation von Liposomen aus Zellen

Um Bindungsereignisse von Liganden mit dem CCR5-Rezeptor untersuchen zu können, liegt es nahe, das Protein in seiner natürlichen Membranumgebung zu bewahren. Würde der Rezeptor aus der Membran herausgelöst, verlöre dieser Struktur und Funktion. Da aber die Zellen, die in dieser Arbeit Verwendung finden, aufgrund ihrer Größe zu schnell sedimentieren, sind sie ungeeignet für NMR-Experimente. Ein von Hünnefeld entwickeltes Verfahren bietet jedoch die Möglichkeit, Interaktionen von Transmembranrezeptoren und ihren Liganden NMR-spektroskopisch untersuchen zu können.[141] Dabei werden aus GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen Liposomen hergestellt (Abbildung 44), wobei die natürliche Umgebung der CCR5-Rezeptoren erhalten bleibt. Die Zellen werden zunächst mittels eines Stickstoffhomogenisators bei einem hohen Druck zerstört. Organellen, Kerne sowie lösliche Proteine werden anschließend abgetrennt. Die verbleibenden Vesikel der Membranfraktion werden durch Extrusion auf große, unilamellare Vesikel (LUVs) mit einer einheitlichen Größenverteilung von etwa 200 nm gebracht.

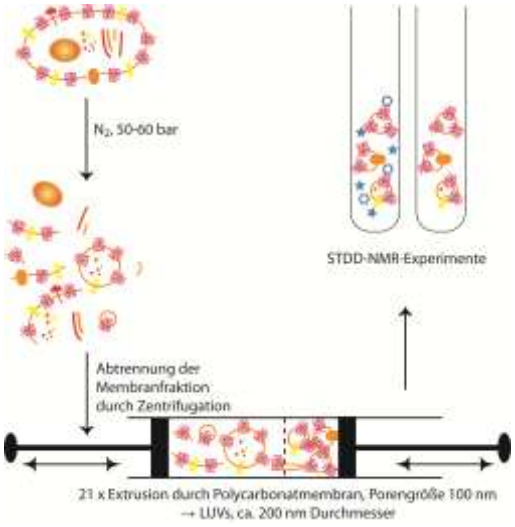


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Herstellung von Liposomen aus Zellen.[114] Die Zellen werden durch Stickstoffkompression zerstört und die Membranfraktion abgetrennt. Durch Extrusion der Vesikel wird eine durchschnittliche Größenverteilung der Liposomen von 200 nm erreicht, die NMR-spektroskopisch untersucht werden können.

In dieser Arbeit wurden jeweils 26 Aliquots tiefgefrorener Zellen für die NMR-Experimente verwendet, die in 300 µL Puffer suspendiert wurden. Unter der Annahme, dass ein Aliquot durchschnittlich $1 \cdot 10^7$ Zellen umfasste und den durchgeführten Durchflusszytometrie-messungen, die eine Rezeptoranzahl von 40000 Rezeptoren pro Zelle ergaben, resultierte daraus eine Konzentration von 58 nM an CCR5-Rezeptor.

4.4.2 STDD-NMR-Titration

Um die Ergebnisse der Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Durchflusszytometrie zu verifizieren, wurde eine STDD-NMR-Titration des Peptids **2** mit Liposomen der GHOST(3)-Hi5-Zellen durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die STD-Effekte einzelner Ligandprotonen aus entsprechenden NMR-Experimenten bestimmt, die STD-Amplifikationsfaktoren STD_{ampl} ermittelt (Gleichung 2) und diese gegen die verwendeten Ligandkonzentrationen aufgetragen. Durch Anpassen des *One-Site-Binding*-Modells an die Datenpunkte wird die Dissoziationskonstante K_D erhalten.

Für die STDD-NMR-Titration wurden 150 µL einer 58 nM, bezogen auf CCR5, Liposomensuspension, aus GHOST(3)-Hi5-Zellen dargestellt. Dies entspricht einer Zellkonzentration von $17 \cdot 10^8$ Zellen/100 µL. Diese Suspension wurde mit jeweils 2 µL des Liganden **2** vermessen, wobei die Ligandkonzentrationen 5, 10, 15, 20 und 36.5 mM betrugen. Sowohl die Liposomen als auch das Peptid lagen in LUV-EDTA-NMR-Puffer vor. Da das Peptid in dem Puffer nicht vollständig gelöst vorlag, wurden 2 µL H_2O/D_2O (9:1, pH 3.0) zur Peptidstammlösung hinzugefügt. Die NMR-Messungen wurden bei einer Temperatur von 285 K durchgeführt, um die Stabilität der Liposomen zu gewährleisten. Die Unterdrückung des Wassersignals der NMR-Spektren erfolgte durch eine *excitation-sculpting*-Pulssequenz[142], der Einstrahlpunkt lag bei den *on-resonance*-Spektren bei -1.0 ppm, bei den *off-resonance*-Spektren lag der Einstrahlpunkt bei 40 ppm.

Durch Subtraktion der *off-resonance*-Spektren von den dazugehörigen *on-resonance*-Spektren wurden die STD-Spektren erhalten. Eine erneute Subtraktion des STD-Spektrums ohne Ligand von den STD-Spektren mit Ligand lieferte die STDD-NMR-Spektren der einzelnen Ligandkonzentrationen. In Abbildung 45 sind die erhaltenen STDD NMR-Spektren dargestellt, mit A: STDD-Spektrum der Liposomen, B: STDD-Spektrum mit 5 mM Peptidlösung, C: STDD-Spektrum mit 10 mM Peptidlösung, D: STDD-Spektrum mit 15 mM Peptidlösung, E: STDD-Spektrum mit 20 mM Peptidlösung und F: STDD-Spektrum mit 36.5 mM

Peptidlösung. Das Signal bei 2.73 ppm zeigt Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und stammt aus dem verwendeten Puffer.

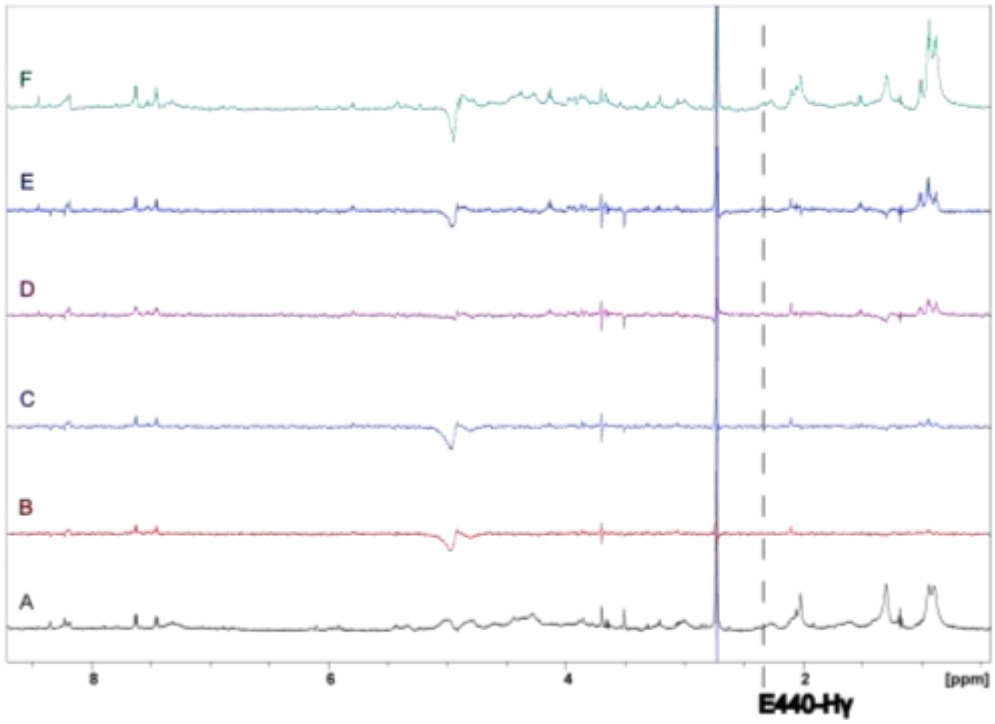


Abbildung 45: NMR-Spektren mit einer *excitation-sculpting*–Pulssequenz von 58 nM Liposomen aus GHOST(3)-Hi5-Zellen und unterschiedlichen Ligandkonzentrationen. A: STDD-Spektrum der Liposomen, B: STDD-Spektrum mit 5 mM Peptidlösung, C: STDD-Spektrum mit 10 mM Peptid, D: STDD-Spektrum mit 15 mM Peptidlösung, E: STDD-Spektrum mit 20 mM Peptidlösung und F: STDD-Spektrum mit 36.5 mM Peptidlösung. Hervorgehoben ist die Spur der Signale des Protons E440-Hγ im aliphatischen Bereich.

Es ist ein deutlicher Anstieg der Signale mit steigender Ligandkonzentration zu verzeichnen. Bei dem STDD-Spektrum der niedrigsten Ligandkonzentration von 5 mM (Abbildung 45B) sind ein Signal im aliphatischen Bereich und Signale amidischer Protonen observierbar, die bedingt durch die Zugabe von 2 µL H_2O/D_2O-Lösung detektiert wurden.

Für das Proton Hγ der Aminosäure E440 konnte eine Bindungskurve aufgestellt werden, in der die STD-Amplifikationsfaktoren als Produkt aus STD-Effekt und Ligandüberschuss gegen die Ligandkonzentrationen aufgetragen wurden. Durch Anpassen des *One-Site-Binding*-Modells an die experimentell bestimmten Datenpunkte konnte eine Dissoziationskonstante von 14 ± 10 mM bestimmt werden (Abbildung 46).

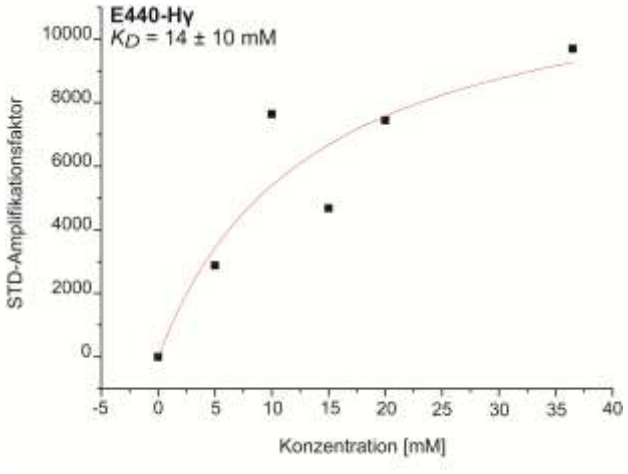


Abbildung 46: Kurve zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Es sind die STD-Amplifikationsfaktoren des E440-Hγ gegen die Ligandkonzentrationen aufgetragen und das *One-Site-Binding*-Modell an die Datenpunkte angepasst.

Der Wert der Dissoziationskonstante liegt im gleichen Größenbereich des Wertes der Dissoziationskonstante von 25 ± 4 mM, der mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Bei dem Vergleich muss in Betracht gezogen werden, dass der Ligand **2** bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Dissoziationskonstante mit einem Fluorophor markiert war, der ebenfalls eine Interaktion zum CCR5-Rezeptor oder anderen Zellfragmenten eingehen kann. Da die K_D-Werte jedoch bei beiden Methoden in derselben Größenordnung liegen, ist davon auszugehen, dass eine eventuelle Wechselwirkung des Fluorophors vernachlässigbar ist.

Neben den Liposomen aus GHOST(3)-Hi5-Zellen wurden auch Liposomen aus Parentalzellen als Negativkontrolle vermessen. Die Liposomen wurden auf gleiche Weise dargestellt, die Zellkonzentration der Suspension betrug $17 \cdot 10^8$ Zellen in 100 µL LUV-EDTA-NMR-Puffer. Zum einen wurden nur die Liposomen vermessen, zum anderen wurden 2 µL einer 15 mM Lösung der Leitstruktur **2** hinzugefügt. In Abbildung 47 sind das STDD-NMR-Spektrum der Liposomen (A) und das STDD-NMR-Spektrum der Liposomen und 15 mM Ligand **2** (B) abgebildet.

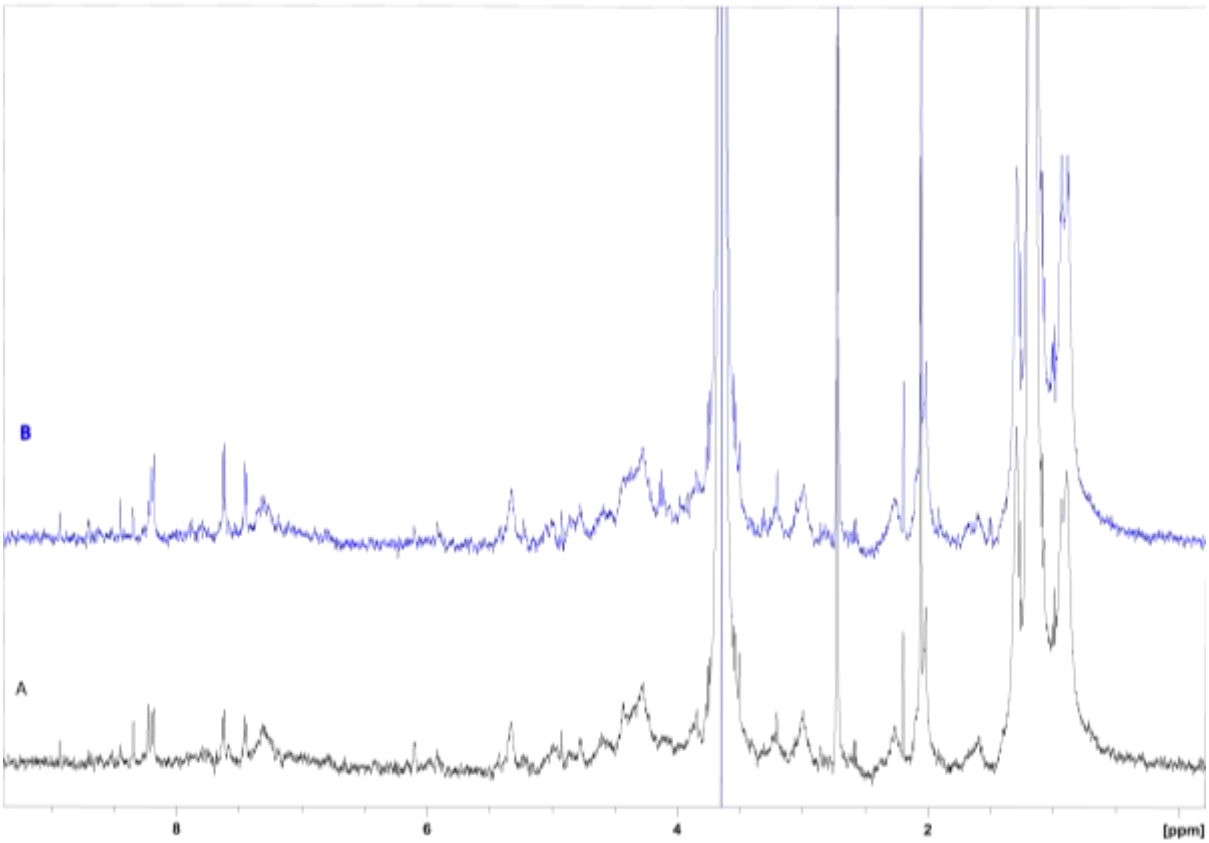


Abbildung 47: NMR-Spektren einer Liposomenlösung aus Parentalzellen. Die Zellkonzentration betrug $17 \cdot 10^8$ Zellen/100 µL LUV-EDTA-NMR-Puffer. Mit A: STDD-NMR-Spektrum der Liposomen und B: STDD-NMR-Spektrum von Liposomen mit 15 mM Peptidlösung.

Aus den Messungen der Liposomen aus Parentalzellen geht hervor, dass im STDD-NMR-Spektrum mit 15 mM Ligandlösung STD-Effekte observiert werden konnten. In Tabelle 4 sind die Daten beider STDD-NMR-Messungen zusammengefasst. Angegeben sind dabei die Zellarten der verwendeten Liposomen mit der gegebenen Ligandkonzentration, der daraus resultierende Ligandüberschuss und den STD-Effekten des Protons E440-Hγ. Es wurden jeweils Suspensionen mit Zellkonzentrationen von $17 \cdot 10^8$ Zellen/100 µL verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der STDD-NMR-Titration. Für die einzelnen Titrationspunkte der Liposomen aus GHOST(3)-Hi5-Zellen sind die Überschüsse an Ligand, bezogen auf eine Konzentration von 56 nM CCR5-Rezeptor, angegeben. Die Liposomen aus Parentalzellen wurden, genauso wie die Liposomen mit CCR5-Rezeptor, mit einer Zellkonzentration von $17 \cdot 10^8$ Zellen/100 µL eingesetzt. Aus den Ligandüberschüssen und den observierten STD-Effekten wurden die STD-Amplifikationsfaktoren (STD_{ampl}) bestimmt, die für das Proton E440-Hγ gelistet sind.

Zellen + Ligandkonzentration	Überschuss (Ligand)	STD-Effekt (E440-Hγ)	STD_{ampl} (E440-Hγ)
GHOST(3)-Hi5 + 5 mM	86870	0.033	2874
GHOST(3)-Hi5 + 10 mM	173730	0.044	7645
GHOST(3)-Hi5 + 15 mM	260600	0.018	4678
GHOST(3)-Hi5 + 20 mM	347460	0.021	7450
GHOST(3)-Hi5 + 36.5 mM	634120	0.015	9700
Parental + 15 mM	/	0.008	/

Aus den Daten geht hervor, dass auch die Liposomen der Parentalzellen eine Interaktion mit der Leitstruktur **2** eingehen, wobei der STD-Effekt der Negativkontrolle des Protons E440-Hγ geringer ist als der Wert der Titration, die im gleichen Größenbereich der Ligandkonzentration liegen. Es erweist sich jedoch als schwierig, die beiden Zellsysteme miteinander zu vergleichen und somit die Parentalzellen als Negativkontrolle für diese Art von Bindungsstudien zu verwenden. Die GHOST(3)-Hi5-Zellen und Parentalzellen leiten sich zwar beide von den humanen Osteosarkomzellen ab, es ist jedoch naheliegend, dass diese Zellen in ihrer Struktur völlig verschieden sind. Da in der Membran der GHOST(3)-Hi5-Zellen ungefähr 40000 CCR5-Rezeptoren, einem Siebenhelixtransmembranrezeptor, vorliegen, liegt die Wahrscheinlichkeit einer strukturellen Veränderung der Zellmembran nahe. Daher ist es gut möglich, dass sich die Liposomen der GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen in den durchgeführten Bindungsstudien unterscheiden und somit die Parentalzellen als Negativkontrolle ungeeignet sind.

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass die durch STDD-NMR-Titration ermittelte Dissoziationskonstante im gleichen Größenbereich liegt wie der Wert, der aus der Durchflusszytometrie hervorging. Leider ist das System der Negativkontrolle unzureichend genau und mit Ungewissheiten bezüglich der Zellstruktur und möglichen unspezifischen Wechselwirkungen behaftet.

4.5 Konformationsanalyse der Leitstruktur 2 mittels NMR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Konformation der Leitstruktur **2** untersucht werden. Durch Aufnahme von EASYROESY[127]-NMR-Aufbaureihen wurden interresiduale Abstände einzelner Protonen bestimmt und durch skalare ^3J-Kopplungen amidischer Protonen die entsprechenden ϕ-Torsionswinkel ermittelt. Durch Aufstellen von Abstands- und Winkelbeschränkungen konnte die Struktur des Peptids bestimmt werden.

4.5.1 Berechnung der Abstände und ϕ-Winkel aus NMR-Spektren

Obwohl das Peptid **2** eine aus nur acht Aminosäuren bestehende Sequenz darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass das Peptid eine definierte Konformation aufweist. Grund hierfür sind die zwei aufeinander folgenden Proline, die für den Abbruch von Helices und Faltblättern in Proteinen verantwortlich sind. Weiterhin können Proline in der *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegen und definieren dadurch die räumliche Anordnung des Peptidrückgrats. Deswegen bieten diese beiden Aminosäuren einen geeigneten Angriffspunkt, die Struktur des Peptids an dieser Stelle zu mimikrieren. Durch Veränderung der Struktur kann dessen Rigidität verstärkt werden, was eine Möglichkeit zur Optimierung eines potentiellen Wirkstoffs darstellt. Um ein geeignetes Mimetikum zu finden, muss zunächst die Konformation des bestehenden Peptids mittels NMR-Spektroskopie ermittelt werden.

Zur Untersuchung der Konformation wurden Aufbaukurven des Overhauser-Effekts vermessen. Aus diesen Aufbaukurven können durch Ermittlung der Kreuzrelaxationsraten interresiduale Protonenabstände berechnet werden. Da es sich bei dem Peptid **2** um ein Octapeptid mit einer Masse von ~900 g/mol handelt, konnten die Aufbaukurven nicht mit 2D-NOESY-Spektren erstellt werden. Der Grund hierfür ist, dass die Korrelationszeit des Peptids bei der gegebenen Spektrometerfrequenz (500 MHz) in dem Bereich liegt, in dem die NOE-Intensitäten einen Nulldurchgang durchlaufen. Daher wurden die Aufbaukurven mittels der Pulssequenz EASYROESY erstellt.[127]

Zunächst wurden bei einer Temperatur von 300 K und einer Spektrometerfrequenz von 500 MHz EASYROESY-Spektren mit verschieden Mischzeiten von 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 1200, 1600 und 2000 ms aufgenommen. Die Unterdrückung des Wassersignals in den EASYROESY NMR-Spektren erfolgte durch eine *excitation-sculpting*-Pulssequenz. Abbildung 48 zeigt EASYROESY-Spektren bei verschiedenen Mischzeiten, wobei Mischzeiten von 50 ms (a), 150 ms (b), 300 ms (c) und 600 ms (d) dargestellt sind. Im Spektrum (a) ist die Mischzeit mit 50 ms zu kurz, es konnten noch keine ROE-Kontakte

gemessen werden. Anschließend ist deutlich ein stetiger Anstieg der ROE-Intensitäten bis zu dem Spektrum mit einer Mischzeit von 300 ms erkennbar. Bei längeren Mischzeiten nehmen die ROE-Intensitäten aufgrund der Eigenrelaxation der Protonen wieder ab.

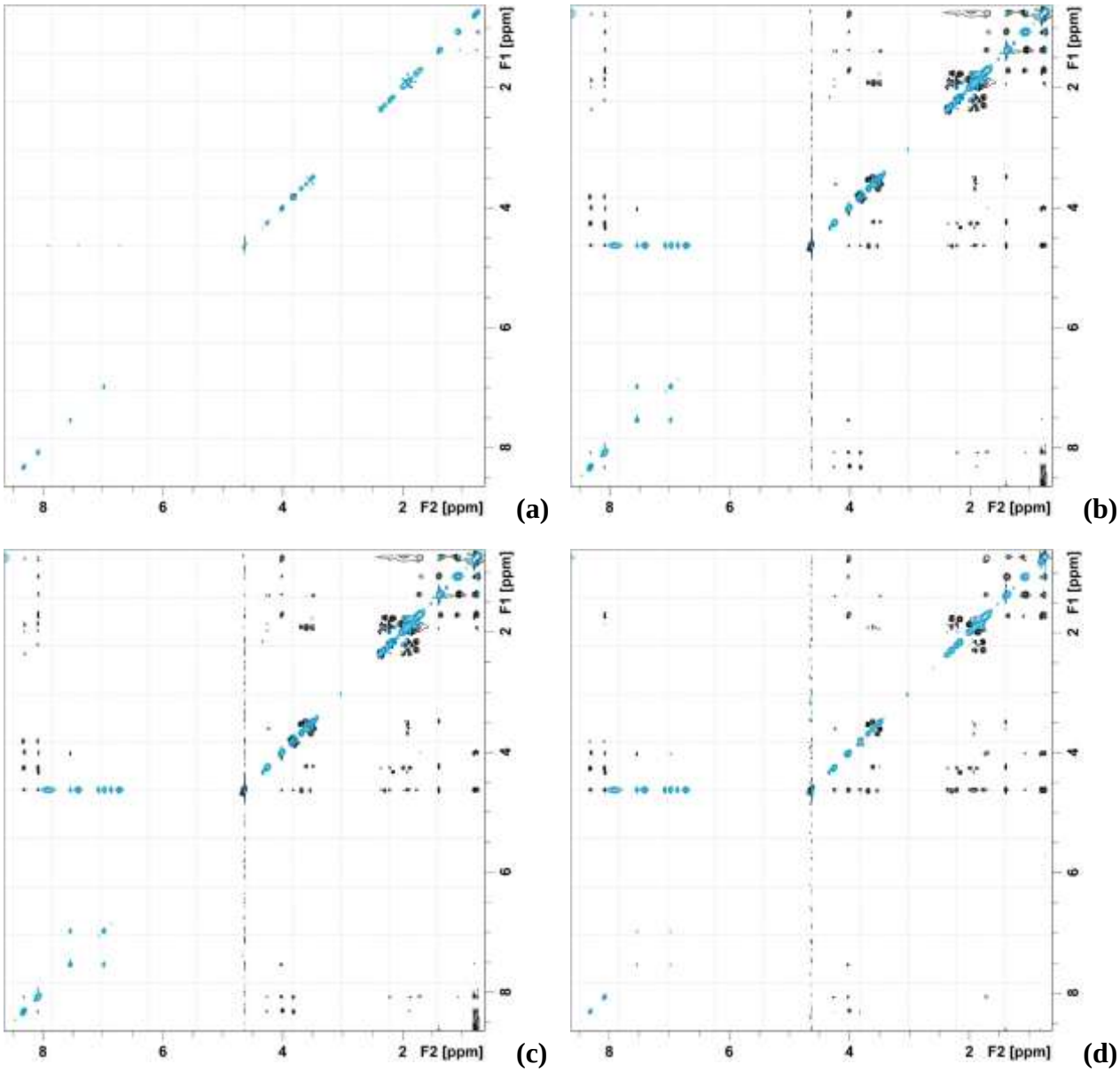


Abbildung 48: EASYROESY-Spektren bei verschieden Mischzeiten von 50 ms (a), 150 ms (b), 300 ms (c) und 600 ms (d). Die Diagonalpeaks sind in blau, die ROE-Kreuzsignale sind schwarz dargestellt. Eine Abhängigkeit der ROE-Intensitäten von den Mischzeiten ist deutlich erkennbar.

Um eine detailliertere Betrachtung der ROE-Kreuzsignale zu ermöglichen, sind in Abbildung 49 die NH-Bereiche bei Mischzeiten von 150 ms (a) und 300 ms (b) aufgeführt. Zu sehen sind jeweils die Spuren der amidischen Protonen der Aminosäuren I439, E440, G441, Q442 und I443 im Bereich von 8.0-8.4 ppm. Auffällig ist eine Verstärkung der ROE-Intensitäten im Spektrum (b). Die intraresidualen Protonen weisen hohe Flexibilitäten

auf, weshalb nur die interresidualen Seitenkettenkontakte und Rückgrat-Kontakte ausgewertet wurden.

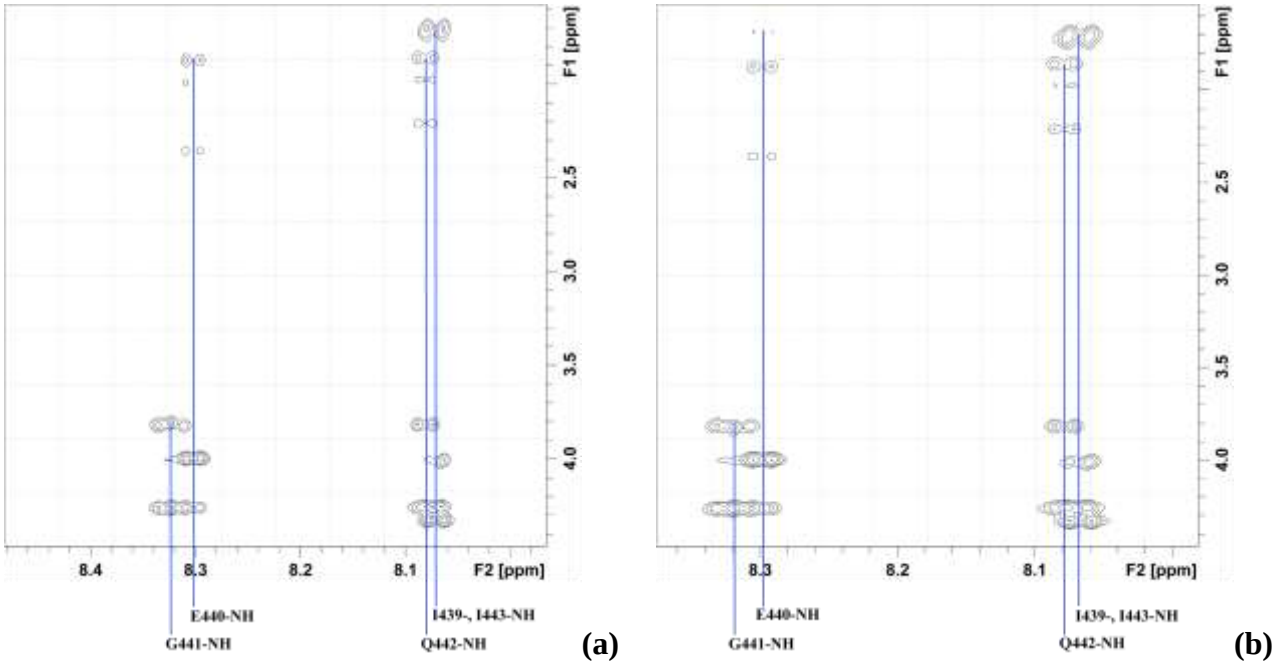


Abbildung 49: NH-Bereiche der EASYROESY-Spektren bei Mischzeiten von 150 ms (a) und 300 ms (b). Zu sehen sind die ROE-Kontakte der NH-Spuren von den Aminosäuren I439, E440, G441, Q442 und I443.

Weiterhin ist in Abbildung 50 der Bereich von 3.5-4.3 ppm der Spektren mit einer Mischzeit von 150 und 300 ms zu sehen, in denen sich die δ-Protonen der Proline befinden. Die blau dargestellten Signale sind die Diagonalpeaks und die Kreuzsignale, die die ROE-Kontakte abbilden, sind in schwarz dargestellt. Peaks mit gemischter Phase (blau und schwarz) besitzen Anteile eines COSY-Transfers, was in Spektren niedriger Mischzeiten auftreten kann. Der COSY-Transfer wird zu höheren Mischzeiten von den ROE-Kontakten überlagert und wurde in der Auswertung außer Acht gelassen. Auch in Abbildung 50 ist ein Anstieg der Intensitäten von 150 ms (a) und 300 ms (b) zu beobachten. In Spektrum (b) übersteigen die ROE-Intensitäten teilweise die COSY-Anteile der Signale deutlich. Nicht gekennzeichnete Diagonalpeaks und gegebenenfalls ihre korrespondierenden ROE-Kontakte wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen und wurden daher in der Abbildung nicht hervorgehoben.

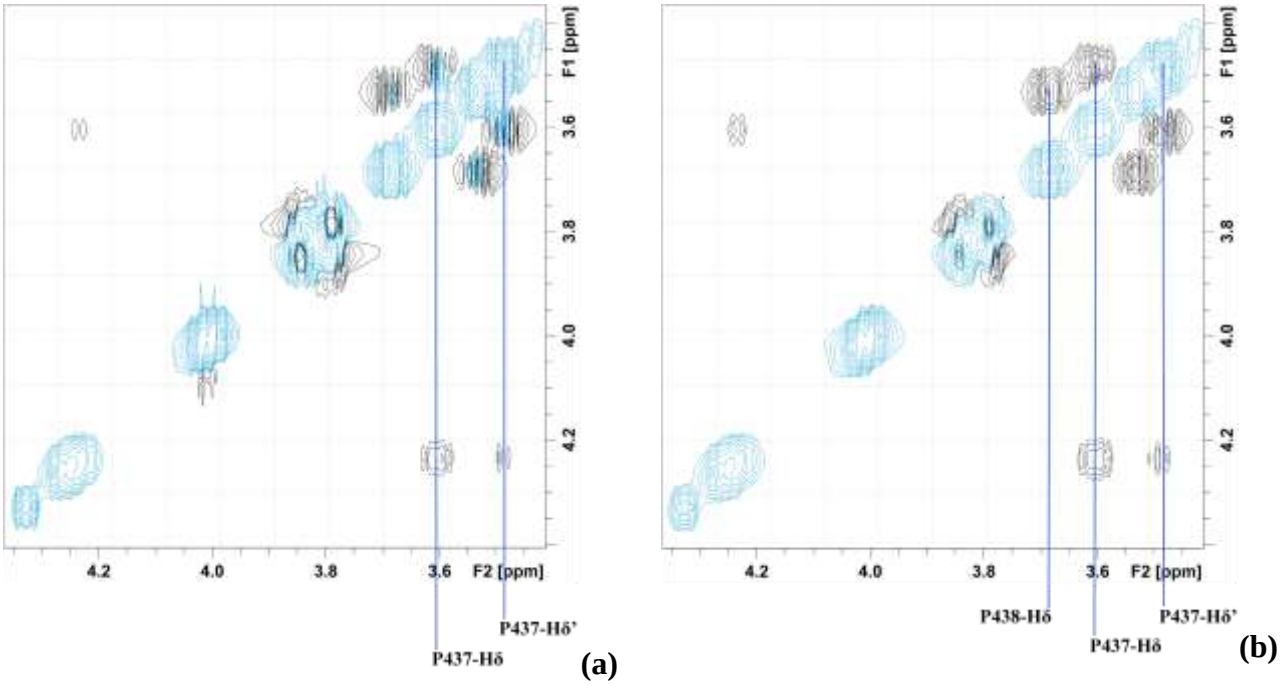
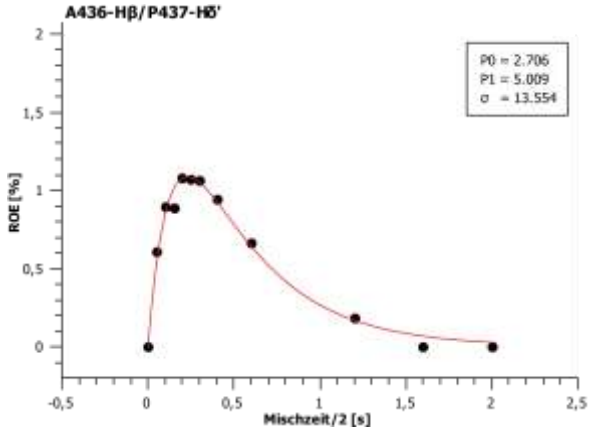


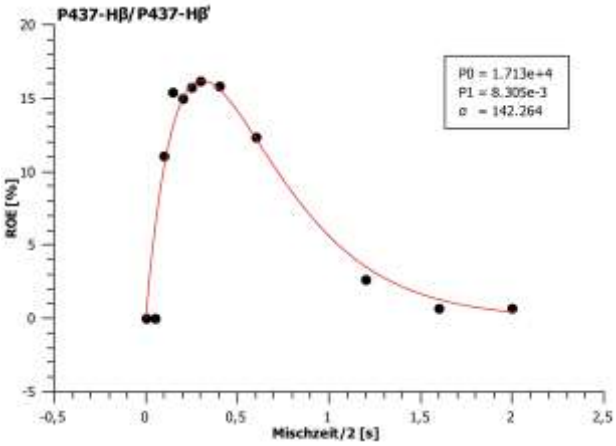
Abbildung 50: Bereich zweier EASYROESY-Spektren der δ-Protonen der Proline. Zu sehen sind zwei Ausschnitte der Spektren mit einer Mischzeit von 150 ms (a) und 300 ms (b). Die blauen Peaks bilden die Diagonalpeaks, die ROE-Kontakte sind in schwarz gefärbt. Hervorgehoben sind die Spuren Hδ und Hδ' des P437 und die Spur des P438-Hδ.

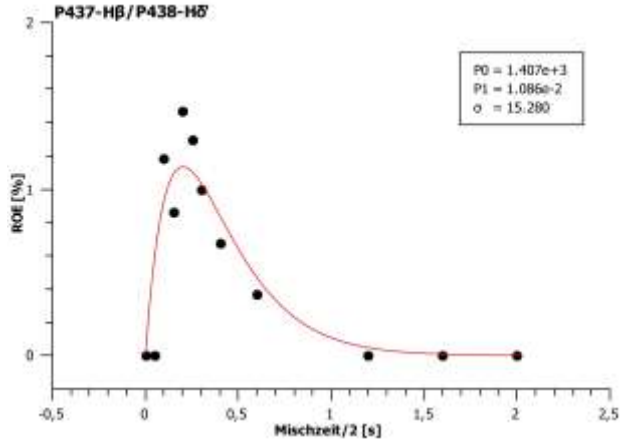
Die interresidualen Protonenabstände wurden mit Hilfe eines Referenzprotonenpaares aus den Aufbaukurven ermittelt. Als Referenzprotonen bieten sich hierbei Protonenpaare an, die keine Flexibilität innerhalb des Peptids aufweisen. Sinnvoll sind daher aromatische vicinale oder geminale Protonen. In der Peptidsequenz **2** liegen jedoch keine aromatischen Aminosäuren vor, weshalb die geminalen β-Protonen des P437 als Referenzpaar gewählt wurden. Bei der Bestimmung der ROE-Aufbaukurven muss die Eigenrelaxation der Protonen herausnormiert werden. Dazu wurde das Integral des Diagonalpeaks vom δ-Proton des P437 bei sehr geringer Mischzeit (50 ms) als Eigenrelaxation definiert und somit als Normierungsfaktor gewählt. Zur Berechnung der Aufbaurate wurde die Summe aus Kreuzsignalen und dazugehörigem Diagonalpeak eines Protons gebildet und der prozentuale Anteil des Kreuzpeaks berechnet und normiert.

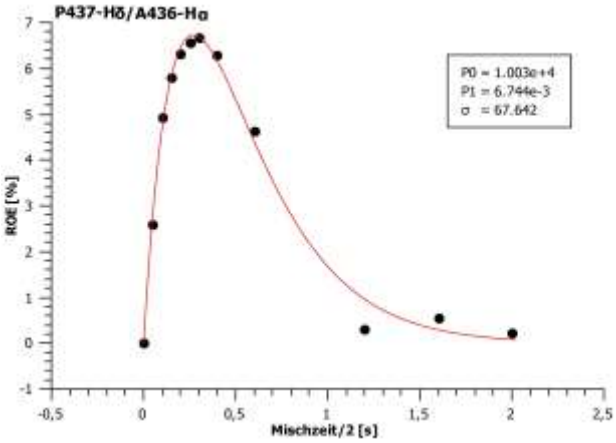
Die verschiedenen ROE-Prozente wurden anschließend gegen die Mischzeit mit Hilfe des Programms QtiPlot aufgetragen. Eine doppelt exponentielle Funktion (Gleichung 7) wurde an die ermittelten Datenpunkte angepasst. Die Anfangssteigungen der Kurven sind proportional zur Kreuzrelaxationsrate der an dem jeweiligen Kreuzsignal beteiligten Protonen. Dies bedeutet, dass das Produkt der erhaltenen Parameter P0 und P1 der Kreuzrelaxationsrate entspricht. In Abbildung 51 sind alle Aufbaukurven der observierten interresidualen

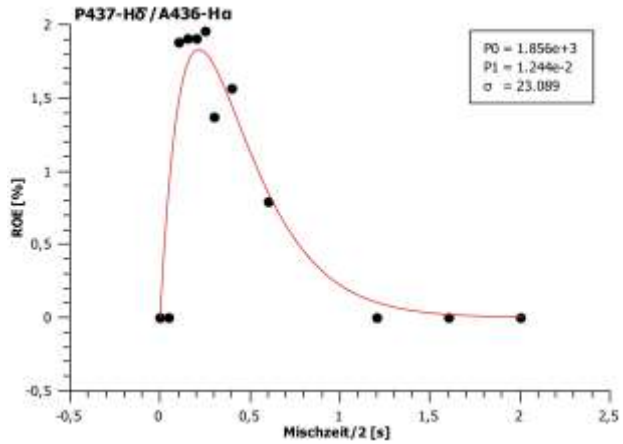
ROE-Kontakte wiedergegeben. Charakteristisch für jede der Kurven ist eine steile Anfangssteigung des Fits, das Erreichen eines Maximums der ROE-Prozente bei etwa 0.4 s und ein etwas flacherer Abfall der Kurven, bis diese letztendlich keine ROE-Prozente mehr aufgrund zu hoher Mischzeiten aufweisen.

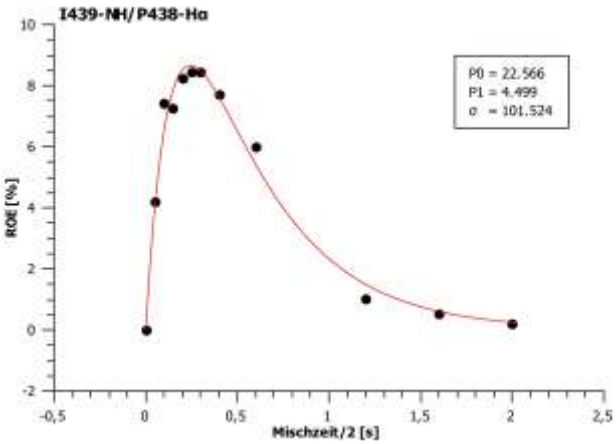












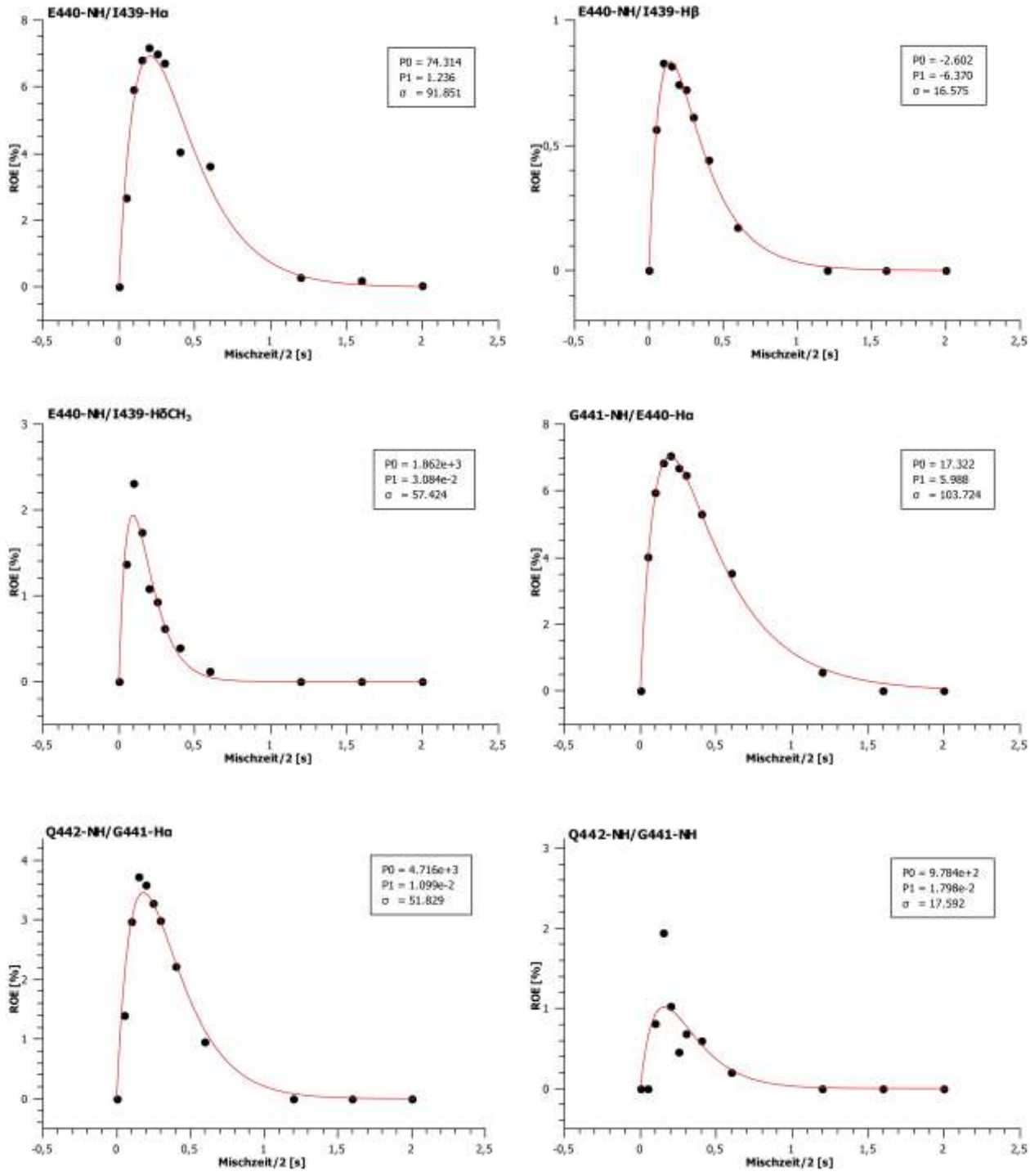


Abbildung 51: Aufbaukurven der ROE-Kontakte. Aufgetragen sind die ROE-Prozente gegen die Mischzeiten [s]. Eine doppelt exponentielle Funktion wurde an die Datenpunkte angepasst. Das Produkt der Parameter P0 und P1 ergibt die Kreuzrelaxationsrate σ_{IS}.

Die Berechnung des Abstandes zweier Protonen aus den Kreuzrelaxationsraten ist in Gleichung 8 wiedergegeben. Wie bereits erwähnt, wurden als Referenzprotonenpaar die β-Protonen des P437 gewählt. Mit Hilfe des Programms SYBYL 8.0 wurde der theoretische Abstand dieser geminalen Protonen vermessen und mit 1.790 Å als Referenzabstand r_{ref}

gesetzt. Durch Anpassen der doppelt exponentiellen Funktion an die Aufbaukurve des Referenzprotonenpaares wurde eine Referenzkreuzrelaxationsrate σ_{ref} von 142.3 ermittelt. Mit diesen Referenzwerten war es anschließend möglich, aus den erhaltenen Kreuzrelaxationsraten σ_{IS} der Aufbaukurven die Abstände r_{IS} der weiteren Protonenpaare zu erhalten (Gleichung 8), die in Tabelle 5 aufgeführt sind.

Tabelle 5: Übersicht der berechneten Kreuzrelaxationsraten σ_{IS} der interresidualen ROE-Kontakte. Der Referenzabstand des Protonenpaares P437-Hβ/P437-Hβ' (fett hervorgehoben) wurde mittels des Programms SYBYL 8.0 bestimmt und daraus die Referenzkreuzrelaxationsrate σ_{ref} berechnet. Aus den Referenzwerten konnten die übrigen Abstände ermittelt werden.

Protonenpaar	σ_{IS}	Abstand [Å]
A436-Hβ/P437-Hδ'	13.55	2.649
P437-Hδ/A436-Hα	67.64	2.026
P437-Hδ'/A436-Hα	23.09	2.424
P437-Hβ/P437-Hβ'	**142.3**	**1.790**
P437-Hβ/P438-Hδ'	15.28	2.596
I439-NH/P438-Hα	101.5	1.894
E440-NH/I439-Hα	91.85	1.925
E440-NH/I439-Hβ	16.58	2.561
E440-NH/I439-HδCH$_3$	57.42	2.082
G441-NH/E440-Hα	103.7	1.887
Q442-NH/G441-NH	17.59	2.536
Q442-NH/G441-Hα	51.83	2.118

Weiterhin ist es mit Hilfe der Karplus-Gleichung (Gleichung 4) möglich, aus dem zugehörigen ^{1}H-NMR-Spektrum die ϕ-Winkel des peptidischen Rückgrats zu ermitteln. Hierzu wurden die ^3J-Kopplungskonstanten zwischen dem amidischen Proton einer Aminosäure und dem dazugehörigen α-Proton bestimmt und mit Gleichung 4 der Winkel berechnet. Für die beiden Proline des Peptids **2** ist es strukturbedingt nicht möglich, den ϕ-Winkel zu bestimmen, da bei dieser Aminosäure kein amidisches Proton vorhanden ist. Weiterhin lagen die Signale der beiden Isoleucine übereinander, weshalb eine separate Zuordnung der Signale nicht ausführbar war.

Die durch die Gleichung bedingt vier möglichen Winkel wurden mit dem Ramachandran-Plot abgeglichen. Einzig die Winkel zwischen -70° und -90° weisen Werte in den Bereichen, in denen sowohl die in der Natur vorkommende α-Helix und das β-Faltblatt liegen, auf. In Tabelle

6 sind die Kopplungskonstanten und daraus resultierenden ϕ-Winkel der Aminosäuren E440, G441 und Q442 zusammengefasst.

Tabelle 6: Kopplungskonstanten der amidischen Protonen und α-Protonen und daraus berechneten ϕ-Winkeln, die im Ramachandran-Plot abgeglichen wurden. Die Winkel der Proline und Isoleucine konnten nicht bestimmt werden.

AS	$^3J_{NH,H\alpha}$ [Hz]	ϕ [deg]
E440	7.0	-81
G441	6.0	-74
Q442	7.4	-84

4.5.2 Beschränkungen und DG-Rechnung

Aus den NMR-spektroskopisch erhaltenen Abständen und Winkeln wurden anschließend die Beschränkungen (*constraints*) für den folgenden *distance geometry* (DG)-Algorithmus aufgestellt, der mit dem Programm CYANA durchgeführt wurde.

Die Abstandsbeschränkungen wurden erstellt, indem Bereiche von ±10%, bezogen auf die berechneten Abstände der Aufbaukurven, definiert wurden (Tabelle 7). Nicht eindeutige geminale Methylenprotonen wurden als Pseudoatom (Q) definiert.

Tabelle 7: Übersicht der ermittelten Abstände aus den Aufbaukurven und den daraus resultierenden Abstandsbeschränkungen. Die Bereiche von oberen und unteren Limits wurden mit ±10% um den berechneten Abstand gesetzt. Nicht direkt zugeordnete Protonen wurden als Pseudoatom (Q) gesetzt.

Protonenpaar	Abstand [Å]	oberes Limit	unteres Limit
A436-Qβ/P437-Qδ	2.649	2.914	2.384
P437-Qδ/A436-Hα	2.225	2.448	2.002
P437-Hβ/P437-Hβ'	1.790	1.969	1.611
P437-Hβ/P438-Qδ	2.596	2.856	2.337
I439-NH/P438-Hα	1.894	2.083	1.704
E440-NH/I439-Hα	1.925	2.118	1.733
E440-NH/I439-Hβ	2.561	2.817	2.305
E440-NH/I439-Qδ	2.082	2.290	1.874
G441-NH/E440-Hα	1.887	2.075	1.698
Q442-NH/G441-NH	2.536	2.790	2.282
Q442-NH/G441-Qα	2.118	2.330	1.906

Weiterhin wurden aus den ermittelten ϕ-Winkeln Diederwinkelbeschränkungen definiert, die Bereiche von ±20% um den ermittelten Torsionswinkel bildeten (Tabelle 8). Für die Aminosäuren, deren Torsionswinkel nicht aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum bestimmt werden konnten, wurden die Winkelbeschränkungen gemäß des Ramachandran-Plots auf 0 - (-180)° gesetzt. Da das verwendete Programm CYANA die Winkel über die Wasserstoffe und nicht über die Schweratome definiert, konnten für die beiden Proline strukturbedingt kein ϕ-Winkel angegeben werden. Anstelle dessen wurden zur Stabilisierung der Prolin-Prolin-Bindung die ψ-Winkel begrenzt, indem von einer helikalen Polyprolin-II-Struktur[143] mit einem ψ-Winkel von 150° ausgegangen wurde.

Tabelle 8: Übersicht der Winkelbeschränkungen der einzelnen Aminosäuren. Die Beschränkungen wurden ±20% um den ermittelten Wert gesetzt. Für Aminosäuren, deren Winkel nicht aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum bestimmt werden konnte, wurde ein Bereich von 0 - (-180)° für den ϕ–Winkel definiert. Um die Prolinbindung zu fixieren, wurde gemäß der Polyprolin-II-Struktur von einem ψ-Winkel von 150° ausgegangen und die gleiche Beschränkung von ±20% festgelegt.

AS	ϕ [deg]	ϕ-Winkel – unteres Limit	ϕ-Winkel – oberes Limit	ψ-Winkel – unteres Limit	ψ-Winkel – oberes Limit
A436	/	-180.0	0	/	/
P437	/	/	/	120	180
P438	/	/	/	120	180
I439	/	-180.0	0	/	/
E440	-80.72	-96.9	-64.6	/	/
G441	-73.59	-88.3	-58.9	/	/
Q442	-83.89	-100.7	-67.1	/	/
I443	/	-180.0	0	/	/

Die Abstand- und Winkelbeschränkungen wurden in das Programm CYANA eingelesen, welches zunächst 500 randomisierte Strukturen generierte. Von diesen 500 Strukturen wurden die 100 besten Strukturen für den REDAC-Algorithmus ausgewählt. Durch die REDAC-Zyklen wurden diese Strukturen iterativ an die vorgegebenen Beschränkungen angepasst. Es wurden vier Zyklen durchlaufen, wobei die ersten beiden Zyklen mit 300 und 600 Rechenschritten Diederwinkelbeschränkungen erzeugten, insofern die lokale Abweichung von den definierten Beschränkungen für die jeweilige Aminosäure nicht größer als 0.8 Å im ersten Schritt und 0.4 Å im zweiten Schritt war. Die beiden darauffolgenden Zyklen umfassten 600 und 1000 Iterationsschritte.

Die berechneten Strukturen werden von CYANA anhand von Zielfunktionswerten bewertet, wobei die eingelesenen Beschränkungen umso besser erfüllt sind, desto kleiner der Wert der Zielfunktion ist. Die Zielfunktion der durchgeführten Rechenzyklen wies bei den besten 50 von 100 Strukturen einen Wert von 0.32 auf (Abbildung 52).

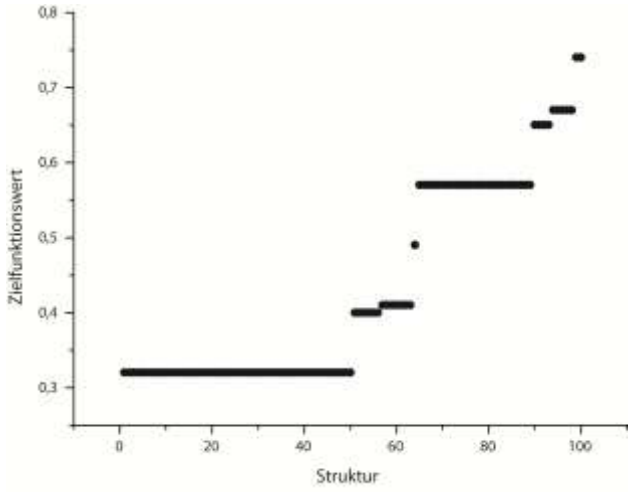


Abbildung 52: Zielfunktionswerte der 100 Strukturen, die in den REDAC-Zyklen den Winkel- und Abstandsbeschränkungen angepasst wurden. Je niedriger der Wert der Zielfunktion, desto besser sind die vorgegebenen Beschränkungen eingehalten.

Bei den durchgeführten Iterationen wurden insgesamt vier Beschränkungen verletzt, die in Tabelle 9 zusammengefasst sind.

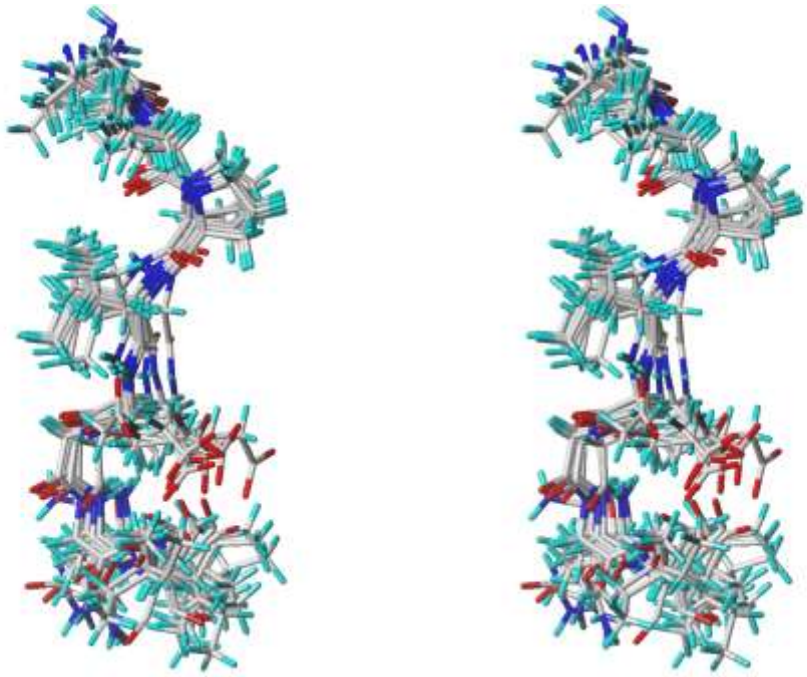
Tabelle 9: Übersicht der Verletzungen der DG-Rechnung. Angegeben sind die verletzten Beschränkungen, deren definierte Werte, die durchschnittliche Abweichung und die Gesamtzahl der Strukturen, in denen die Verletzung auftrat.

Beschränkung	Wert der Beschränkung	durchschnittliche Abweichung	Gesamtanzahl der Verletzung
unterer Abstand, A436-Hβ/P437-Qδ	2.39	0.28	100
unterer Abstand, A436-Qβ/P437-Qδ	2.38	0.21	100
oberer Abstand, E440-NH/I439-Hα	2.11	0.30	100
oberer Abstand, Q442-NH/G441-Qα	2.33	0.20	36

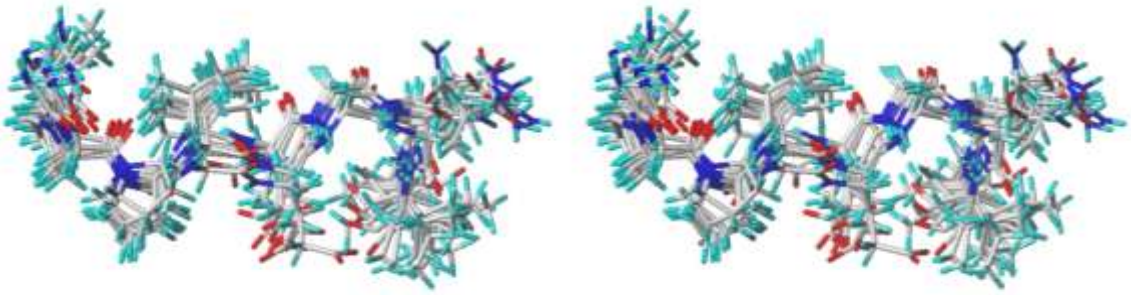
Es wurden nur Abstandsbeschränkungen verletzt, die Winkelbeschränkungen wurden während der REDAC-Zyklen eingehalten. Die durchschnittlichen Abweichungen der vorgegebenen Werte sind jedoch gering. Die Verletzung der Q442-NH/G441-Qα-Beschränkung trat lediglich in den 36 besten Strukturen auf. Die mittlere quadratische Abweichung der Orientierung

einzelner Aminosäuren des Rückgrats lag bei *rmsd* = 0.93 ± 0.26 Å. Dieser Wert zeigt, dass die berechneten Strukturen definierte Konformationen einnahmen.

Die zehn besten Strukturen wurden in das Programm SYBYL 8.0 eingelesen, um eine qualitative Aussage der Konformationen treffen zu können. Aus Abbildung 53 geht hervor, dass das Rückgrat der zehn Strukturen identisch ist. Weiterhin wird deutlich, dass die Prolin-Prolin-Sequenz dem Rückgrat einen helikalen Charakter verleiht, was einen perfekten Ausgangspunkt zur Mimikrierung der Leitstruktur durch Fixierung der Konformation bietet.



(a)



(b)

Abbildung 53: Stereoplots (*crossed-eyes, colored by atomtype*) der zehn besten Strukturen der Leitstruktur 2 nach der DG-Rechnung. In (a) ist der N-Terminus oben und der C-Terminus unten. In (b) liegt der N-Terminus links.

Weiterhin wurde mit dem Programm CYANA berechnet, wie hoch der prozentuale Anteil der 100 Strukturen in den verschiedenen Regionen des Ramachandran-Plots (Abbildung 54) ist.

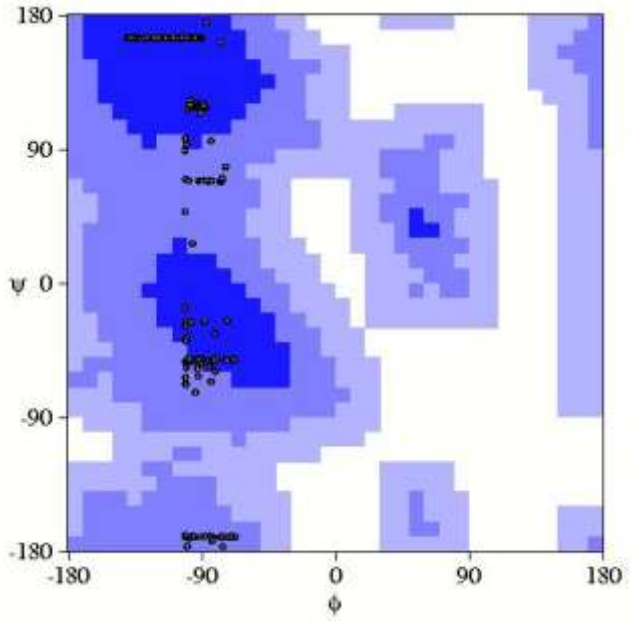


Abbildung 54: Darstellung des Ramachandran-Plots der 100 berechneten Strukturen. 75% der Strukturen liegen in den begünstigtsten Regionen (dunkelblau), die restlichen 25% der Strukturen liegen in zusätzlich erlaubten Regionen (blau). Keine Struktur befindet sich in nichterlaubten Regionen (weiß).

75% der Strukturen befinden sich nach der DG-Rechnung in der begünstigtsten Region (dunkelblau), die restlichen 25% liegen in den sogenannten zusätzlich erlaubten Regionen (blau) während sich keine Struktur in nichterlaubten Regionen (weiß) befindet.

4.6 Homologie der C4-Region

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden handelt es sich um Sequenzen der konservierten C4-Region des gp120. Es wurde bei dieser Homologiestudie herausgefunden, inwieweit die betreffenden Aminosäuren konserviert sind und im Fall einer Varianz die Unterschiede der Polaritäten der Seitengruppen spezifiziert.

Bei dem untersuchten Bereich handelt es sich um die Sequenz ^{434}MYAPPIEGQIEG^{445} des gp120.[27] Um die Homologie der Sequenz zu ermitteln, wurde ein *Alignment* von 105452 Sequenzen der Familie gp120 (PF00516) aus der Pfam-Datenbank[144] des *Wellcome-Trust-Sanger-Institute* durchgeführt, wobei einzig Sequenzen berücksichtigt wurden, die eindeutig aus proteinogenen Aminosäuren bestehen. In Tabelle 10 sind die relativen, prozentualen Anteile der Aminosäuren der Sequenz 434-445 des gp120 angegeben, die aus den absoluten Werten der Homologie dieser Sequenz (Tabelle 19) berechnet wurden.

Tabelle 10: Übersicht der relativen Homologie der Sequenz 434-445 des gp120. In fett sind in den Spalten die Aminosäuren angegeben, von denen in dieser Arbeit ausgegangen wurde. Die Anteile der Aminosäuren sind in Prozent [%] angegeben, die Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan sind nicht angeführt, da sie in der untersuchten Sequenz nicht auftreten. Hervorgehoben sind in fett die Prozente, die für ein konserviertes Vorhandensein der Aminosäure stehen.

	A	**R**	**N**	**D**	**C**	**E**	**Q**	**G**	**H**	**I**	**L**	**K**	**M**	**P**	**S**	**T**	**Y**	**V**
M434										8.2			**85.6**			1.1		4.6
Y435																	**99.4**	
A436	**94.8**										4.3							
P437														**98.5**				
P438														**99.8**				
I439		4.8								**93.1**								
E440	12.2	32.1				15.3	8.6					13.2		2.7	13.1			
G441								**99.5**										
Q442		2.6	14.6	3.8		3.6	40.5		1.4	5.9	7.8	4.1		3.9	2.0			7.1
I443										**93.5**	5.7							
E444		43.7	12.1			1.1	2.3					11.3			8.2	19.1		
G445					**99.7**													

Deutlich zu erkennen ist, dass die Aminosäuren Y435, A436, P437, P438, I439, G441, I443 und C445 jeweils mit einer Häufigkeit von über 90% hochkonserviert sind. Auch die Position

434 ist mit einem Anteil an Methionin von über 80% nicht sehr variabel. Einzig die Positionen 440, 442 und 444 sind variabel. An Position 440, bei der in dieser Arbeit von einer Glutaminsäure ausgegangen wird, ist Glutaminsäure zwar die zweithäufigste Aminosäure, jedoch nur mit 15%. Den Hauptanteil macht das basische Arginin mit über 30% aus. Lysin, ebenfalls eine basischen Seitenkette aufweisend, macht einen Anteil von 13% aus. Dies hat zur Folge, dass an der Position 440 neben der Glutaminsäure hauptsächlich von Aminosäuren mit basischem Seitenkettencharakter auszugehen ist. Ausgehend von der These von Rosen *et al.*[45], in der R5-Isolate bei der AS440 eine positive Seitenkette aufweisen, besteht ein Großteil der untersuchten Datenbank aus R5-Isolaten. Rosen *et al.* fanden heraus, dass die Ladung der AS440 des gp120 wichtig zur stabilisierenden ionischen Wechselwirkung mit der AS322 (V3-*loop*) ist. In den in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnte eine deutliche Bindung der Liganden zum CCR5-Rezeptor verzeichnet werden, obwohl in der Leitstruktur **2** an der Position 440 eine polare, neutrale Seitenkette vertreten war. Daher kann davon ausgegangen werden, dass an dieser Position ebenfalls eine polare, ungeladene Aminosäure eine antagonistische Wirkung auf den CCR5-Rezeptor ausübt. An Position 442, bei der in dieser Arbeit von Glutamin ausgegangen wurde, ist diese Aminosäure auch in der Rangliste mit über 40%, gefolgt von Asparagin mit 14%, am höchsten platziert. Weiterhin können an dieser Position fast alle anderen Aminosäuren auftreten, unabhängig von den Polaritäten der Seitenketten. Da aber Glutamin und Asparagin einen Anteil von über 50% ausmachen, kann davon ausgegangen werden, dass an der Position 442 des gp120 eine Aminosäure mit polarem Seitenkettencharakter vorliegt. Auch die Position 444 geht aus dem vorgenommenen *Alignment* als variabel hervor. Den Hauptanteil an dieser Position bezieht Arginin mit über 40%. Threonin, Asparagin und Lysin bestreiten ebenfalls eine beachtliche Frequenz von jeweils 10 - 20%. Eine starke Abweichung zur in dieser Arbeit behandelten Sequenz weist die Position 445 auf. Anstelle des Glycins geht aus diesem *Alignment* hervor, dass an dieser Position ein Cystein hochkonserviert mit fast 100% zu finden ist.

Zur veranschaulichenden Übersicht wurde neben dem tabellarischen *Alignment* ein Sequenzlogo aus 10000 Sequenzen entworfen (Abbildung 55).[145] Die Größe der Buchstaben spiegelt hierbei die Häufigkeit der Aminosäure an der jeweiligen Position wieder, die Farben geben Auskunft über die Polaritäten der Seitenketten (mit schwarz: unpolar, grün: polar, blau: basisch, rot: azid und mangenta: Säureamid).

Abbildung 55: Sequenzlogo der Positionen 434-445 des gp120. Je größer der Buchstabe, desto höher ist der Anteil der Aminosäure an der Position. Die Farben geben Auskunft über die Polarität der Seitenkette; mit schwarz: unpolar, grün: polar, blau: basisch, rot: azid und mangenta: polar (Säureamid).

Auch aus Abbildung 55 wird ersichtlich, dass die meisten Aminosäuren in der untersuchten Sequenz der C4-Region konserviert sind. Die Positionen 440, 442 und 444 sind hochvariabel und haben keine eindeutigen Tendenzen in Bezug der Polaritäten der Seitenketten.
Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die Mehrheit der untersuchten Aminosäuren des gp120 konserviert vorliegt. Daher ist davon auszugehen, dass das Peptid **2** aufgrund der geringen Mutationsrate dieser Sequenz eine geeignete Leitstruktur zur Inhibition des CCR5-Corezeptors bietet. Es soll jedoch mittels MD-Simulationen untersucht werden, inwieweit die hochvariable Position 440 einen Einfluss auf die Affinität ausübt.

4.7 *Molecular Dynamics*-Simulation

4.7.1 MD-Simulationen der Sequenz 436-443 des gp120 mit dem CCR5-Rezeptor

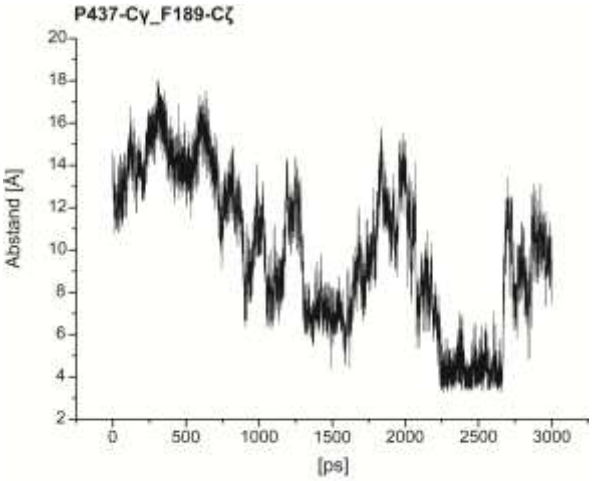
Anhand der MD-Simulationen der Peptide ^{436}APPIEGQI^{443} und ^{436}APPIQGQI^{443} mit dem CCR5-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass das PPI-Motiv *in-silico* eine tragende Rolle bei der Interaktion zum Rezeptor spielt. Weiterhin wurde durch die Mutation an der Position 440 herausgefunden, dass weder Glutamin noch Glutaminsäure mit dem Protein wechselwirkt.

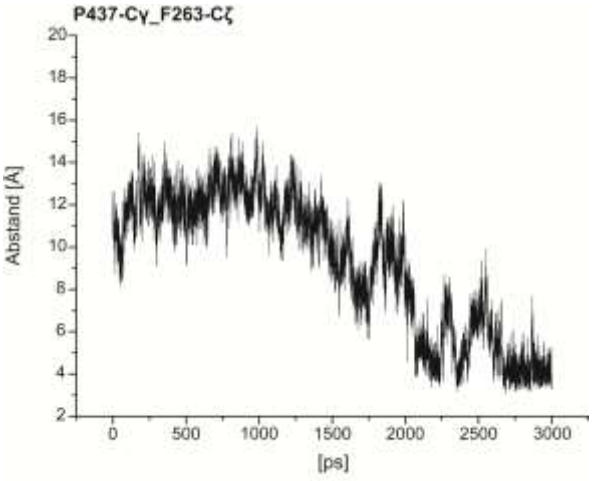
Die *Molecular Dynamics* (MD)-Simulationen wurden mit dem Programm Desmond (Schrödinger, D.E. Shaw Research) durchgeführt. Als Startstruktur wurde ein Homologiemodell[58] des Komplexes, bestehend aus dem viralen gp120, dem CD4-Rezeptor, dem CCR5-Corezeptor und der humanen Lipiddoppelschicht gewählt. Die Zellmembran und der CD4-Rezeptor sowie die Aminosäuren des gp120, die nicht zur Sequenz der Leitstruktur gehören, wurden aus dem Modell entfernt. Zum einen wurde die Sequenz ^{436}APPIEGQI^{443} analysiert. Zum anderen wurde mit der Mutante ^{436}APPIQGQI^{443} eine *Molecular Dynamics*-Simulation durchgeführt, da die durchgeführte Homologiestudie zeigte, dass die Aminosäure Glutamin an der Position 440 stark vertreten ist. Damit sollte *in-silico* untersucht werden, wie einflussreich der Seitenkettencharakter der Position 440 zur Interaktion zum CCR5-Rezeptor ist. Der C-Terminus beider Sequenzen wurde als Säureamid definiert, da das synthetisch hergestellte Peptid **2** diese funktionelle Gruppe am C-Terminus trug. Zunächst wurde vor jeder Rechnung eine *waterbox* mit orthorhombischen *boundary conditions* mit einem SPC-Lösungsmittelmodell aufgestellt. Anschließend wurde jeweils eine MD-Simulation über 3000 ps bei 300 K und einem NVT-Ensemble durchgeführt.

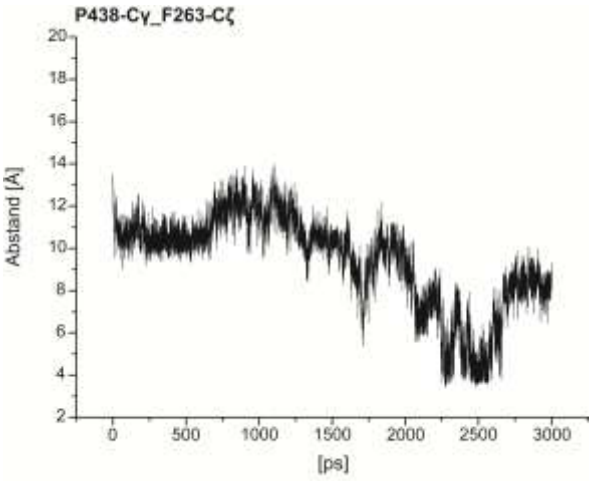
Beide MD-Simulationen wurden qualitativ mit Hilfe der *Simulation Quality Analysis* bewertet (9.3 *Molecular Dynamics*-Simulation – *Simulation Quality Analysis*). Die Gesamtenergie des Komplexes aus CCR5, Wasser und Peptid ^{436}APPIEGQI^{443} betrug -118985.0 kcal/mol (Tabelle 20), die Gesamtenergie des Komplexes mit dem Peptid ^{436}APPIQGQI^{443} hingegen betrug -119213.4 kcal/mol (Tabelle 21). Bei beiden Simulationen steigt der Betrag der Gesamtenergien stetig, die potentiellen Energien beider Systeme gehen nach einem anfänglichen Abstieg bis zu einer Simulationszeit von 700 ps in einen Gleichgewichtszustand über (Abbildung 66, Abbildung 67).

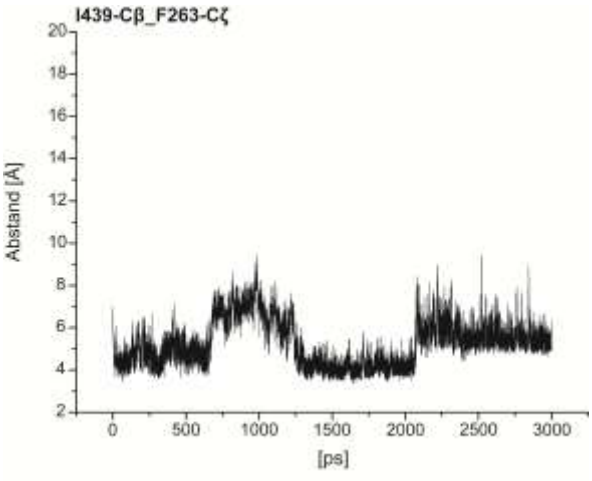
Mit Hilfe der *Simulation Event Analysis* wurden anschließend die Entfernung von Schweratomen über die gesamten Simulationen berechnet, um Interaktionen zu interpretieren. Dabei wurde angenommen, dass bei einem Abstand unter 4.5 Å zwischen Schweratom von Ligand und Rezeptor eine hydrophobe Interaktion vorliegen kann und der Maximalabstand zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung 3.2 Å beträgt.[137]

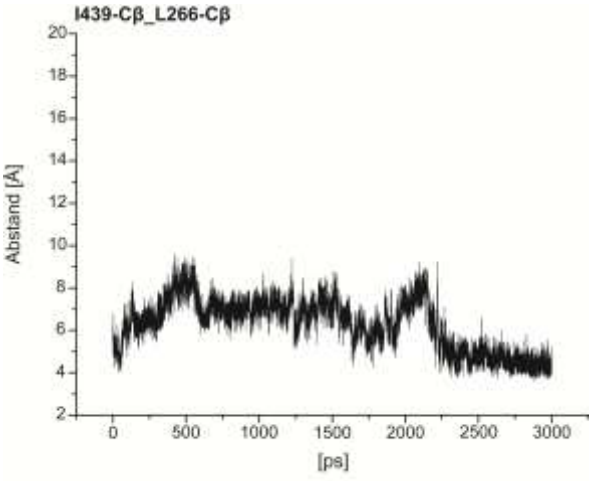
In Abbildung 56 sind die Abstände der Schweratome zwischen Peptid ^{436}APPIEGQI^{443} und CCR5 gegen die Zeit der MD-Simulation aufgetragen. Aus den Graphen geht hervor, dass das Peptid bei Simulationszeiten von 2200 bis 2500 ps günstige Konformationen aufweist, die Wechselwirkungen mit dem Rezeptor zulassen. Alle Aminosäuren bilden hydrophobe Wechselwirkungen zu den Aminosäuren F189, F263 und L266 des CCR5-Rezeptors aus. Die Aminosäure Q440 bildet lediglich in den ersten 500 ps der MD-Simulation eine Wasserstoffbrückenbindung zur Aminosäure Q168 aus, während sich das System noch nicht im Gleichgewicht befindet. Im Gegensatz dazu bildet die Aminosäure Q442 Wasserstoffbrückenbindungen zu den Sulfaten der sulfatierten Tyrosine 3Y und 10Y und zur Aminosäure N268. Bei den Abstandsmessungen der Sulfate der Tyrosine wurde aufgrund der Rotation der Sauerstoffe der Schwefel als Schweratom gewählt.

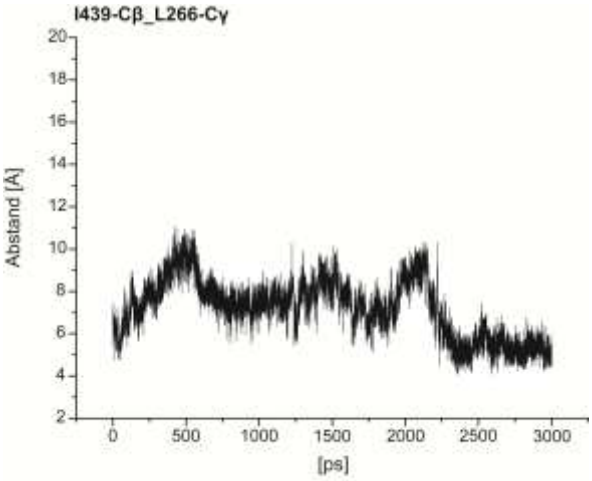

P437-Cγ_F189-Cζ
Abstand [Å]
[ps]


P437-Cγ_F263-Cζ
Abstand [Å]
[ps]


P438-Cγ_F263-Cζ
Abstand [Å]
[ps]


I439-Cβ_F263-Cζ
Abstand [Å]
[ps]


I439-Cβ_L266-Cβ
Abstand [Å]
[ps]


I439-Cβ_L266-Cγ
Abstand [Å]
[ps]

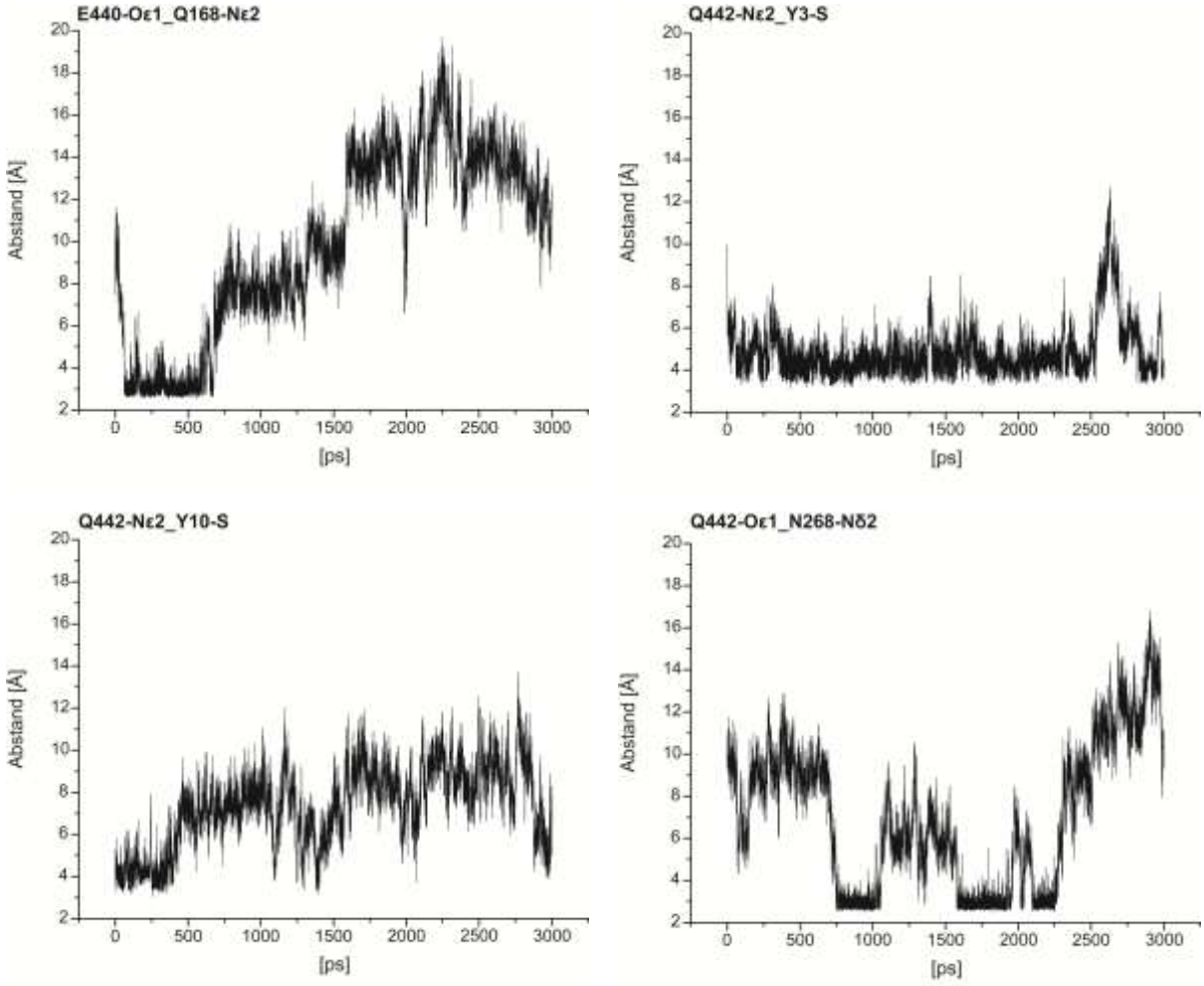


Abbildung 56: Abstandsmessungen der MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443} mit dem CCR5-Rezeptor. Es sind die gemessenen Abstände der Schweratome gegen die Zeit der MD-Simulation aufgetragen. Die erste Aminosäure der jeweiligen Graphenüberschrift bezieht sich auf das Peptid, die zweite Aminosäure stammt von dem Rezeptor. Bei den Sulfaten der Tyrosine wurde auf Grund der Rotation der Sauerstoffe der Schwefel als Schweratom gewählt.

In Abbildung 57 sind die Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäure 442Q mit den sulfatierten Tyrosinen Y3 und Y10 und die Wasserstoffbrückenbindung zum Asparagin N268 bei einer Simulationszeit von 2120 ps dargestellt. Die Wechselwirkung zum Y10 ist schwach, es muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Schwefel als Schweratom gewählt wurde und daher der Abstand zum Sulfatsauerstoff etwas geringer ist.

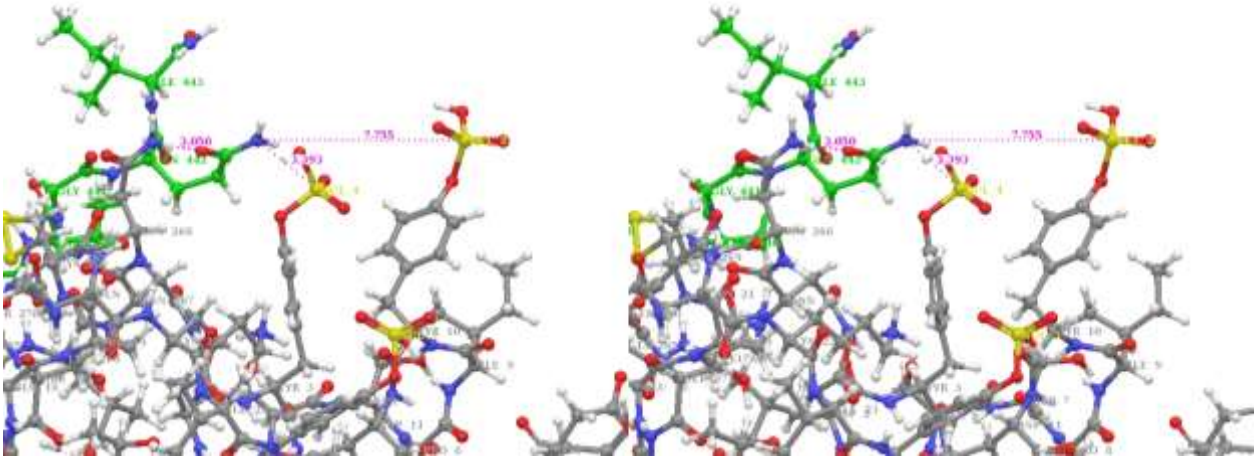
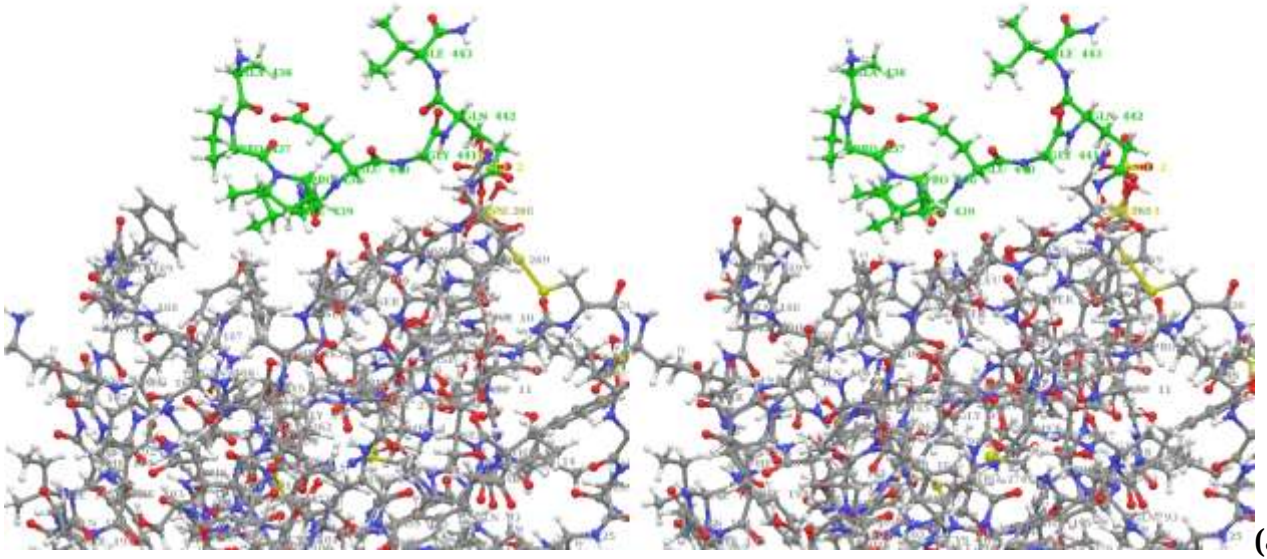
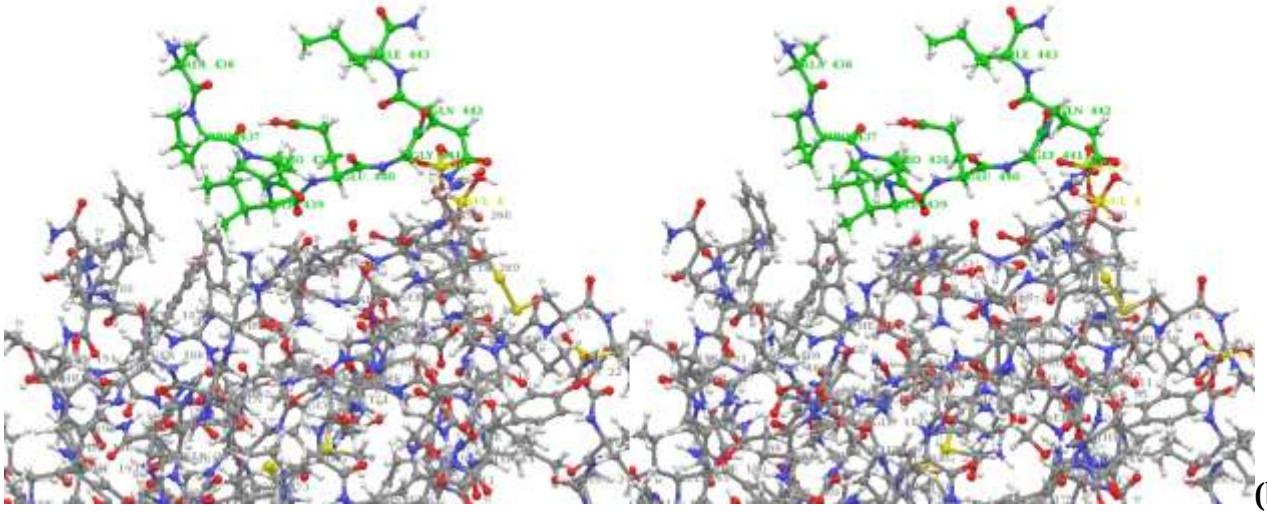


Abbildung 57: Stereoplot (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) des Komplexes von CCR5-Rezeptor und Ligand ^{436}APPIEGQI^{443}. Die Aminosäure Q442 bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Y3, Y10 und N268.

Wie schon aus Abbildung 57 ersichtlich, ragt die Aminosäure I443 vom Rezeptor weg. Neben dieser Aminosäure bilden auch A436 und E440 keine Interaktionen zum CCR5-Rezeptor bei unterschiedlichen Simulationszeiten aus (Abbildung 58 a, b).



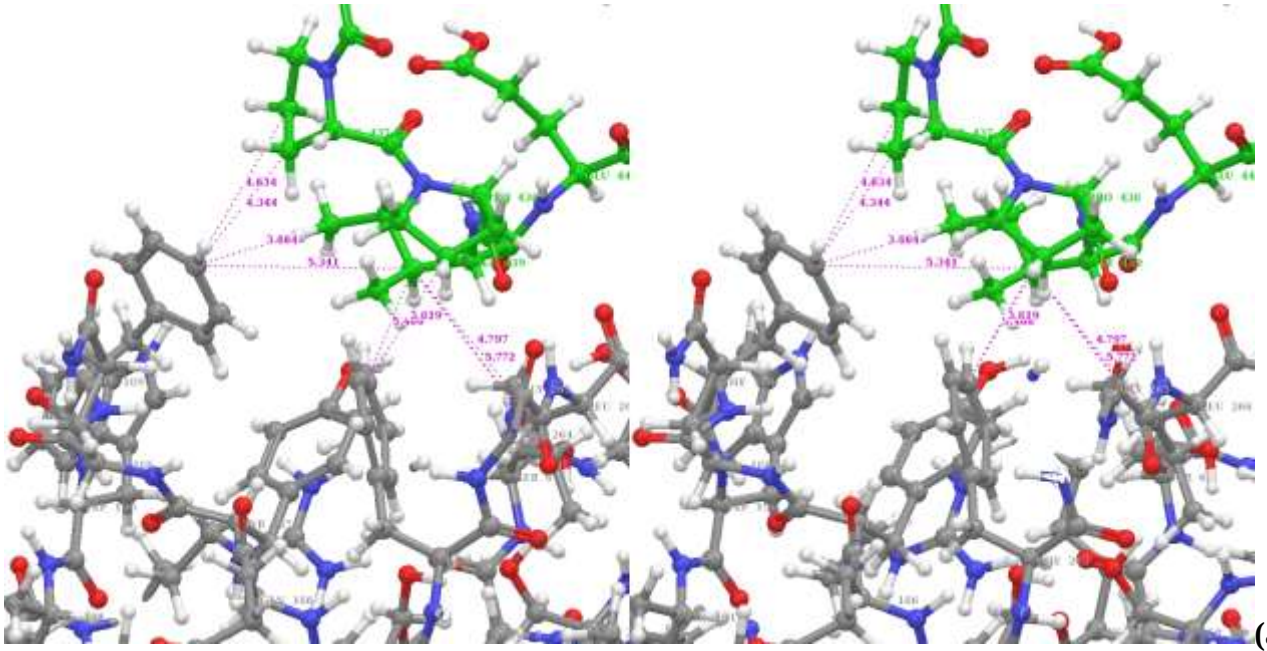
(a)



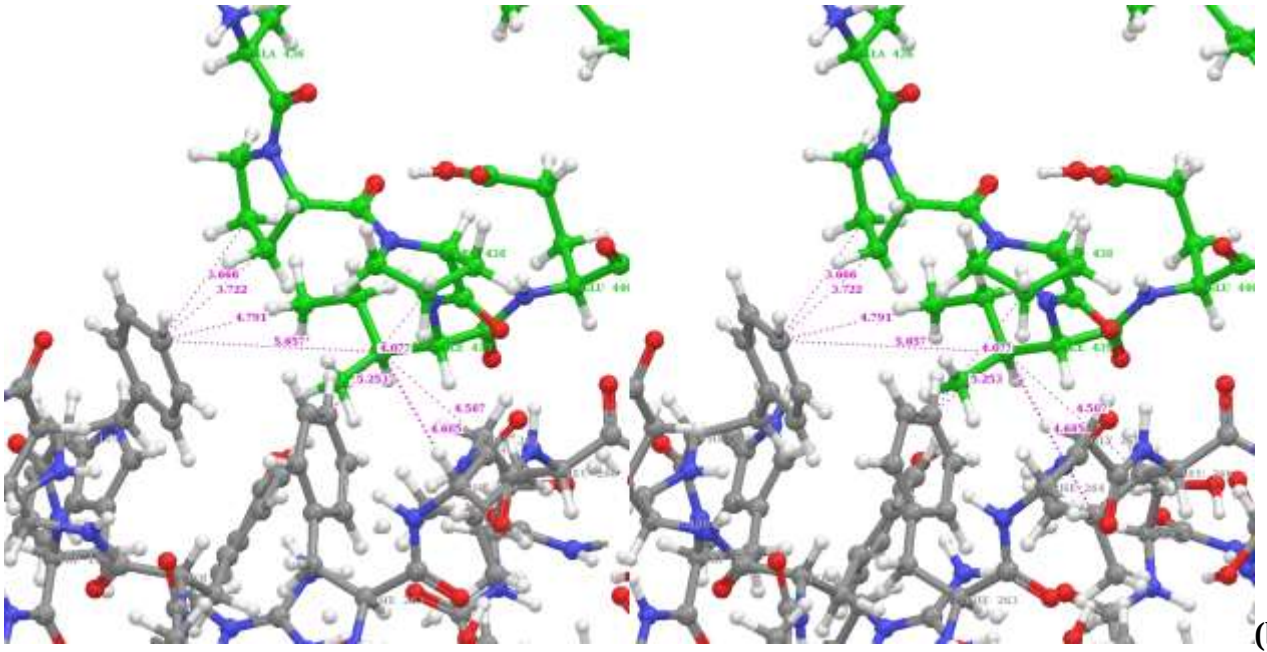
(b)

Abbildung 58: Stereoplot (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) des Komplexes von CCR5-Rezeptor und Ligand ^{436}APPIEGQI^{443} bei Simulationszeiten von a: 2300 ps und b: 2430 ps. Die Aminosäuren A436, E440 und I443 wechselwirken nicht mit dem CCR5-Rezeptor.

In Gegensatz dazu steht das PPI-Motiv der Leitstruktur, dass hydrophobe Wechselwirkungen zum Rezeptor ausbildet (Abbildung 59 , b). Die Konformationen des Peptids bei den Simulationszeiten von 2300 ps und 2430 ps sind nahezu identisch. Die Aminosäure P437 interagiert mit dem Phenylalanin F198 ebenso wie das Isoleucin I439, welches auch hydrophobe Wechselwirkungen mit F263 und L266 eingeht. Die Aminosäure P438 interagiert vorrangig mit dem Phenylalanin F263.



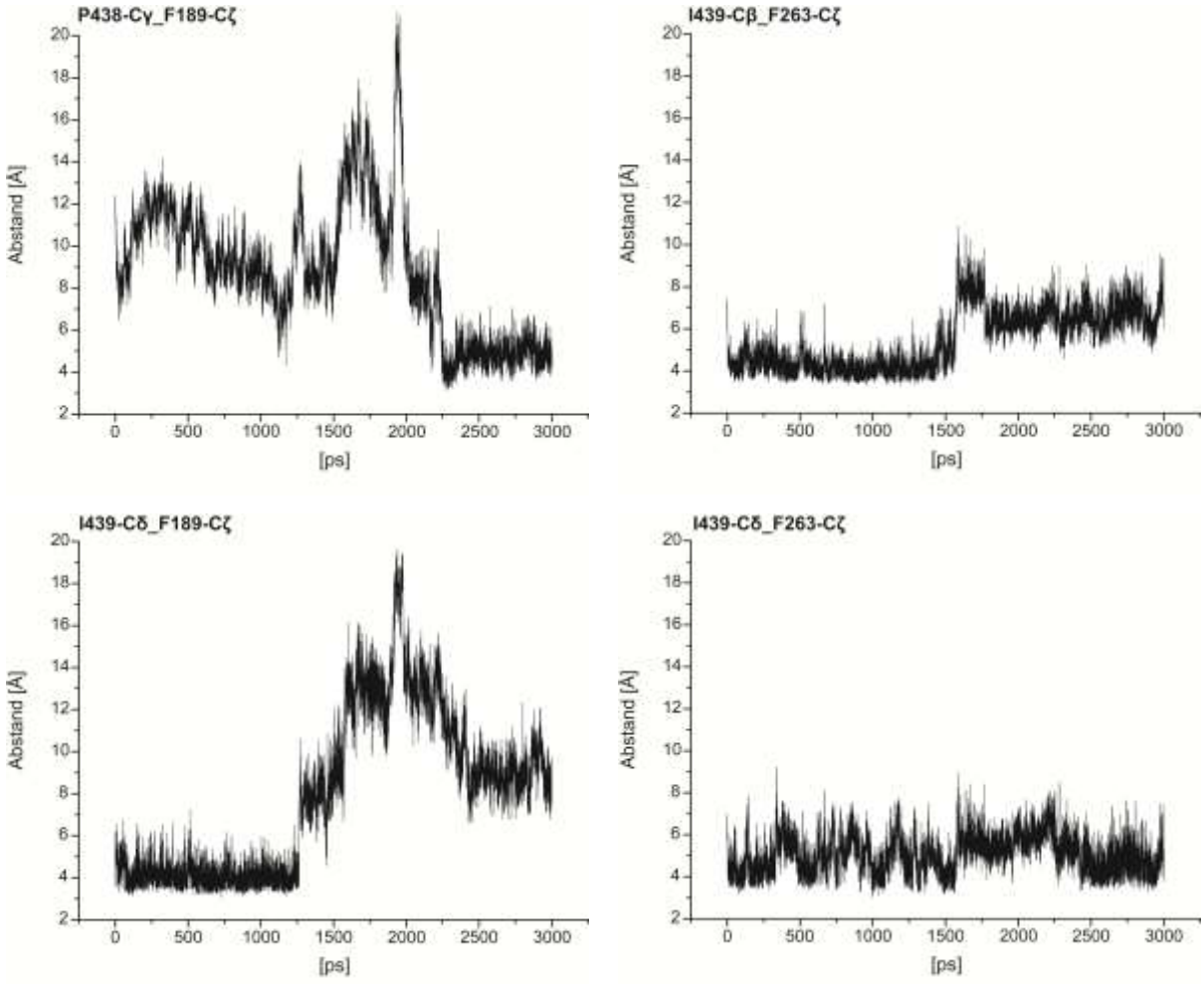
(a)



(b)

Abbildung 59: Stereoplots (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) des Komplexes der Leitstruktur 2 mit dem CCR5-Rezeptor bei verschiedenen Simulationszeiten (a: 2300 ps, b: 2430 ps). Die Aminosäuren P437, P438 und I439 des Peptids weisen hydrophobe Wechselwirkungen zu den Aminosäuren F198, F263 und L266 des Rezeptors auf.

Neben der MD-Simulation mit der Leitstruktur **2** und dem CCR5-Rezeptor wurde auch eine MD-Simulation mit dem Peptid ^{436}APPIQGQI^{443} durchgeführt. Damit sollte gezeigt werden, welchen Einfluss die variable Position 440 des gp120 auf die Bindung zum CCR5-Rezeptor hat. In Abbildung 60 sind die Abstände der Schweratome, die Wechselwirkungen aufweisen, gegen den zeitlichen Verlauf dieser MD-Simulation aufgetragen. Aus dieser MD-Simulation wird ersichtlich, dass die Konformere bis zu einer Zeit von etwa 1200 ps die meisten Interaktionen mit dem Rezeptor eingehen. Die Aminosäuren P438, I439 und I443 weisen hydrophobe Wechselwirkung mit den Aminosäuren F189, F263 und L266 auf. Die Aminosäure Q440 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminosäure N267 des CCR5-Rezeptors und die Aminosäure Q442 und der C-Terminus zeigen nur leichte Wechselwirkungen mit dem Rezeptor.



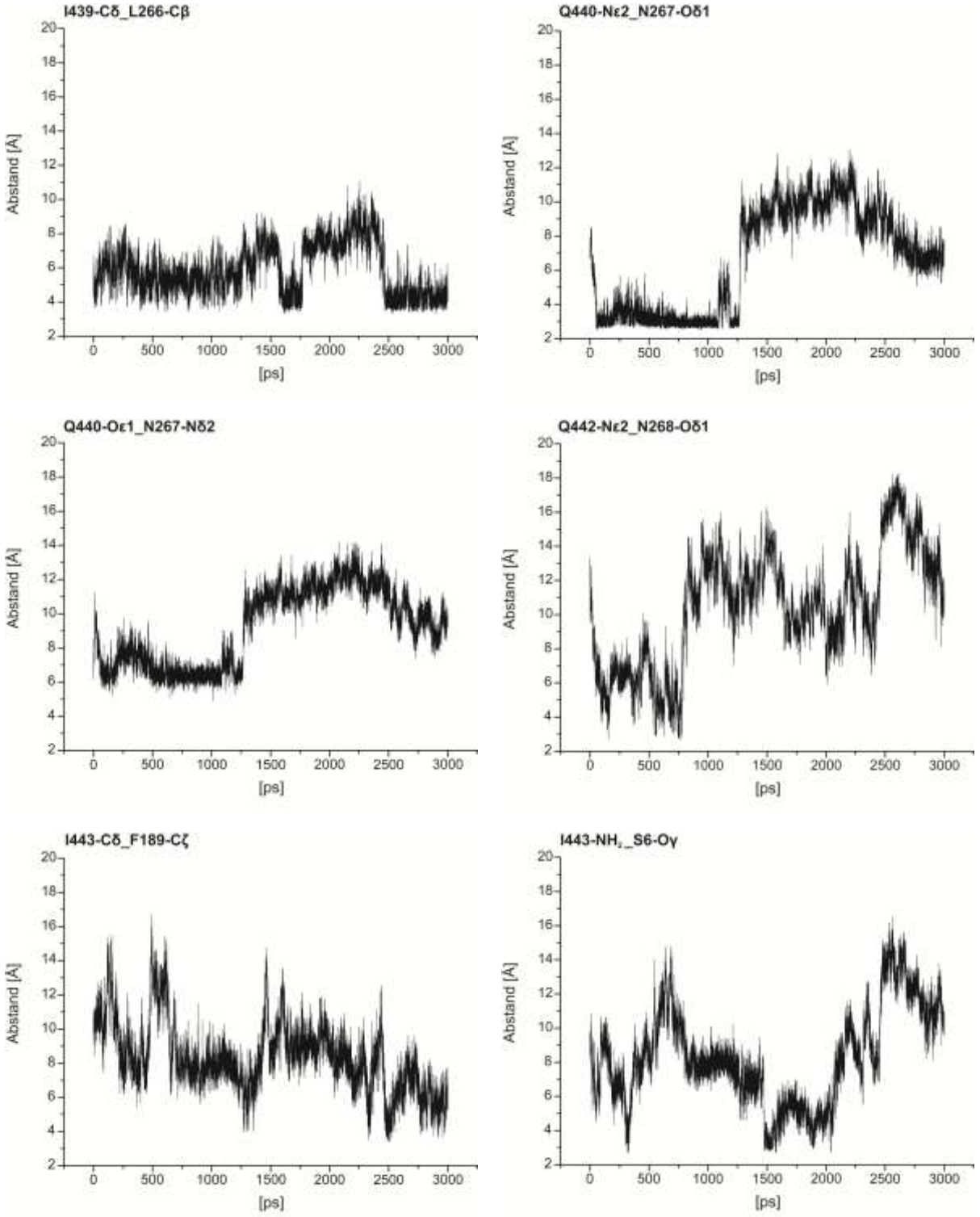


Abbildung 60: Abstandsmessungen der MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443} mit dem CCR5-Rezeptor. Es sind die gemessenen Abstände der Schweratome gegen die Zeit der MD-Simulation aufgetragen. Die erste Aminosäure der jeweiligen Graphenüberschrift bezieht sich auf das Peptid, die zweite Aminosäure stammt von dem Rezeptor.

In Abbildung 61 sind die Wechselwirkungen des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443} mit dem CCR5-Rezeptor bei einer Zeit von 1000 ps dargestellt. Die Aminosäuren I439 und I443

wechselwirken mit den Aminosäuren Y3, F189 und F263, das N-terminale APP-Motiv weist jedoch noch keine Interaktion auf.

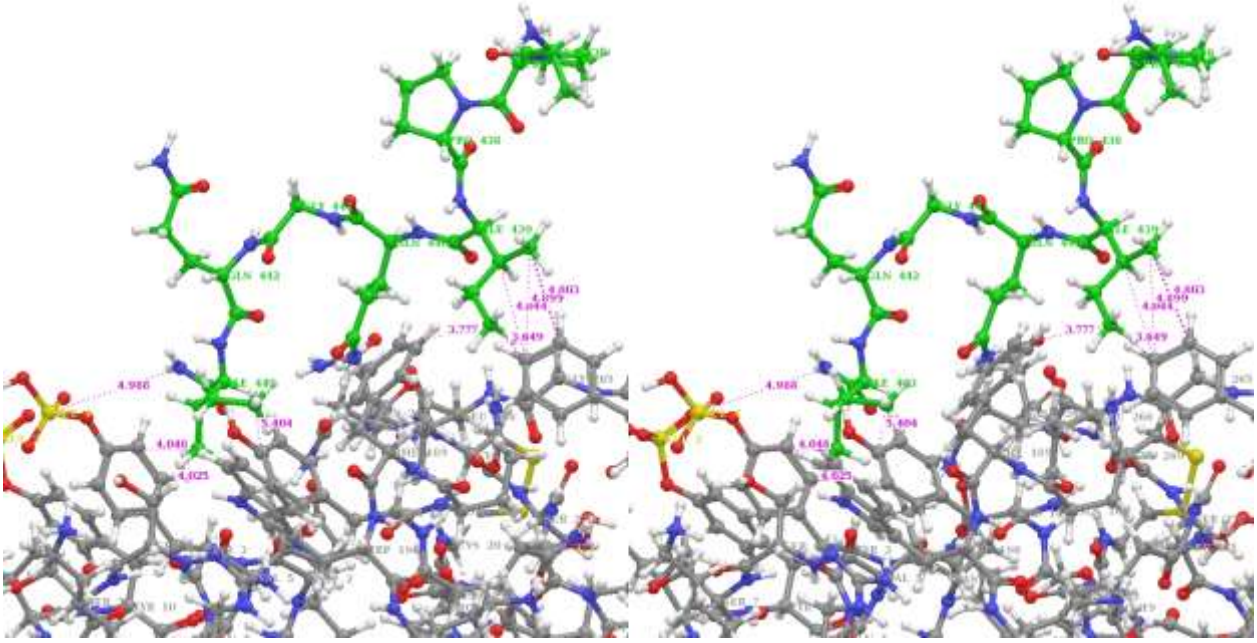
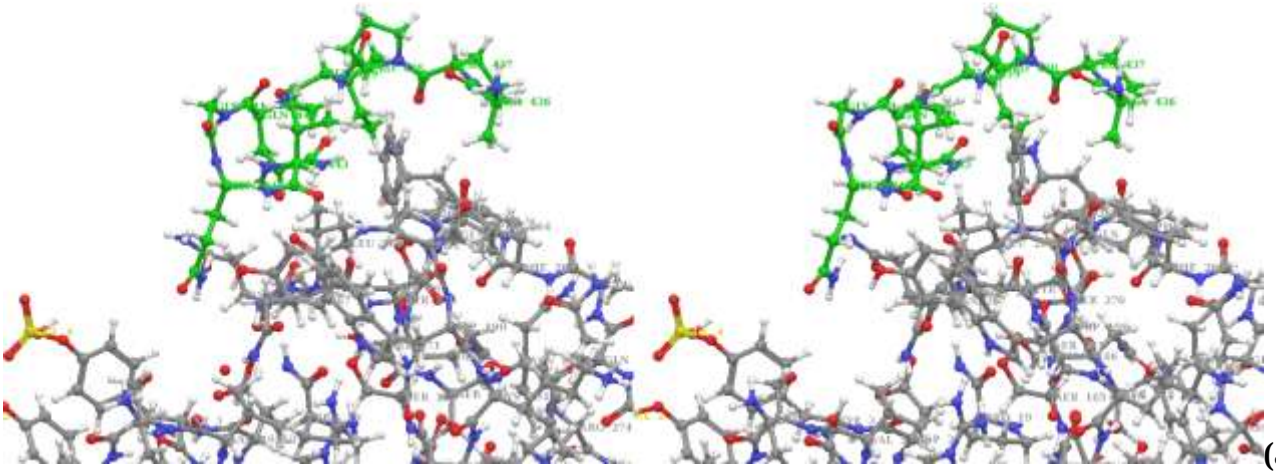
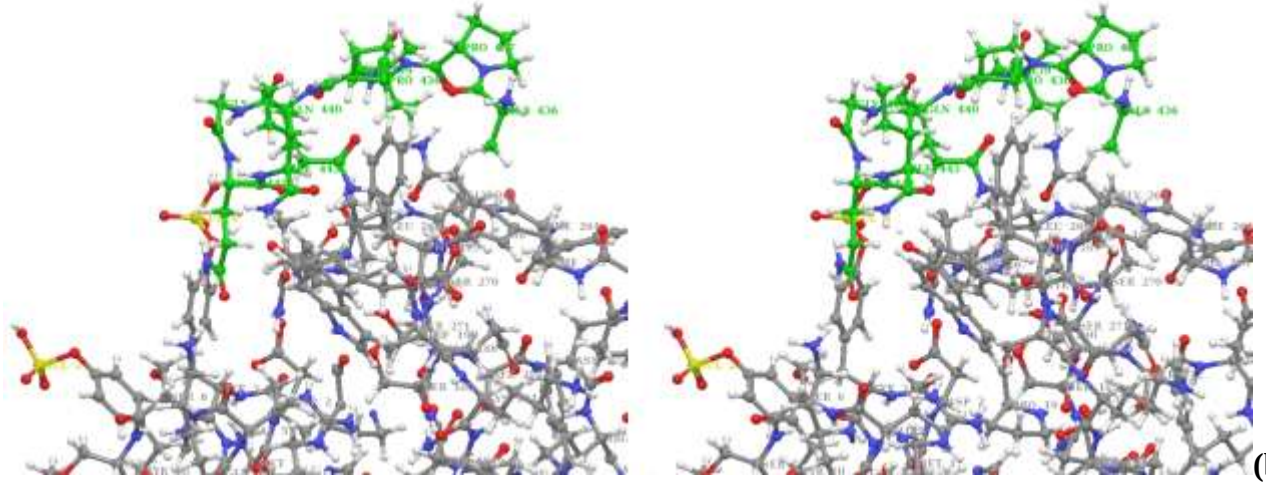


Abbildung 61: Stereoplot (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) der Konformation des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443} nach einer Simulationszeit von 1000 ps. Die Aminosäuren I439 und I443 wechselwirken mit den Aminosäuren Y3, F189 und F263 des Rezeptors. Das APP-Motiv des Peptids weist keine Interaktion mit dem Protein auf.

Ab einer Simulationszeit von 2500 ps häufen sich die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand und die Konformation des Peptids ist weitestgehend konstant. In Abbildung 62 sind zwei Konformationen bei (a) 2500 ps und (b) 2615 ps dargestellt.



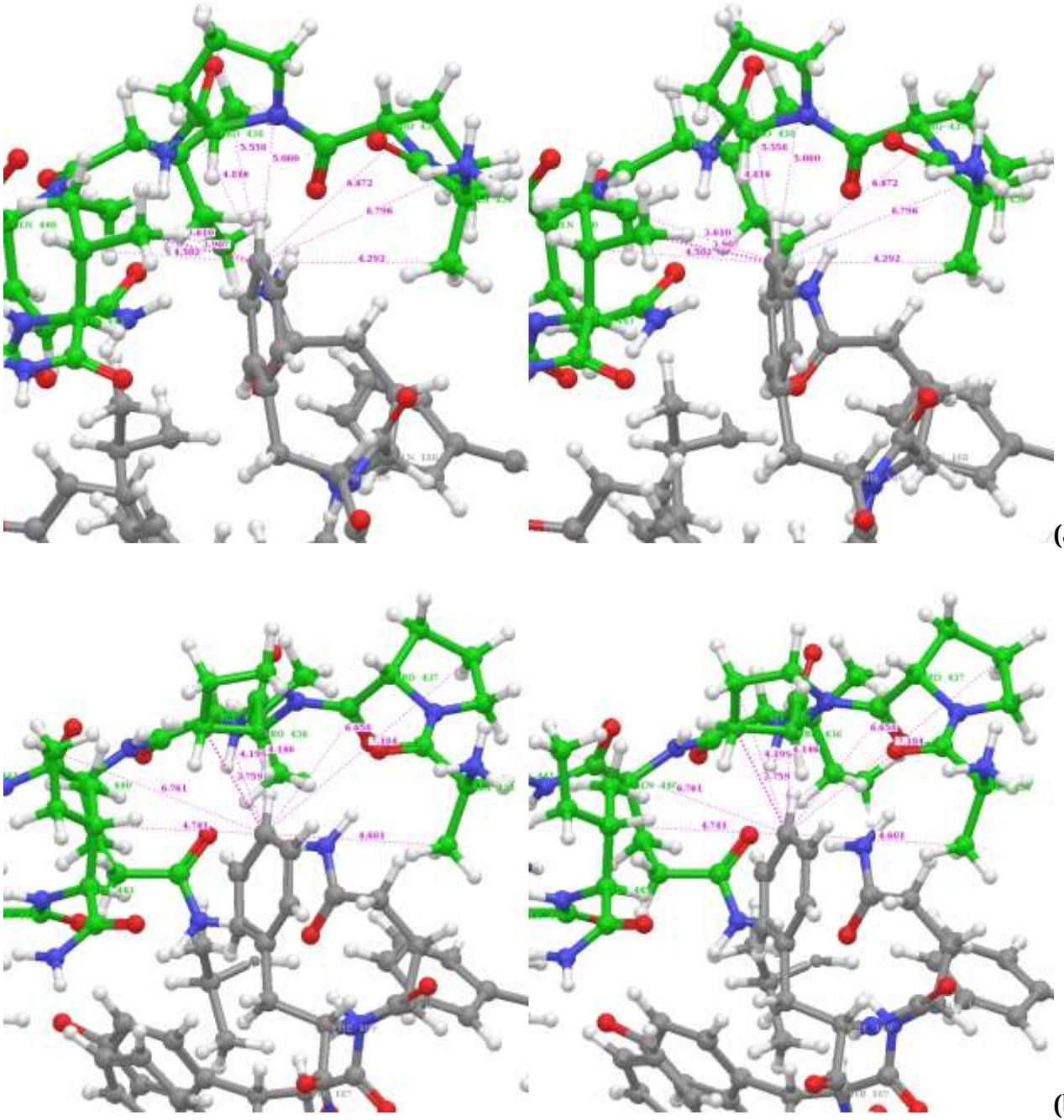
(a)



(b)

Abbildung 62: Stereoplot (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) des Komplexes aus Ligand ^{436}APPIQGQI^{443} und CCR5-Rezeptor bei einer Simulationszeit von (a) 2500 ps und (b) 2615 ps. Die beiden dargestellten Peptide sind in ihrer Konformation stabil.

Bei der Betrachtung der Wechselwirkungen ist erkennbar, dass das Phenylalanin F189 des CCR5-Rezeptors eine tragende Rolle spielt, da das Peptid eine hydrophobe Tasche um diese aromatische Aminosäure über einen langen Zeitraum der Simulation bildet (Abbildung 63 a, b). Die Aminosäuren A436 und P438 zeigen starke Wechselwirkungen mit dem Phenylalanin, welche durch schwache Interaktionen mit P437 und I443 gestützt werden.

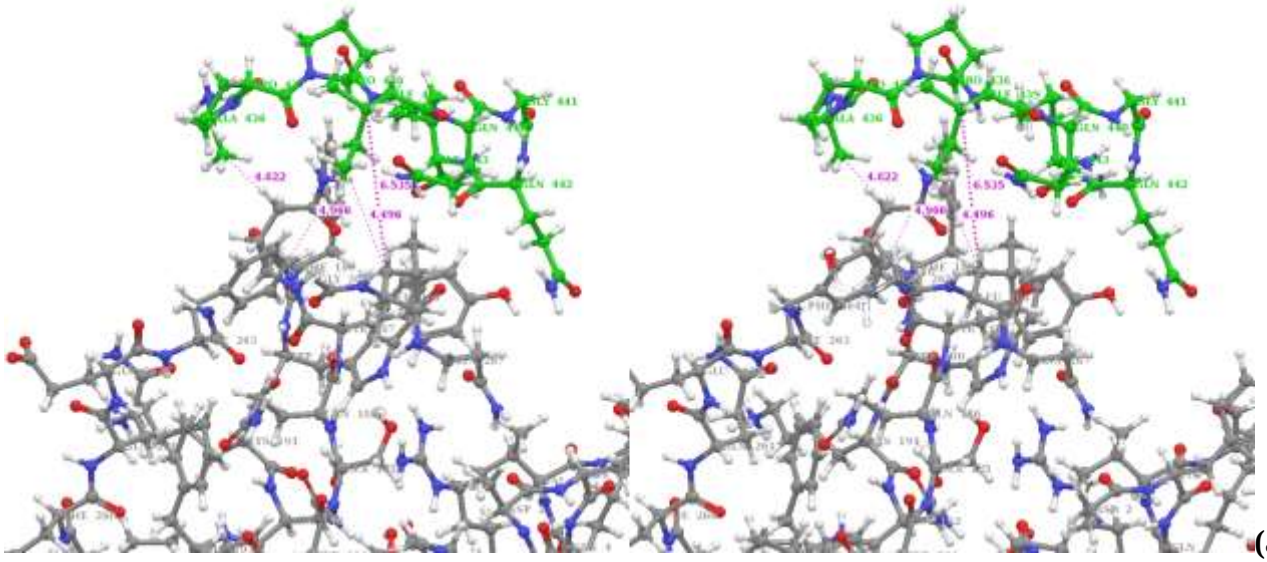


(a)

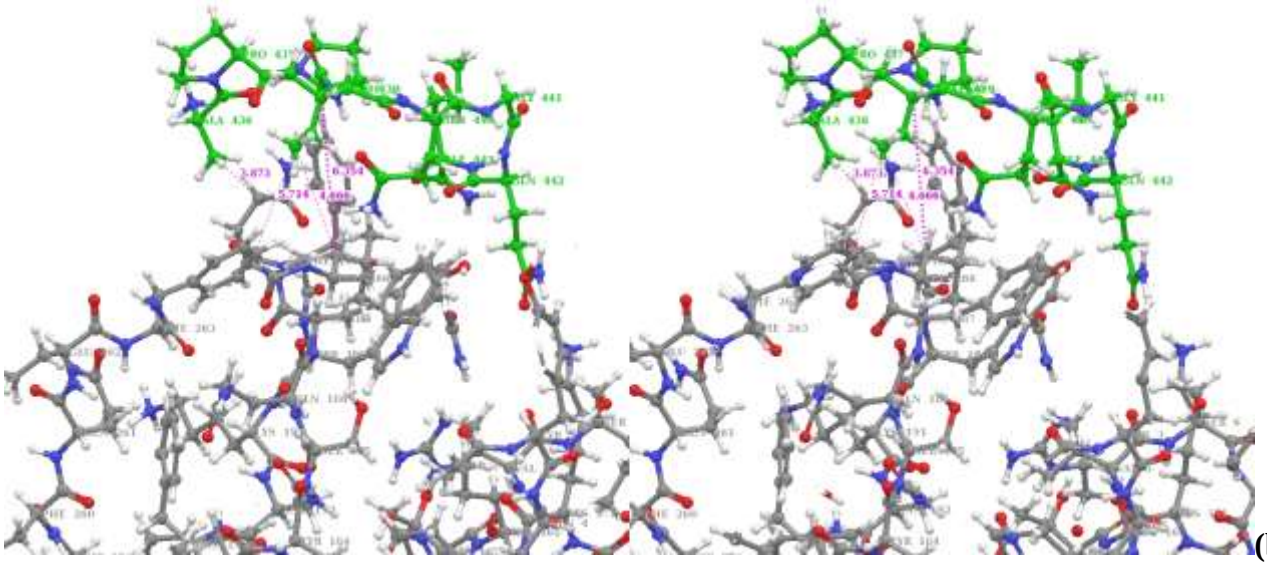
(b)

Abbildung 63: Stereoplots eines Ausschnitts des Komplexes aus ^{436}APPIQGQI^{443} und dem CCR5-Rezeptor (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) bei einer Simulationszeit von 2500 ps (a) und 2615 ps (b). Die Aminosäure F189 des Rezeptors ragt in eine hydrophobe Tasche des Liganden, bestehend aus den Aminosäuren A436, P437, P438 und I443.

Diese hydrophobe Tasche wird von der Rückseite ebenfalls durch schwache Interaktionen der Aminosäure I439 mit den Aminosäuren F263 und L266 des Rezeptors stabilisiert (Abbildung 64 a, b).



(a)



(b)

Abbildung 64: Stereoplots eines Ausschnitts des Komplexes aus ^{436}APPIQGQI^{443} und dem CCR5 Rezeptor (*crossed-eyes, colored by atomtype*, Peptid in grün und Rezeptor in grau koloriert) bei einer Simulationszeit von 2500 ps (a) und 2615 ps (b). Die Aminosäure I439 des Liganden weist schwache hydrophobe Wechselwirkungen zu den Aminosäuren F263 und L266 auf.

Aus den beiden MD-Simulationen geht hervor, dass die hydrophoben Aminosäuren P437, P438 und I439 einen großen Beitrag zur Interaktion zum CCR5-Rezeptor liefern. Auch die polare Aminosäure Q442 weist in beiden Simulationen hydrophile Wechselwirkungen auf. Insbesondere durch die MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443} konnte gezeigt werden, dass dieses Glutamin Wechselwirkungen zu den sulfatierten Tyrosinen eingeht, die wichtig für

die Interaktion zwischen viralem gp120 und CCR5-Rezeptor sind.[65] Die Aminosäuren A436 und I443 zeigen nur wenige Interaktionen in beiden durchgeführten MD-Simulationen. Die Position 440, die in der ersten Simulation als Glutaminsäure und in der zweiten Simulation als Glutamin vertreten war, interagiert nicht mit dem CCR5-Rezeptor. Weder die Carboxyfunktion noch das Säureamid bildeten Wasserstoffbrückenbindungen zu umliegenden Aminosäuren des Rezeptors. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Position vernachlässigbar in Bezug auf die Wechselwirkung zwischen Ligand und CCR5 ist, was durch die hohe Mutationsrate im gp120 bestätigt wird.

Aus dem Vergleich zwischen den *in-silico* erhaltenen Daten und den Ergebnissen der SPR-Bindungsstudien geht hervor, dass in den MD-Simulationen das PPI-Motiv zwar einen wichtigen Beitrag zur Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor liefert, aber in der SPR-Bindungsstudie des Peptids **4** (GSGS^{436}APPI^{439}) keine spezifischen Wechselwirkungen detektiert werden konnten. Insbesondere die Aminosäuren P438 und I439 weisen in den MD-Simulationen starke hydrophobe Interaktionen mit dem CCR5-Rezeptor auf. Auch in der SPR-Studie des Peptids **7** (GSGS^{438}PIEGQI^{443}) wurde eine hohe Affinität festgestellt.
Das Glutamin Q442 hingegen zeigt sowohl in den *in-silico* durchgeführten Studien eine starke Affinität zum Rezeptor als auch in den SPR-Studien der Peptide, in denen das EGQI-Motiv enthalten waren. Möglicherweise initialisiert die Position Q442 mit ihren starken Wasserstoffbrückenbindungen die Ausbildung der übrigen Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und dem Liganden. Dies würde begründen, weshalb die Peptide **2** (^{436}APPIEGQI^{443}), **6** (^{434}MYAPPIEGQIEG^{445}) und **7** (GSGS^{438}PIEGQI^{443}) hohe Affinitäten in den SPR-Studien zeigten und kein Bindungsbruch verzeichnet wurde, obwohl das APPI-Motiv ganz oder teilweise in den Strukturen enthalten war.

4.7.2 Vergleich der Strukturen aus MD-Simulation und Konformationsanalyse

Um die Konformationen des Peptids **2** der MD-Simulation und der Konformationsanalyse vergleichen zu können, wurde die beste von CYANA errechnete Struktur und das Konformer aus der MD-Simulation bei 2430 ps übereinandergelegt (Abbildung 65). Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass die mit Hilfe der NMR-Spektroskopie berechnete Struktur eine gemittelte Struktur in Abwesenheit des Rezeptors ist, wohingegen die Struktur der MD-Simulation, die an den Rezeptor bindet, nur eine von vielen Konformeren ist. Zur besseren Übersicht ist die Konformation des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443} aus der MD-Simulation in grün koloriert, die mit Hilfe des Programms CYANA erhaltene Struktur ist in grau koloriert.

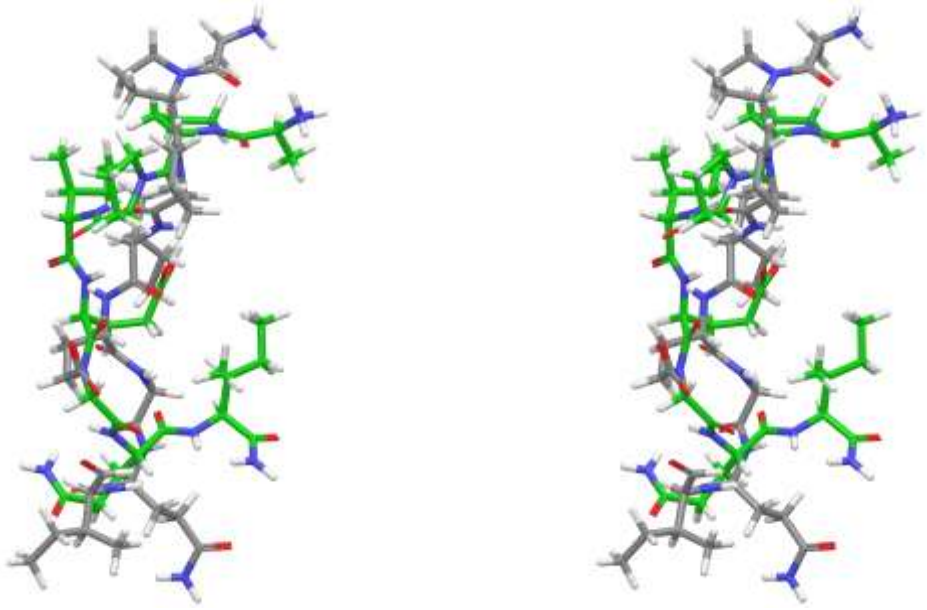


Abbildung 65: Stereoplots (*crossed-eyes, colored by atomtype*) der Konformere des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443}. Die Struktur der Konformationsanalyse ist grau koloriert. Aus der MD-Simulation wurde das Konformer bei der Simulationszeit von 2430 ps gewählt und in grün eingefärbt. Der N-Terminus beider Strukturen befindet sich oben.

Das Konformer der MD-Simulation weist eine deutliche Stauchung der Struktur auf. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da schon aus Abbildung 58 hervorgeht, dass das PPI-Motiv des Peptids viele hydrophobe Interaktionen mit dem CCR5-Rezeptor eingeht und daher eine konformellen Veränderung eingeleitet wird. Im Vergleich zur NMR-basierten Struktur zeigt die Prolin-Prolin-Abfolge die gleiche helikale Anordnung. Die Aminosäuren A436 und das C-terminale I443 der beiden Strukturen liegen sehr unterschiedlich vor. In der Struktur der Konformationsanalyse sind diese Aminosäuren linear angeordnet, während sie in dem MD-Konformer gekrümmt vom Rückgrat abweisen. Begründet wird dies mit der Tatsache, dass die beiden Aminosäuren in der MD-Simulation keine Interaktionen zum Rezeptor eingehen und dem Rezeptor abgewandt vorliegen.

Da das PP-Motiv des Leitpeptids **2** in beiden Strukturen die gleiche Konformation aufweist, wird die Hypothese, die Prolin-Prolin-Abfolge zu mimikrieren, gestützt. Eine Möglichkeit der Mimikrierung könnte beispielsweise die Einführung eines heterozyklischen Motives zur Festigung der Rigidität darstellen.

5. Zusammenfassung

Die Infektion des Humanen Immundefizienzvirus (HIV) wird durch die Interaktion des viralen Oberflächenproteins gp120 mit dem humanen Rezeptor CD4 eingeleitet. Anschließend findet eine zweite Wechselwirkung mit dem CCR5-Corezeptor statt, durch die eine Membranfusion vermittelt und die virale Erbinformation in die humane Zelle geschleust wird. Die Deletion von 32 Basenpaaren des CCR5-Gens (CCR5Δ32)[64] bei Menschen, die homozygot bezüglich dieser Deletion sind, führt zu keinen immunologischen Nachteilen und verhindert, dass diese Menschen HIV-infiziert sind. Daher bietet die Inhibition des CCR5-Rezeptors einen versprechenden Ansatz zum Unterbinden des HIV-*entry*.

Neben der viralen V3-*loop*, der eine starke Interaktion zum CCR5 während des *entry* zugeteilt wird, liegen in dem *in-silico* Homologiemodell von W. Scherres[58] weitere Sequenzen in unmittelbarer Nähe zum Corezeptor. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Sequenzen identifiziert, die *in-silico* Wechselwirkungen mit CCR5 eingehen. Dabei handelt es sich um die Sequenz ^{204}ACPKVS^{209} (Peptid **1**) der C1-Region und um ^{436}APPIEGQI^{443} (Peptid **2**) der C4-Region des viralen gp120. Diese Sequenzen und verschiedene Derivate beider Regionen wurden als Peptidbibliothek synthetisiert. In einer ersten Bindungsstudie wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz eine qualitative Aussage über die Bindungsaffinitäten der Peptide getroffen. Die Sequenz der C1-Region zeigte keinerlei Bindung zum CCR5. Der Sequenz der C4-Region konnte eine starke Bindungsaffinität zum CCR5 zugeschrieben werden. Um diese genauer innerhalb der Sequenz lokalisieren zu können, wurden ebenfalls Derivate des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443} mittels SPR untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Aminosäuren ^{440}EGQI^{443} einen höheren Anteil der Bindung als die Region ^{436}APPI^{439} aufweisen. Doch auch bei der am N- und C-Terminus um zwei Aminosäuren verlängerte Sequenz ^{434}MYAPPIEGQIEG^{445} konnten starke Wechselwirkungen zum CCR5 analysiert werden.

Da es sich bei dem CCR5-Corezeptor um einen 7-Helixtransmembranrezeptor handelt, wurden während dieser Dissertation für alle Bindungsstudien CCR5-überexprimierende Zellen verwendet. Um eine quantitative Aussage der Bindungsstudien treffen zu können, musste vorab die Rezeptoranzahl pro Zelle ermittelt werden. Diese wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf 40000 Rezeptoren pro Zelle bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode wurde ebenfalls eine Bindungsstudie durchgeführt. Dazu wurde die Leitstruktur **2** ^{436}APPIEGQI^{443} mit dem Fluorophor Cy3 markiert. Strukturbedingt konnte pro Peptid nur ein Molekül Cy3 unter Amidkupplung gebunden werden. Durch diese Bedingung war es möglich,

pro detektiertem Ereignis der Messung von einer 1:1-Bindung zwischen fluorophormarkiertem Peptid **2+Cy3** und CCR5-Rezeptor auszugehen. Die Messung der Durchflusszytometrie ergab eine thermodynamische Dissoziationskonstante K_D von 25 ± 4 mM für das Peptid **2+Cy3**.

Mit Hilfe der STDD-NMR-Spektroskopie sollte diese Dissoziationskonstante verifiziert werden. Dazu wurden aus den verwendeten Zellen Liposomen hergestellt und diese mit verschiedenen Konzentrationen des Octapeptids **2** analysiert. Bei der durchgeführten STDD-NMR-Titration konnten für das Proton E440-Hγ STD-Effekte ermittelt werden. Die Auswertung der STD-Effekte des Protons E440-Hγ lieferte eine Dissoziationskonstante von 14 ± 10 mM. Der NMR-spektroskopisch bestimmte K_D-Wert liegt in der gleichen Größenordnung und bestätigt die Dissoziationskonstante, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert wurde.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Konformationsanalyse NMR-spektroskopisch durchgeführt. Um ein geeignetes Mimetikum zu finden, bietet der Ansatz, die Rigidität der Struktur zu fixieren, eine gute Möglichkeit. Da in der Leitstruktur **2** zwei Proline in Folge auftreten, ist dies ein möglicher Angriffspunkt der Fixierung des peptidischen Rückgrats. Um eine Konformationsanalyse durchzuführen, wurden mittels EASYROESY-NMR-Spektren Aufbaukurven aufgestellt, um daraus Abstände interresidualer Protonen zu ermitteln. Weiterhin wurden aus skalaren ^3J-Kopplungskonstanten zwischen amidischen und dazugehörigen α-Protonen Torionswinkel bestimmt. Aus diesen Strukturinformationen wurden Abstands- und Winkelbeschränkungen aufgestellt und eine DG-Rechnung unter Verwendung des REDAC-Algorithmus durchgeführt. Die Zielfunktionen der besten 50 ermittelten Strukturen wiesen einen Wert von 0.32 auf. Der *rmsd* der besten 10 Strukturen von 0.93 ± 0.26 Å begründet eine definierte Struktur des Rückgrats.

Um den Anteil der konservierten Aminosäuren der in dieser Arbeit untersuchten C4-Region spezifizieren zu können, wurde ein Homologiemodell der Sequenz 434-445 durchgeführt. Die Mehrheit der Aminosäuren weist mit über 90% einen hoch konservierten Anteil auf. Lediglich die Positionen 440, 442 und 444 sind sehr variabel.

Es wurden zwei MD-Simulationen durchgeführt. Zum einen sollten die Interaktionen des Octapeptids **2** zum CCR5-Rezeptor *in-silico* definiert werden. Da die Homologiestudie zeigte, dass die Position 440 variabel ist und ein hoher Anteil der Varianz die Aminosäure Glutamin bestreitet, wurde zum anderen eine MD-Simulation mit dem Homologen ^{436}APPIQGQI^{443} durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Position 440 keinen Einfluss auf die Affinität zum CCR5-Rezeptor hat. In den MD-Simulationen wiesen besonders das PPI-Motiv und die Aminosäure Q442 hohe Interaktionen zum Rezeptor auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auch das Peptid **2** aus der C4-Region neben der V3-*loop* an der Interaktion des gp120 zum CCR5-Rezeptor beteiligt ist und somit vermutlich diese Bindung stärkt.

6. Summary

The entry of HIV into human cells is induced by the interactions of the viral protein gp120 and the human CD4 receptor and CCR5 coreceptor. Targeting the interaction of gp120 and CCR5 is a promising approach to inhibit viral entry. The idea is based on the fact that a deletion of 32 base pairs of the CCR5-gene (CCR5Δ32) poses no immunological disadvantages to affected humans.

In the homology model of W. Scherres[58] are besides the viral V3 loop which interacts strongly with the CCR5 coreceptor more sequences of the viral gp120 in striking distance to the receptor. In this study a new sequence of the viral protein gp120 was identified. This peptide could serve a potential lead structure to inhibit CCR5-coreceptor. After synthesis of a peptide library qualitative binding affinities of the peptide ^{436}APPIEGQI^{443} (**2**) and its derivatives could be assigned using SPR analysis. It could be shown that the sequence ^{440}EGQI^{443} has a more important influence to the binding affinity than the sequence ^{436}APPI^{439}.

Because CCR5 belongs to the family of seven-helix transmembrane receptors the CCR5-overexpressing GHOST(3)-Hi5 cells were used in this work. First the number of CCR5-receptors on the cell surface was identified to allow quantification of the following measurements. Using flow cytometry the number of CCR5-receptors was assigned to 40000 CCR5-receptors per cell. This optical method was also used to determine a dissociation constant K_D for the lead structure ^{436}APPIEGQI^{443} which was fluorophorically labeled with Cy3. Due to the structure of the peptide only one molecule of the fluorophor was linked under amide coupling. A K_D-value of 25 ± 4 mM for the lead structure **2+Cy3** was obtained.

To verify this K_D-value, STDD-NMR-spectroscopy was employed. Liposomes assembled of GHOST(3)-Hi5 cells were analyzed with different concentrations of the lead structure. STD-effects could be detected for the proton E440-Hγ of the octapeptide **2**. Fitting of STD-amplificationfactors against peptide concentrations yielded the K_D-value of 14 ± 10 mM. This K_D-value is consistent with results determined by flow cytometry.

A conformational analysis of the peptide **2** was performed. Because of its proline-proline motive modifying the backbone could serve a possibility to fix the rigidity of the peptide. In this study the conformation of the lead structure **2** was analyzed by NMR-techniques. Structural information derived from EASYROESY-NMR buildup-curves and ^3J-coupling constants were used to define distance and angle constraints. A distance geometry calculation with these constraints and a REDAC algorithm was performed and well defined structures with a rmsd = 0.93 ± 0.26 Å were obtained. The target function values of the best 50 conformers yielded 0.32 which indicates that the defined constraints were observed.

Although the lead structure is located in the conserved C4-region of the gp120, a homology study was performed. Most of the amino acids are conserved indeed, only the positions 440, 442 and 444 are highly variable.

The interactions of peptide **2** to the CCR5 coreceptor were analyzed in a molecular dynamics simulation. Because of the variety of position 440 another molecular dynamic simulation was performed with the homolog ^{436}APPIQGQI^{443}. In both simulations no affinity of the position 440 could be detected. By contrast the PPI-motive and the amino acid 442Q formed strong interactions to the CCR5 coreceptor.

7. Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Geräte und Materialien

7.1.1 Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
Arcos	Acetonitril (HPLC *for gradient analysis*), Tri-*iso*-propylsilan
Biacore (GE Healthcare)	*N*-Hydroxysuccinimid, *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimidhydrochlorid, Ethanolamin, Acetatpuffer
Biochrom	Fötales Kälberserum
Calbiochem	G418, Hygromycin
Cambidge Isotope Laboratories	EDTA-d_{16}, Tris-d_{11}
Deutero	Deuteriumoxid, (99.98%)
Fluka	di-Natriumhydrogenphosphat
Gibco	0.05% Trypsin EDTA, DMEM + Glutamax, Penicillin/Streptomycin, Pefablock, Pepstatin, Antipain, Leupeptin
HiClone	RPMI-1640
Iris Biotech	DIPEA, DMF, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(O*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-Rink-Amid-AM-Harz, Piperidin, TBTU
J.T. Baker	Natriumchlorid
Lumiprobe	Cy3 NHS-ester
Merck	Dichlormethan, Diethylether, Dodecylsulfat Natriumsalz, Essigsäureanhydrid, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Trifluoressigsäure, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Sigma Aldrich	Puromycin, Sinapinsäure, Trypanblau, DMSO

7.1.2 Zellen und Antikörper

Zelllinie	Anbieter
GHOST(3)-Hi5	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH
GHOST(3)-Parental	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH
PE *Mouse* IgG2a	Becton Dickinson

7.1.3 Materialien

Materialien	Produkt	Hersteller
Cryo-Röhrchen	Cryo-Röhrchen 2 mL mit Außengewinde, freistehend	Carl Roth
Beads	QuantiBriteTM PE-*Beads*	Becton Dickinson
Falcon-Tubes	Schraubroehre, 15 und 50 mL, ohne Stehrand, steril	Sarstedt
FilterSpin Tubes	*SpinX tubes* (0.22 µm Zelluloseacetat)	CoStar Corp.
Gelfiltrations-Säule	Superdex Peptide 10/300GL	GE Healthcare
Kulturgefäße	Gewebeflasche 175 cm^2, ventiliert	Sarstedt
NMR-Röhrchen	5 mm Typ502, Typ507-HP7	Norell
NMR-Röhrchen	3mm *match*	Hilgenberg
RP-Säule	VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid	Macherey und Nagel
RP-Säule	Vydac, Protein & Peptide C18	Grace
serologische Pipetten	1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, steril	Sarstedt
SPR-Chip	CM3-Chip	GE Healthcare
	SCB CMDP	Xantec
Spritzenfiltereinheit	0.22 µm-Filtereinheit, Filtropur S	Sarstedt

7.1.4 Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
CO_2-Inkubator	*MCO 17 AI*	SANYO Innovationstechnik GmbH
Durchflusszytometer	FACS CantoII	Becton Dickinson
HPLC	Biocad 700E Perfusion	Biocad
HPLC	Merck/Hitachi LAChrom L-7000-Serie	VWR International
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Christ
Liposomenextruder	*Avanti Mini-Extruder*	Avanti Polar Lipids
MALDI-TOF-MS	Biflex III	Bruker
Mikroskop	*Diavert*	Leitz
Mikrowellenreaktor	*Mono-mode* System *Discover*	CEM
Mikrowellen-Synthesizer	*Liberty*	CEM
Neubauerzählkammer	Assistent (0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm^2)	Marienthal
NMR 500 MHz	DRX500, 11.67 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz Probenkopf	Bruker Biospin
NMR 700 MHz	Avance I, 700 MHz, 16.35 Tesla, inverser 5 mm Tripelresonanz Probenkopf	Bruker Biospin
Photometer	UV-160a	Shimadzu Corporation
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SGwater
SPR	Biacore *J*	GE Healthcare
Sterilbank	Hera safe	Kendro
Syntheseroboter	*Pioneer Peptide Synthesis System*	Per Septive Biosystems
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
Workstation	HPZ600	Hewlett-Packard
Zentrifugen	5417R, 5804R	Eppendorf

7.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer, Lösung	Zusammensetzung
PBS	68 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 5 mM Na_2HPO_4, 0.9 mM KH_2PO_4, pH 7.4
Tris	0.1 M Tris, pH 8.2
SA	ges. Lsg. Sinapinsäure in Wasser/Acetonitril (2:1) + 0.1% (*v*/*v*) TFA
LUV-EDTA-NMR-Puffer	876 mg (882 mmol) NaCl, 146 mg (1.00 mmol) EDTA-d_{16} und 120 mg (100 mmol) Perdeutero-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-d_{11}) gelöst in 100 mL D_2O, pH 7.5
LUV-NMR-Puffer	876 mg (882 mmol) NaCl und 120 mg (100 mmol) Perdeutero-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-d_{11}) gelöst in 100 mL D_2O
Proteaseinhibitorenmix	Stammlösungen der einzelnen Inhibitoren: 10 mM Antipain (6.1 mg in 1 mL D_2O), 1 mM Pepstatin (0.7 mg in 1 mL D_2O), 20 mM Leupeptin (9.9 mg in 1 mL D_2O) und 500 mM Pefablock (11.9 mg in 1 mL D_2O); Stammlösungen 1:1:1:1 vermischt
Wachstumsmedium	RPMI 1640 (oder DMEM + Glutamax), 50 mL Fötales Kälberserum, 5 mL Penicillin/Streptomycin
Wachstumsmedium + Selektion	50 mL Fötales Kälberserum, 5 mL Penicillin/Streptomycin, 2 pM Puromycin, 1 nM G418, 0.1 nM Hygromycin
Einfriermedium	35 mL RPMI 1640, 5 mL DMSO (Ampulle, Sigma-Aldrich), 10 mL Fötales Kälberserum

7.1.6 Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS4	Adobe
Biaeval 3.0	GE Healthcare
CYANA 2.1	L.A. Systems Inc.
FACSDiva 6.1.3	Becton Dickinson
ISISDraw 2.5	MDL Information Systems
Maestro 9.0	Schrödinger
Origin 7.5	OriginLab
QtiPlot 0.9.7.14	GPL
TopSpin 2.1	Bruker Biospin
XACQ 4.0	Bruker
XMass 5.1	Bruker

7.2 Peptidsynthese

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAVs)

AAV 1: Automatisierte Festphasensynthese

Die automatisierte Festphasensynthese fand an einem *Pioneer Peptide Synthesis System* Syntheseroboter der Firma *Per Septive Biosystems* statt.

Ein Rink-AM Polystyrolharz mit einer Belegung von 0.95 mmol/g wurde als Festphase eingesetzt und vor Beginn der Synthese über Nacht in DMF zum Quellen gebracht. Die Aminosäurederivate wurden als 0.2 M Lösung, der Aktivator TBTU als 0.5 M Lösung und die Aktivatorbase DIPEA als 2.0 M Lösung in DMF eingesetzt. Zur Acetylierung nicht umgesetzter Aminofunktionen wurde eine Lösung aus 10% (*v/v*) Essigsäureanhydrid in DMF verwendet. Die Fmoc-Entschützung wurde mit 20% (*v/v*) Piperidin in DMF durchgeführt. Die Kupplungsschritte wurden jeweils dreimal für 30 Minuten vollzogen.

AAV 2: Automatisierte mikrowellenunterstützte Festphasensynthese

Mit Hilfe des Syntheseroboters *Liberty* und der dazugehörigen Mikrowelleneinheit *Discover* der Firma CEM wurde die automatisierte mikrowellenunterstützte Festphasensynthese der Peptide durchgeführt.

Als Festphase diente ein Rink-Amid-AM-Polystyrolharz mit einer Belegung von 0.72 mmol/g, welches vorab über Nacht in DMF zum Quellen gebracht wurde. Die Seitenketten- und

Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden als 0.2 M Lösungen, der Aktivator TBTU als 0.5 M Lösung und die Aktivatorbase DIPEA als 2.0 M Lösung, jeweils gelöst in DMF, eingesetzt. Das *capping* wurde mit einer 10%igen (*v/v*) Ac_2O-Lösung in DMF und die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% (*v/v*) Piperidin in DMF durchgeführt. Die einzelnen Reaktionsschritte fanden jeweils für 300 s bei 25 W und 348 K statt, die Kupplungsschritte wurden doppelt durchgeführt.

AAV 3: Manuelle Fmoc-Abspaltung und photometrische Bestimmung der Rohausbeute

Das am Harz gekuppelte Peptid wurde unter Lichtausschluss mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für 20 Minuten versehen. Die Lösung wurde von der festen Phase entfernt und unter Lichtausschluss aufbewahrt und der Vorgang wiederholt. Die vereinigten Piperidin/DMF-Lösungen wurden mit 16 mL DMF aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnung vorgenommen, indem 100 µL der Abspaltlösung mit 1900 µL DMF versehen wurden.

AAV 4: Abspaltung der Peptide vom Harz

Zu dem am Harz befindlichen Peptid wurden 5 mL einer Lösung aus TFA, TIPS und Wasser (95:5:2) hinzugegeben und für 90 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Lösung wurde vom Harz entfernt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit weiteren 10 mL der Lösung gewaschen. Die vereinigten peptidhaltigen Lösungen wurden im Vakuum bis zur Trockne eingeengt, erneut in Wasser gelöst und abschließend gefriergetrocknet.

AAV 5: Etherextraktion

Das erhaltene gefriergetrocknete Rohprodukt wurde in 5 mL Diethylether aufgenommen und für fünf Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert (20 °C, 8000 U/min, 10 min) und der Überstand dekantiert. Der Rückstand wurde mit 5 mL Wasser versetzt, im Ultraschallbad homogenisiert und gefriergetrocknet.

AAV 6: Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC

Vor der Reinigung wurde das gefriergetrocknete Rohprodukt in Laufmittel A, Acetonitril/Wasser/TFA (5:95:0.1), aufgenommen und die erhaltene Lösung eine Minute durch einen Zentrifugationsfilter (0.22 µm, 4000 U/min) zentrifugiert.

Einerseits wurden die Peptide mit Hilfe einer präparativen *reversed-phase*-RP-HPLC mit einer C18-Säule (CV = 80 mL) und einer Flussrate von 20 mL/min gereinigt. Die UV-Detektion erfolgte bei Wellenlängen von 215 nm und 280 nm. Es wurden Laufmittel A, bestehend aus

Acetonitril/Wasser/TFA (5:95:0.1), und Laufmittel B, bestehend aus Acetonitril/Wasser/TFA (95:5:0.1), verwendet. Bei den HPLC-Läufen wurden verschiedene Gradienten der beiden Laufmittel A und B zur Auftrennung der Komponenten verwendet:

Methode 1:

0 CV	100% A	0% B
6 CV	80% A	20% B
7 CV	0% A	100% B
8 CV	100% A	0% B

Methode 2:

0 CV	100% A	0% B
0.5 CV	90% A	10% B
8 CV	80% A	20% B
9 CV	0% A	100% B
10 CV	100% A	0% B

Methode 3:

0 CV	100% A	0% B
1 CV	75% A	25% B
7 CV	60% A	40% B
7.5 CV	0% A	100% B
8 CV	100% A	0% B

Methode 4:

0 CV	100% A	0% B
0.5 CV	77% A	23% B
7.5 CV	69% A	31% B
8 CV	0% A	100% B
8.5 CV	100% A	0% B

Die Reinigung der Peptide erfolgte andererseits mittels einer semipräparativen *reversed-phase* RP-HPLC mit einer *Vydac* C18-Säule (CV = 19.63 mL). Die Flussrate betrug

5 mL/min und es wurden die UV-Adsorptionen bei Wellenlängen von ebenfalls 215 nm und 280 nm detektiert.

Methode 5:

0 CV	100% A	0% B
5 CV	0% A	100% B
6 CV	100% A	0% B

Methode 6:

0 CV	100% A	0% B
5 CV	70% A	30% B
6 CV	0% A	100% B

AAV 7: Charakterisierung der Peptide mittels MALDI-TOF-MS

Die Detektion und Charakterisierung der Peptide erfolgte massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS im positiven Ionenmodus, mit einer Attenuation von 30-40 dB und 50 - 100 Laserpulsen. Dazu wurden auf den Probenteller zunächst 5 µL SA-Matrix vorgelegt, 5 µL der Analytlösung hinzugegeben und anschließend vermessen.

AAV 8: Charakterisierung der Peptide mittels NMR-Spektroskopie

Die Charakterisierung der Peptide mittels NMR-Spektroskopie wurde an einem 500-MHz-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

Dazu wurden etwa 2.0 µmol des zu untersuchenden Peptids in 600 µL H_2O/D_2O (9:1, pH 3.0) gelöst, so dass eine Konzentration von 3.3 mM vorlag. Die Messungen erfolgten stets bei einer Temperatur von 300 K und mit einer Wasserunterdrückung, wobei entweder eine *excitation-sculpting*- oder WATERGATE-Pulssequenz[146] verwendet wurde. Die Signale der Aminosäuren wurden mit Hilfe eines TOCSY-Experimentes mit dem Pulsprogramm *mlevgpphw5* zugeordnet. Die Sequenzabfolge wurde mittels eines ROESY-Experimentes des Pulsprogramms *roesygpw5.dt* verifiziert. Ausgewertet wurden die Spektren mit dem Programm Topspin 2.1, nachdem diese auf das H_2O-Signal bei 4.75 ppm kalibriert wurden.[147]

7.2.2 Synthese der Peptide

Die Synthese der Peptide erfolgte nach automatisierter, bzw. automatisierter mikrowellenunterstützter Festphasenpeptidsynthese nach AAV 1 bzw. AAV 2. Es wurde stets ein Ansatz von 50 µmol mit einem Rink-Amid-AM-Polystyrolharz mit einer Belegung von

0.72 mmol/g durchgeführt. In Bezug auf die Einwaage des Harzes wurde in einem vierfachen Überschuss an Aminosäurederivaten gearbeitet. Nach Beendigung der Synthese wurde die Rohausbeute durch manuelle Fmoc-Abspaltung nach AAV 3 bestimmt. Das Peptid wurde anschließend vom Harz abgespalten (AAV 4) und eine Vorreinigung mittels der Etherextraktion (AAV 5) durchgeführt. Die gefriergetrockneten Rohprodukte wurden anschließend nach AAV 6 an einer RP-HPLC gereinigt, bis die Reinheit der Peptide > 95% betrug. Aus den erhaltenen Läufen wurden 0.5 µL des HPLC-Eluats entnommen und nach AAV 7 mit SA-Matrix cokristallisiert mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Die gereinigten Peptide wurden schlussendlich nach AAV 8 NMR-spektroskopisch charakterisiert.

Peptid **1**

Sequenz	ACPKVS
Molmasse	602.76 g/mol
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit	4.27 min
Ausbeute	13.8 mg (22.9 µmol, 34%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	603.3 ($M+H^+$), 625.3 ($M+Na^+$), 641.3 ($M+K^+$)

Tabelle 11: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 1 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,Hα)}$ [Hz]
A	/	4.122	1.505	/	/	/	/	/	/	/	/	/
C	8.696	4.822	2.965	2.887	/	/	/	/	/	/	/	6.9
P	/	4.424	2.302	2.019	1.894	/	3.796	/	/	/	/	/
K	8.36	4.316	1.776	/	1.489	/	1.691		2.991	7.503	/	7.3
V	8.187	4.182	2.089	/	0.928	/	/	/	/	/	/	7.8
S	8.345	4.413	3.846	/	/	/	/	/	/	/	7.128/ 7.562	7.7

Peptid **2**

Sequenz	APPIEGQI
Molmasse	822.97 g/mol
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 1, Methode 2
Retentionszeit	17.61 min
Ausbeute	6.71 mg (11.1 µmol, 22%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	823.1 ($M+H^+$), 845.1 ($M+Na^+$), 861.0 ($M+K^+$)

Tabelle 12: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 2 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,H\alpha)}$ [Hz]
A	/	4.213	1.360	1.360	/	/	/	/	/	/	/	/
P	/	4.755	2.405	2.049	1.877	/	3.717	3.601	/	/	/	/
P	/	4.442	2.268	2.031	1.894	/	6.803	3.646	/	/	/	/
I	8.184	4.120	1.823	/	1.478	1.191	0.903	/	/	/	/	7.8
E	8.416	4.373	2.103	1.991	2.471	/	/	/	/	/	/	7.0
G	8.436	3.929	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6.1
Q	8.193	4.372	2.087	1.971	2.181	/	/	/	/	/	6.834/ 7.523	7.0
I	8.043	3.978	1.691	/	1.333	1.407	0.774	/	/	/	7.098/ 7.656	7.8

Peptid **3**

Sequenz	ASPKVS
Molmasse	586.69 g/mol
Synthese	AAV 1
HPLC	Methode 1
Retentionszeit	4.12 min
Ausbeute	15.7 mg (26.8 µmol, 54%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	589.5 ($M+H^+$), 611.1 ($M+Na^+$), 626.8 ($M+K^+$)

Tabelle 13: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 3 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,H\alpha)}$ [Hz]
A	/	4.142	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S	8.666	4.797	3.906	3.811	/	/	/	/	/	/	/	6.8
P	/	4.434	2.304	/	2.019	1.897	3.831	3.721	/	/	/	/
K	8.363	4.298	/	/	1.419	/	1.772	1.678	2.991	NH_3^+ 7.504	/	7.0
V	8.169	4.177	2.093	/	0.931	/	/	/	/	/	/	8.0
S	8.331	4.415	3.844	/	/	/	/	/	/	/	7.127/ 7.556	7.1

Peptid **4**

Sequenz	GSGSAPPI
Molmasse	684.78 g/mol
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 1, Methode 4
Retentionszeit	8.02 min
Ausbeute	1.9 mg (2.8 µmol, 6%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	684.6 ($M+H^+$), 706.4 ($M+Na^+$), 722.4 ($M+K^+$)

Tabelle 14: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 4 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,H\alpha)}$ [Hz]
G		3.908	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S	8.718	4.532	3.894	/	/	/	/	/	/	/	/	6.8
G	8.575	4.025	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6.1
S	8.185	4.473	3.829	/	/	/	/	/	/	/	/	7.4
A	8.298	4.623	1.351	/	/	/	/	/	/	/	/	5.9
P	/	4.451	2.297	2.038	1.905	/	3.807	3.648	/	/	/	/
P	/	4.456	2.271	2.034	1.917	/	3.799	3.643	/	/	/	/
I	8.117	4.101	1.812	/	1.503	1.202	0.928	/	/	/	7.073/ 7.635	7.5

Peptid **5**

Sequenz	GSGSEGQI
Molmasse	733.76 g/mol
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 1, Methode 5
Retentionszeit	13.51 min
Ausbeute	2.5 mg (3.4 µmol, 7%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	733.3 ($M+H^+$), 755.3 ($M+Na^+$), 771.1 ($M+K^+$)

Tabelle 15: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 5 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,H\alpha)}$ [Hz]
G	/	3.906	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S	8.699	4.537	3.896	/	/	/	/	/	/	/	/	7.0
G	8.575	4.062	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6.0
S	8.27	4.478	3.867	/	/	/	/	/	/	/	/	7.0
E	8.442	4.394	2.018	2.172	2.498	/	/	/	/	/	/	7.0
G	8.393	3.935	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6.1
Q	8.191	4.37	2.098	1.981	2.336	/	/	/	/	/	6.836/ 7.512	7.2
I	8.165	4.141	1.845	/	1.482	1.201	0.867	0.924	/	/	7.095/ 7.646	7.7

Peptid **6**

Sequenz	MYAPPIEGQIEG
Molmasse	1303.51 g/mol
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 3, Methode 5
Retentionszeit	9.85 min
Ausbeute	2.5 mg (1.9 µmol, 4%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	1303.8 ($M+H^+$), 1325.5 ($M+Na^+$), 1341.5 ($M+K^+$)

Tabelle 16: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 6 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,H\alpha)}$ [Hz]
M	/	4.093	2.136	/	2.549	/	/	/	/		/	/
Y	8.681	4.547	3.025	2.899	/	/	/	/	6.801	7.105	/	6.7
A	8.009	4.529	1.225	/	/	/	/	/	/	/	/	7.3
P	/	4.546	2.235	1.892	2.004	/	3.552	/	/	/	/	/
P	/	4.415	2.243	1.888	2.027		3.805	3.647	/	/	/	/
I	8.151	4.11	1.786	/	1.169	/	0.876	/	/	/	/	7.8
E	8.415	4.356	2.094	1.976	2.453	/	/	/	/	/	/	/
G	8.425	3.913	/	/	/	/	/	/	/	/	6.825/ 7.503	/
Q	8.164	4.349	1.955	2.064	2.309	/	/	/	/	/	/	7.4
I	8.231	4.145	1.831	/	1.174	1.458	0.861	/	/	/	/	7.6
E	8.496	4.367	1.983	2.109	2.456	/	/	/	/	/	/	7.3
G	8.425	3.913	/	/	/	/	/	/	/	/	7.056/ 7.433	/

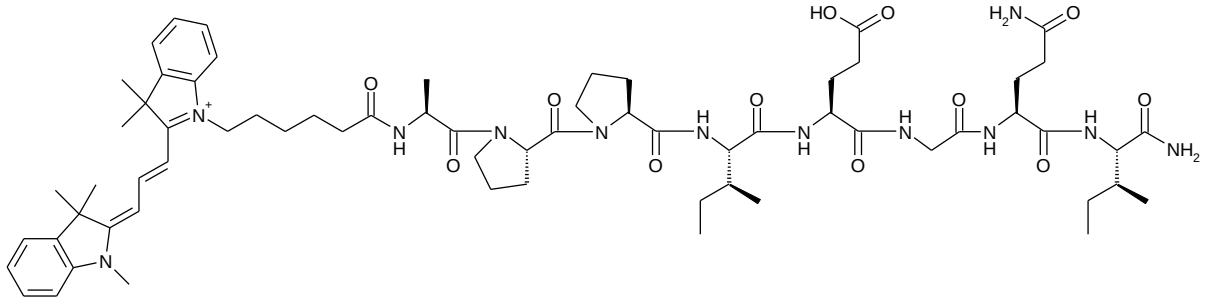
Peptid **7**

Sequenz	GSGSPIEGQI
Molmasse	943.03 g/mol
Synthese	AAV 2
HPLC	Methode 5, 6
Retentionszeit	11.01 min
Ausbeute	1.1 mg (1.2 µmol, 2%)
MALDI-TOF-MS [m/z]	943.2 ($M+H^+$), 965.4 ($M+Na^+$), 981.4 ($M+K^+$)

Tabelle 17: ^{1}H-chemische Verschiebungen des Peptids 7 in [ppm]. Das Spektrum wurde an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer bei 300 K, in H_2O/D_2O (9:1) bei pH 3.0 aufgenommen und auf das H_2O-Signal bei 4.745 ppm kalibriert.

AS	NH	α	β	β`	γ	γ`	δ	δ`	ε	ε´	$CONH_2$	$^3J_{(NH,Hα)}$ [Hz]
G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S	8.647	4.341	3.720	/	/	/	/	/	/	/	/	6.8
G	8.496	3.827	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6.1
S	8.094	4.603	3.660	/	/	/	/	/	/	/		6.6
P	/	4.285	2.101	1.850	1.735	/	3.659	3.548	/	/	/	/
I	8.124	3.944	1.640	/	1.312	1.009	0.721	0.688	/	/	/	7.8
E	8.339	4.178	1.929	1.826	2.302	/	/	/	/	/	/	6.6
G	8.388	3.762	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5.8
Q	8.088	4.199	1.803	1.922	2.159	/	/	/	/	/	7.448/ 6.746	7.5
I	8.155	3.955	1.667	/	1.319	1.028	0.753	0.690	/	/	7.595/ 7.021	7.9

7.2.3 Synthese des Cy3-markierten Peptids **2+Cy3**



Charakterisierung:

rosafarbener Feststoff

MW = 1263.60 g/mol

$C_{67}H_{98}N_{12}O_{12}$

MALDI-TOF-MS [m/z]: 1262.5 ($M+H^+$)

Es wurden 1.0 mg des NHS-aktivierten Cy3-Fluorophors (1.7 µmol) in 10 µL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.15 mg (0.18 µmol) Peptid **2**, gelöst in 100 µL 1 M Tris-Puffer (pH 8.2) hinzugegeben und für 4 Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert und mittels Gelfiltration gereinigt. Dazu wurde die Reaktionslösung mit einer Superdex Peptide 10/300GL Gelfiltrationssäule (MWCO = 7000 Da, CV = 24 mL) der Firma GE Healthcare aufgetrennt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.4 mL/min bei einem Druck von 13 bar, als Elutionsmittel diente Wasser. Die Fraktionen wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert (AAV 7) und gefriergetrocknet. Es konnten 1.74 mg (1.38 µmol, 79%) des rosafarbenen Feststoffes **2+Cy3** erhalten werden.

7.3 Kultur humaner Zellen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Zellkultur diente zur Zucht humaner Zellen, die der Durchflusszytometrie, der Oberflächenplasmonenresonanz und den STDD-NMR-Messungen Anwendung fanden. Die für die GHOST(3)-Hi5- und Parental-Zelllinien angewandte Zellzucht war identisch und wird deshalb allgemein gefasst.

Die Kultur humaner Zellen wurde stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Aliquot von Zellen, das bei -80 °C eingefroren waren, aufgetaut. Dieses Aliquot wurde in 4 mL Wachstumsmedium (90% RPMI oder DMEM, 10% FKS und 1% Pen/Strep) aufgenommen und in 4 Kulturflaschen (175 cm^2) mit jeweils 25 mL Wachstumsmedium überführt. Zur Vermehrung der Zellen wurden diese in einem Brutschrank bei 37 °C, 100%

relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt, um aus dem Einfriermedium vorhandenes DMSO zu entfernen.
Nach zwei bis drei Tagen, wenn die adhärent wachsenden Zellen 95% Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die adhärenten Zellen mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 5 mL Trypsin hinzugegeben und für 5 Minuten bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 12 mL Nährmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die gelösten Zellen in Lösung zentrifugiert (4 °C, 1100 U/min, 4 min). Das Zellpellet wurde erhalten, indem der Überstand abgenommen wurde. Jeweils zwei Zellpellets wurden in 1 mL Einfriermedium überführt und bei -80 °C gelagert. In die bereits verwendeten Kulturflaschen wurde erneut Medium gegeben, um weitere Zellen zu kultivieren.
Die Zellkulturen wurden gelegentlich stichprobenartig auf Mycoplasmen untersucht.

Zum Zählen der Zellen und zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die erhaltenen Zellpellets in PBS-Puffer aufgenommen, so dass das Gesamtvolumen 1000 µL betrug. Davon wurden 10 µL entnommen und diese mit weiteren 30 µL PBS-Puffer verdünnt. Von den 40 µL Zelllösung wurden 10 µL Lösung mit 10 µL Trypanblau versetzt. Von den 20 µL der nun eingefärbten Zellen in PBS-Puffer wurden 10 µL in eine Neubauerzählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden alle vitalen Zellen in den vier Quadraten n_Z der Zählkammer gezählt und anschließend die Konzentration in Zellen/mL berechnet (Gleichung 10).

$$\left(\frac{n_Z}{4}\right) \cdot 10000 \cdot 4 \cdot 2 = Zellen / mL$$

Gleichung 10: Berechnung zur Bestimmung der Zellkonzentration.

7.4 SPR-Bindungsstudien

Alle Oberflächenplasmonenresonanz Bindungsstudien wurden an einem Biacore *J* der Firma GE Healthcare durchgeführt. Es wurden CM3-Chips der Firma GE Healthcare und SCB CMDP-Chips der Firma Xantec verwendet, die jeweils zwei Flusszellen besitzen. Als Laufmittel diente PBS-Puffer.

7.4.1 Immobilisierungen der Peptide

Zur Immobilisierung der Peptide wurde zuerst der Chip in das SPR-Gerät überführt. Zunächst fand eine Aktivierung der Chipoberfläche mit EDC und NHS für 12 Minuten auf beiden Flusszellen statt. Anschließend erfolgte die Immobilisierung der Peptide auf der ersten

Flusszelle, wobei eine Immobilisierung von 250 fmol Substanz angestrebt wurde. Dazu wurde eine Peptidstammlösung (1mg/mL) mit Acetatpuffer (pH = 4-5) versehen. Die Immobilisierung der sauren Peptidlösungen erfolgte für sechs Minuten und wurde über mehrere Zyklen durchgeführt. Dabei wurde nach jedem Zyklus das System mit PBS-Puffer gespült, um nicht kovalent gebundenes Immobilisat zu entfernen. Der pH-Wert des Acetatpuffers variierte je nach *pI*-Wert des Peptids und Zyklus der Immobilisierung, wobei der pH-Wert des Acetatpuffers mit steigendem Immobilisierungszyklus erniedrigt wurde. Dabei war zu beachten, dass die Belegung des Peptids in einem pH-Bereich erfolgt, der zwischen dem *pI*-Wert des Peptids und dem pH-Wert der Chipoberfläche (pH = 3.5) liegt. Nach etwa 30 Minuten wurde die Immobilisierung beendet. Es folgte der *capping*-Schritt, in dem über beide Flusszellen für 8 Minuten eine 1 M Ethanolamin/HCl-Lösung geleitet wurde.

Daraufhin konnte die Belegung des Peptids ermittelt werden (Gleichung 11). Dazu wurden die Differenz der RU-Werte der ersten Flusszelle (ΔRU1) und die Differenz der RU-Werte der zweiten Flusszelle (ΔRU2) vor der Aktivierung und nach dem *capping* berechnet. Aus den erhaltenen Differenzen konnte unter Bildung der Gesamtdifferenz die Belegung in RU erhalten werden, die ihrerseits in die immobilisierte Stoffmenge des Peptids umgerechnet wurde. Dazu wurde angenommen, dass 1 RU gleich 1 pg Peptid entspricht.

$$\Delta RU1 = RU1_{capping} - RU1_{Aktivierung}$$
$$\Delta RU2 = RU2_{capping} - RU2_{Aktivierung}$$
$$Belegung[RU] = \Delta RU1 - \Delta RU2$$

Gleichung 11: Berechnung der Peptidbelegung aus den RU-Werten der Immobilisierung.

In Tabelle 18 sind zur Übersicht alle Chipbelegungen der verwendeten Peptide angeführt.

Tabelle 18: Übersicht der immobilisierten Peptide an SPR-Chips. Der pH-Wert des zu verwendenden Acetatpuffers sollte während der Belegung zwischen dem theoretischen *pI*-Wert und dem pH-Wert der Chipoberfläche (pH = 3.5) liegen. Die erreichte Belegung ist in [RU] und der entsprechenden Stoffmenge angegeben.

Peptid	SPR-Chip	*pI* (theoretisch)	Belegung [RU, fmol]
2	GE Healthcare	4.00	66.7 RU = 81.1 fmol
3	GE Healthcare	8.80	31.2 RU = 53.2 fmol
4	Xantec	5.52	152.2 RU = 144.6 fmol
5	GE Healthcare	4.00	119.4 RU = 162.7 fmol
6	Xantec	3.79	180.5 RU = 138.5 fmol
11	Xantec	4.00	144.6 RU = 153.3 fmol

7.4.2 Messungen mit Zellen

Die Parental- und GHOST(3)-Hi5-Zellen wurden vorab gemäß 7.3 gezählt und daraufhin wurde eine Konzentrationsreihe von 3600, 1800, 900, 360 und 36 Zellen/µL mit PBS-Puffer erstellt. Der mit dem Peptid immobilisierte Chip wurde im Gerät equilibriert, bis sich eine Temperatur von 25 °C einstellte. Es wurden von jeder Konzentration, beginnend mit der höchsten, drei Zyklen aufgenommen, die jeweils 12 Minuten dauerten und eine Flussgeschwindigkeit von 15 µL/min aufwiesen. Dabei wurden die Zelllösungen über beide Flusszellen geleitet und somit die Sensorgramme beider Zellen erfasst. Simultan wurde mittels der Software die Differenz der Sensorgramme detektiert.

Nach Beendigung der Injektion wurde nach jedem Zyklus mit einer 0.5%igen SDS-Lösung für 4 Minuten regeneriert. Bei hohen Konzentrationen wurde ebenfalls ein Waschschritt eingefügt, bei dem die Pufferlösung mit höherer Flussgeschwindigkeit durch das System gespült wird, um Zellrückstände zu entfernen. Nach der Regeneration wurde solange gewartet, bis sich die Basislinie wieder an ihrem Anfangswert befand.

Alle zu analysierenden Peptide wurden mehrfach mit den Zellkonzentrationen von 3600, 1800, 900, 360 und 36 Zellen/µL vermessen.

7.5 Durchflusszytometriemessungen

7.5.1 Quantitative Durchflusszytometriemessungen

Die Parental- und GHOST(3)-Hi5-Zellen wurden, wie in 7.3 beschrieben, kultiviert und geerntet und anschließend gezählt. Anschließend wurden alle Zelllösungen auf eine einheitliche Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ Zellen/mL gebracht. Pro Zelllinie wurde die Hälfte der Lösung unbehandelt gelassen und bei den folgenden Messungen als Negativkontrolle verwendet. Von der anderen Hälfte wurden jeweils 100 µL abgenommen und für 25 Minuten unter Lichtausschluss und Eiskühlung mit 25 µL PE-*mouse*-CD195 Antikörperlösung versehen. Diese Lösung wurde anschließend zentrifugiert (4 °C, 1100 U/min, 2 min), der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in PBS-Puffer aufgenommen. Die QuantiBrite™ PE-*Beads* wurden ebenfalls in PBS-Puffer suspendiert.
Die erhaltenen Suspensionen wurden durchmischt und im FL2-PE-A-Kanal des FACS CantoII vermessen.

7.5.2 Durchflusszytometriemessungen mit fluoreszenzmarkiertem Peptid **2+Cy3**

Es wurden frisch geerntete GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen unter dem Mikroskop gezählt und jeweils eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ Zellen/mL Zelllösung eingestellt. Es wurden 1.3 mg (1.0 µmol) **2+Cy3** in 100 µL PBS aufgenommen und eine Verdünnungsreihe von 10 mM, 1 mM, 500µM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 500 nM und 100 nM eingestellt. Die jeweiligen Konzentrationen des fluorophormarkierten Peptids **2+Cy3** wurden zu jeweils 100 µL GHOST(3)-Hi5-Zelllösung hinzugegeben. Weiterhin wurden Lösungen der Parentalzellen mit einer Konzentration von einmal 10 mM und einmal 100 nM versehen. Nach 30 Minuten wurden alle Lösungen zentrifugiert (4 °C, 1100 U/min, 2 min) und erneut in 200 µL PBS-Puffer aufgenommen. Die erhaltenen, durchmischten Zell-Peptid-Suspensionen wurden an einem FACS CantoII im FL2-PE-Kanal vermessen.
Bei der zweiten Messung wurden ebenfalls GHOST(3)-Hi5-Zellen frisch geerntet, gezählt und eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ Zellen/mL, aufgenommen in PBS-Puffer, eingestellt. Jeweils 20 µL einer Konzentrationsreihe von 12.0, 9.6, 7.7, 6.3, 3.1, 1.3, und 0.75 mM **2+Cy3**, gelöst in PBS-Puffer, wurde mit 100 µL der angesetzten Zelllösung für 30 Minuten eisgekühlt unter Lichtausschluss inkubiert, zentrifugiert (4 °C, 1100 U/min, 2 min) und in 200 µL PBS-Puffer resuspendiert.

7.6 STDD-NMR-Spektroskopie

7.6.1 Präparation von Liposomen

Es wurde jeweils mit $1 \cdot 10^7$ Zellen von GHOST(3)-Hi5- und Parentalzellen gearbeitet. Unter der Annahme, dass 40000 Rezeptoren pro Zelle vorhanden sind, ergab dies eine Konzentration von 58 nM CCR5-Rezeptoren.

Die Zellen wurden vorab zentrifugiert (4 °C, 1100 U/min, 2 min), das Pellet viermal mit jeweils 5 mL LUV-NMR-Puffer gewaschen und das erhaltene Pellet in 6 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer und 200 µL Proteaseinhibitorenmix aufgenommen. Die Suspension wurde unter Eiskühlung für eine Stunde bei 50 bar in einem Stickstoffhomogenisator homogenisiert und anschließend zentrifugiert (4 °C, 2000 g, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden erneut zentrifugiert (4 °C, 10000 g, 90 min). Das Pellet wurde in 300 µL LUV-EDTA-NMR-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 11-mal durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 400 nm und abschließend 21-mal durch einen Filter mit einem Porendurchmesser mit 100 nm extrudiert.

7.6.2 STDD-NMR-Titration

Die NMR-Spektren wurden an einem 700-MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von 285 K mit dem Pulsprogramm *stdddiffesgp* aufgenommen. Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte durch eine *excitation-sculpting*-Pulssequenz, der Einstrahlpunkt der ^{1}H-NMR-Spektren lag bei den *on-resonance*-Spektren bei -1.0 ppm und bei den *off-resonance*-Spektren bei 40 ppm. Es wurden jeweils 4 *dummyscans* und 4096 *scans* aufgenommen. Von der Liposomensuspension mit einer Konzentration von 58 nM CCR5-Rezeptoren, gelöst in LUV-EDTA-NMR-Puffer, wurden 150 µL entnommen. Dies entspricht einer Zellkonzentration von $17 \cdot 10^8$ Zellen/100 µL. Es wurde für die Titration ein 3 mm-*match*-Röhrchen verwendet. Für die Titration mit Liposomen aus GHOST(3)-Hi5-Zellen wurde eine Ligandkonzentrationsreihe von 5, 10, 15, 20 und 36.5 mM, gelöst in LUV-EDTA-NMR-Puffer, vermessen. Um das Peptid vollständig zu lösen, wurden 2 µL H_2O/D_2O (9:1, pH 3.0) hinzugegeben. Die Liposomen aus Parentalzellen wurden ebenfalls mit einer Zellkonzentration von $17 \cdot 10^8$ Zellen/100 µL vermessen. Weiterhin wurde diese Liposomensuspension mit 15 mM Ligand, gelöst in LUV-EDTA-NMR-Puffer, vermessen.

Mit Hilfe der Software Topspin 2.1 wurde das *on-resonance*-Spektrum von dem *off-resonance*-Spektrum der jeweiligen Ligandkonzentration subtrahiert. Das resultierende

STD-FID wurde nach einer Phasenkorrektur zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit einer Exponentialfunktion multipliziert, die eine Linienverbreiterung von 2 Hz verursachte. Daraufhin wurde das dadurch erhaltene STD-NMR-Spektrum von dem STD-NMR-Spektrum ohne Ligand abgezogen, um die STDD-NMR-Spektren der einzelnen Ligandkonzentrationen zu erhalten.

7.7 Konformationsanalyse

7.7.1 EASYROESY-Spektren und Berechnung der Aufbaukurven

Die EASYROESY-Spektren des Peptids **2** wurden mit dem Pulsprogramm *easyroesyyesgp2.th* (9.2 Pulsprogramm EASYROESY) aufgenommen. Die Wasserunterdrückung erfolgte durch eine *excitation-sculpting*-Pulssequenz. Die Konzentration des Peptids betrug 2.4 µM in einer H_2O/D_2O (9:1)-Lösung mit einem pH-Wert von 3.0. An einem 500-MHz-Spektrometer wurden die EASYROESY-Spektren mit Mischzeiten von 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 1200, 1600 und 2000 ms bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen. Es wurden jeweils 16 *dummyscans* und 40 *scans* aufgenommen.

Die Spektren wurden mit dem Programm TopSpin 2.1 ausgewertet. Dabei wurden die Integrale der ROEs automatisch gesetzt, der relative *threshold* lag bei 0.006, um die Signale bei einem Wert zu schneiden und nicht das Rauschen in die Integration mit einfließen zu lassen.

Um die Eigenrelaxation heraus zu normieren, wurde das Integral des Diagonalpeaks vom δ-Proton des Pro437 im Spektrum der Mischzeit von 50 ms als Eigenrelaxation definiert und somit als Normierungsfaktor gewählt. Zur Berechnung der Aufbaurate wurde die Summe aus Kreuzsignalen und dazugehörigem Diagonalpeak eines Protons gebildet und der prozentuale Anteil des Kreuzpeaks berechnet und normiert. Die Aufbaukurven wurden mit der Software QtiPlot erstellt, wobei beim Anpassen einer doppelt exponentielle Funktion (Gleichung 7) an die ermittelten Datenpunkte folgende Startwerte der Parameter gesetzt wurden: P0 = 1.0, P1 = 0.1 und P2 = 2.0.

7.7.2 Berechnung der ϕ-Winkel

Die Berechnung der Torsionswinkel erfolgte aus den skalaren Kopplungskonstanten ^3J des amidischen Protons mit dem α-Proton der dazugehörigen Aminosäure. Dazu wurde ein ^{1}H-NMR-Spektrum mit dem Pulsprogramm *zgesgp* aufgenommen, wobei die Unterdrückung des Wassersignals durch eine *excitation-sculpting*-Pulssequenz erfolgte. An einem

500-MHz-Spektrometer wurde das Peptid mit einer Konzentration von 2.4 µM in einer H_2O/D_2O (9:1)-Lösung und einem pH-Wert von 3.0 bei einer Temperatur von 300 K vermessen. Mit Hilfe des Programms Topspin 2.1 wurden die Kopplungskonstanten ermittelt, mit denen im Programm Excel mittels der Karplus-Gleichung (Gleichung 4) die ϕ-Winkel berechnet wurden. Die bis zu vier möglichen Ergebnisse der Torsionswinkel wurden anschließend im Ramachandran-Plot abgeglichen und einzig die Winkel der erlaubten Bereiche wurden in die Konformationsanalyse miteinbezogen.

7.7.3 DG-Rechnung

Aus den aus Aufbaukurven gewonnen Abstände wurden Abstandsbeschränkungen entwickelt, indem obere und untere Limits im Bereich von ±10% des gemessenen Wertes gesetzt wurden (Tabelle 7). Dabei wurden Methylenprotonen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, als Pseudoatom definiert. Die Torsionswinkel, die mit Hilfe eines ^{1}H-NMR-Spektrums ermittelt werden konnten, dienten als Vorlage der Winkelbeschränkungen (Tabelle 8), indem ein oberes Limit von +20% und ein unteres Limit von -20% des Wertes definiert wurde. Für Aminosäuren, deren Kopplungskonstante aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum nicht zugeordnet werden konnten, wurden Winkelbeschränkungen von 0 - (-180)° gesetzt. Für die beiden Proline wurden vorab deren ψ-Winkel bestimmt, wobei davon ausgegangen wurde; dass der Torsionswinkel gleich dem der PolyProlin-II-Helix mit einem Wert von 150° ist. Auch für die ψ-Winkel wurden Limits von ±20% gesetzt.

Zunächst wurden mit dem Programm CYANA 500 randomisierte Strukturen unter Einhaltung der Beschränkungen berechnet. Die 100 besten Strukturen wurden anschließend ausgewählt, um diese unter Verwendung der REDAC-Strategie erneut zu berechnen. In den ersten beiden REDAC-Zyklen mit 300 beziehungsweise 600 Iterationsschritten wurden Diederwinkelbeschränkungen erzeugt. Dabei wurde die lokale erlaubte Abweichung der definierten Beschränkungen für die jeweilige Aminosäure im ersten Schritt auf 0.8 Å und im zweiten Schritt auf 0.4 Å gesetzt. Die darauffolgenden beiden Zyklen umfassten 600 und 1000 Rechenschritte, in denen keine Diederwinkelbeschränkungen generiert wurden.

7.8 Homologie der C4-Region

Es wurde ein *Alignment* von 105452 Sequenzen der Familie gp120 (PF00516)[144] durchgeführt. Aus diesem *Alignment* wurden alle 45070 Sequenzen berücksichtigt, die innerhalb des Motives (AS 434-445) ausschließlich aus proteinogenen Aminosäuren bestehen. Dabei wurden sowohl

die zwei zum N- als auch die zwei zum C-Terminus angrenzenden Aminosäuren in die Betrachtung miteingeschlossen. Das *Alignment* wurde mit Hilfe des BLASTp-Algorithmus (*basic local alignment search tool protein-protein*)[148] durchgeführt. Dabei wurden sowohl Modelle (XM/XP) als auch Umweltproben (*uncultured/environmental sample sequences*) ausgeschlossen. Die Ergebnisse der absoluten Werte sind in Tabelle 19 wiedergegeben. Aus diesen Werten wurde eine Tabelle erstellt, in der die relativen, prozentualen Frequenzen > 1% berechnet wurden.

Zur Generierung eines Sequenzlogos[145] wurden aus den 45070 Sequenzen zufällige 10000 Sequenzen gewählt.

7.9 *Molecular Dynamics*-Simulationen

Die *Molecular Dynamics*-Simulationen wurden an einer HPZ600 Workstation mit einer Quadcore CPU mit dem Programm Maestro 9.0/Desmond durchgeführt. Als Kraftfeld wurde das OPLS_AA/2005 eingesetzt.

Als Startstruktur diente ein Homologiemodell des Komplexes aus CD4, CCR5 und gp120.[58] Der CD4-Rezeptor und die nichtbenötigten Aminosäuren des gp120 wurden entfernt, so dass nur noch der CCR5-Rezeptor und die Sequenz 436-443 des gp120 als Datei vorlagen.

Zunächst wurde eine *waterbox* mit orthorhombischen *boundary conditions* mit einem SPC-Lösungsmittelmodell und einer Salzkonzentration von 0.2 M NaCl aufgestellt. Die Größe der *waterbox* umfasste jeweils 484598 $Å^3$ mit 39000 Wassermolekülen.

Anschließend wurde eine MD-Simulation über 3.0 ns mit dem kanonischen NVT-Ensemble und einer Temperatur von 300 K aufgestellt. Die Aufnahmeintervalle betrugen 0.1 ps.

8. Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225, 319, 336 EUH066	210, 233, 305+351+338
Acetonitril		225, 302+312+332, 319	225, 302+312+332, 319
O-(Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat		228, 315, 319, 335	228, 315, 319, 335
Deuteriumoxid	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Dichlormethan		351	281, 308+313
Diethylether		EUH019, EUH066, 224, 302, 336	210, 233, 240, 241, 242, 243, 264, 280, 301+312, 303+361+353, 330, 370+378, 403+235, , 501
N,*N*-Di*iso*propylethylamin		225, 301, 314, 412	210, 273, 280, 301+330+331, 305+351+338
N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N´*-ethylcarbodiimidhydrochlorid		335, 315, 319	302+352, 305+351+338
N,*N*-Dimethylformamid		360D, 226, 332, 312, 319	360D, 226, 332, 312, 319
Dimethylsulfoxid	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
DMEM + Glutamax		315, 319, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338,

			312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
Dodecylsulfat Natriumsalz		302, 312, 315, 319, 335	261, 264, 280, 301+312, 302+352, 304+340, 305+351+338, 321, 330, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
Essigsäureanhydrid		226, 332, 302, 314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanolamin		302+312+332, 314	280, 302+352, 301+330+331, 305+351+338
Ethylamin-N,N,*N'*,*N'*-tetraacetat-d_{16}		319	264, 280, 305+351+338, 337+313
Fmoc-Aminosäurederivate	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Fmoc-Rink-Amid-AM-Polystyrolharz	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
N-Hydroxysuccinimid	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Kaliumchlorid	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Kaliumdihydrogenphosphat	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		

Natriumacetat	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Natriumchlorid	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
di-Natriumhydrogenphosphat	kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Piperidin		225, 331, 311, 314	210, 280, 302+352, 301+330+331, 305+351+338
Pyridin		225, 302+352+332	210, 233, 302+352
Salzsäure (32%)		332, 314, 412	271, 273, 301+330+331, 305+351+338
Sinapinsäure		315, 319, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
Trifluoressigsäure		332, 314, 412	271, 273, 301+330+331, 305+351+338
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan		315, 319, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362,

			403+233, 405, 501
Tri*iso*propylsilan		226	210, 260, 262
Trypanblau		350	201, 202, 281, 308+313, 405, 501
Trypsin		315, 319, 334, 335	261, 264, 280, 285, 302+352, 304+340, 305+351+338, 321, 332+313, 337+313, 342+311, 362, 403+233, 405, 501

9. Anhang

9.1 Homologie des gp120

Tabelle 19: Homologie der Sequenz 434-445 der Familie gp120 (PF00516) aus der Pfam-Datenbank[144] des *Wellcome-Trust-Sanger-Institute*. Angegeben sind die absoluten Werte der Vorkommnisse aller Aminosäuren innerhalb der untersuchten Sequenz.

AS	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445
A	10	3	4271	217	12	5	5480	17	212	1	72	2
R	7		1	3	3	2148	14451	88	1156	4	19698	67
N	7	11	68	116		14	295		6567	9	5448	
D		12	5	1		1	270	12	1694	1	40	
C	8	48	5						1		2	44912
E	1	3					6890	117	1623		480	
Q							3879		18267	1	1012	
G	1	1	8		1	13	416	44825	19		137	8
H		65	1	3	1	5	10		648		32	
I	3697	2	1			41963	54		2642	42116	270	1
L	177	2	1916	74	17	26	10		3521	2547	8	4
K	17	3				8	5962	3	1832	1	5096	
M	38596	8				13	28		91	17	173	
F	5	59	1		3	14			14	17		6
P	3	4	129	44371	44963	9	1201	1	1764	5	2	
S	2	40	88	277	60	257	5881	4	915	15	3681	21
T	472		102	6	10	194	213		392	31	8623	1
W						2			90		140	15
Y	2	44804	1						434		68	25
V	2065	5	30	2		398	30	3	3188	305	88	8

9.2 Pulsprogramm EASYROESY

Das Pulsprogramm EASYROESY wurde dahingehend verändert, dass das Wassersignal mit Hilfe einer *excitation-sculpting*-Pulssequenz unterdrückt wurde.

easyroesyyesgp2.th:

```
;EASYroesy
;2D symmetrized ROESY with adiabatic spinlocks for mixing
;symmetrization: Schleucher et al., J. Magn. Reson A, 1995, 112, 144-151.
;implementation with adiabatic pulses: Thiele et al., Chem Eur J. 2008.
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
"cnst1=0"
"cnst3=cnst2/1.732" ;calculate low- and highfield RF offsets
"cnst4=-cnst2/1.732"
"d14=de+p1*2/3.1416+54u"


1 ze
2 d11
3 d12 fq=cnst1(sfo hz):f1 ;set RF carrier to spectrum middle
  d12 pl9:f1
  d1 cw:f1 ph29 ;solvent presaturation

  d13 do:f1
  d12 pl1:f1
  (p1 ph1):f1
  d0
  (p1 ph0):f1
  d13

  p16:gp1 ;purge gradient
  d16 fq=cnst3(sfo hz):f1 ;switch RF carrier to lowfield position
  (p11:sp1 ph0):f1 ;adiabatic ramp, time point a (1)
  d13*0.5
  (p7:sp2 ph0):f1 ;lowfield spinlock, tau_m/2 (2)
  d13*0.5
  (p11:sp3 ph0):f1 ;adiabatic ramp, time point b (3)
  d13
  d13 fq=cnst4(sfo hz):f1
  (p11:sp4 ph0):f1 ;adiabatic ramp, time point c (4)
  d13*0.5
  (p7:sp5 ph0):f1 ;highfield spinlock, tau_m/2 (5)
  d13*0.5
  (p11:sp6 ph0):f1 ;adiabatic ramp, time point d (6)
  d13
```

```
  p16:gp3 ;purge gradient
  d16 fq=cnst1(sfo hz):f1

  d12 pl1:f1
  p1 ph3

  50u UNBLKGRAD
  p17:gp4
  d17 pl0:f1
  (p40:sp10 ph5:r):f1
  4u
  d12 pl1:f1

  p2 ph6

  4u
  p17:gp4
  d17
  d14
  p17:gp5
  d17 pl0:f1
  (p40:sp10 ph7:r):f1
  4u
  d12 pl1:f1

  p2 ph8

  4u
  p17:gp5
  d17
  4u BLKGRAD

  go=2 ph31
  d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit


ph0= 0
ph1= 0 2
ph3= 0 0 2 2 1 1 3 3
ph4 =2
ph5=0
ph6=2
ph7=0
ph8=2
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
```

```
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl9 : f1 channel - power level for presaturation
;pl11, sp1-6: f1 channel - power level for ROESY-spinlock
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p7: f1 channel - pulse for ROESY spinlock, half mixing time
;p11: f1 channel - adiabatic ramps for spinlock
;p16: gradient pulses to purge undesired magnetization
;sp1,4 / sp3,6: adiabatic ramps to move magnetization to / from spin lock axis
;sp2, sp5: CW spinlock pulses
;d0 : incremented delay (2D) setting gives 90/-180 0/1st order phase in f1
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for B0 recovery after gradient [200 usec]
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;cnst1 offset for on-resonance pulses
;cnst2=field strength of spin lock in Hz
;cnst3, cnst4: off-resonant offsets for low- and highfield spinlocks
;calculations of cnst3, cnst4 gives spinlock 60 degrees off z axis
```

9.3 *Molecular Dynamics*-Simulation – *Simulation Quality Analysis*

9.3.1 *Simulation Quality Analysis* des Peptids **2** ^{436}APPIEGQI^{443}

Tabelle 20: Übersicht der *Simulation Quality Analysis* der MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443}. Es sind die Durchschnittswerte, inklusive deren Standardabweichung und deren Anstieg über die Simulation, der Gesamtenergie, der potentielle Energie, der Temperatur, des Drucks und des Volumens angegeben.

	Durchschnittswert	Standardabweichung	Anstieg [ps^{-1}]
Gesamtenergie [kcal/mol]	-118985.0	24.233	0.028
potentielle Energie [kcal/mol]	-148524.2	124.132	-0.080
Temperatur [K]	300.015	0.359	0.000
Druck [bar]	-1065.482	26.590	-0.013
Volumen [$Å^3$]	484597.99	0.000	0.000

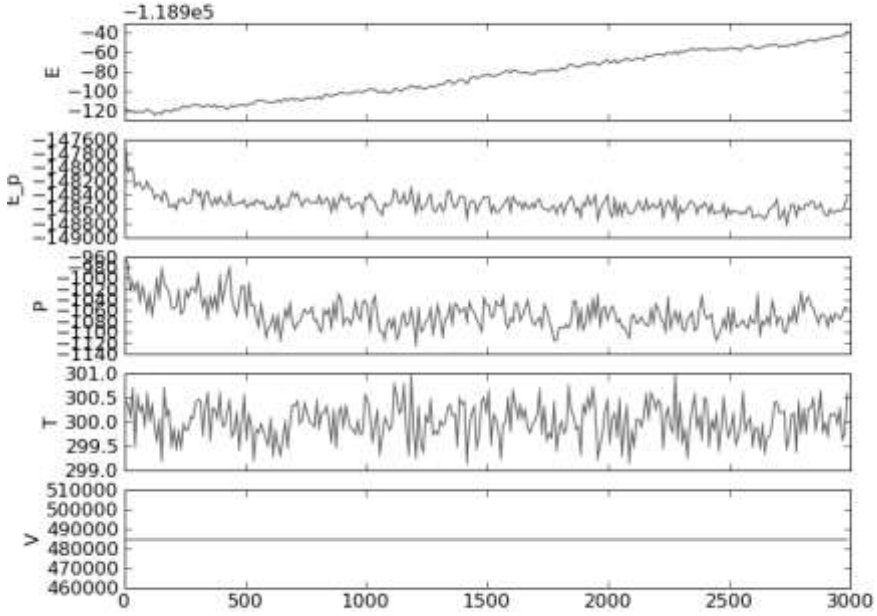


Abbildung 66: Zeitlicher Verlauf der Gesamtenergie, der potentiellen Energie, des Drucks, der Temperatur und des Volumens über die MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIEGQI^{443}. Die Energien sind in [kcal/mol], der Druck in [bar], die Temperatur in [K] und das Volumen in [$Å^3$] angegeben.

9.3.2 *Simulation Quality Analysis* des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443}

Tabelle 21: Übersicht der *Simulation Quality Analysis* der MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443}. Es sind die Durchschnittswerte, inklusive deren Standardabweichung und deren Anstieg über die Simulation, der Gesamtenergie, der potentielle Energie, der Temperatur.

	Durchschnittswert	Standardabweichung	Anstieg [ps^{-1}]
Gesamtenergie [kcal/mol]	-119213.4	19.530	0.022
potentielle Energie [kcal/mol]	-148594.9	125.669	-0.088
Temperatur [K]	299.963	0.342	0.000
Druck [bar]	-1070.551	27.873	-0.018
Volumen [$Å^3$]	484597.99	0.000	0.000

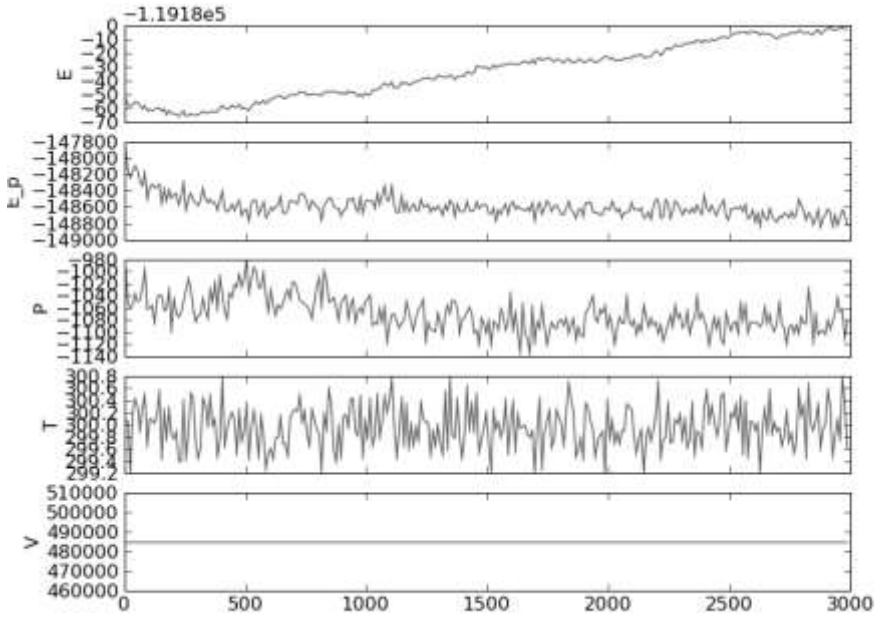


Abbildung 67: Zeitlicher Verlauf der Gesamtenergie, der potentiellen Energie, des Drucks, der Temperatur und des Volumens über die MD-Simulation des Peptids ^{436}APPIQGQI^{443}. Die Energien sind in [kcal/mol], der Druck in [bar], die Temperatur in [K] und das Volumen in [$Å^3$] angegeben.

10. Literatur

1. Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894,** *27*, 2985-2993.

2. Koshland, D. E., Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1958,** *44* (2), 98-104.

3. Fischer, M.; Hubbard, R. E., Fragment-based ligand discovery. *Molecular Interventions* **2009,** *9* (1), 22-30.

4. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001,** *46* (1-3), 3-26.

5. Oprea, T. I.; Davis, A. M.; Teague, S. J.; Leeson, P. D., Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2001,** *41* (5), 1308-1315.

6. Erlanson, D. A.; McDowell, R. S.; O'Brien, T., Fragment-Based Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004,** *47* (14), 3463-3482.

7. Zhang, S., Computer-Aided Drug Discovery and Development. In *Drug Design and Discovery*, Satyanarayanajois, S. D. D., Ed. Humana Press: 2011; Vol. 716, pp 23-38.

8. Yu, H.; Adedoyin, A., ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug Discovery Today* **2003,** *8* (18), 852-861.

9. Gottlieb, M., *Morbidity and Mortality Weekly Report* **1981,** *30*, 250-252.

10. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983,** *220* (4599), 868-871.

11. 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., Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **1984,** *224* (4648), 500-503.

12. WHO, Global summary of the HIV/AIDS epidemic. December 2009.

13. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., Johnson, P. R., An African primate lentivirus (SIVsmclosely related to HIV-2. *Nature* **1989,** *339* (6223), 389-392.

14. Sharp, P. M.; Hahn, B. H., The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2010,** *365* (1552), 2487-2494.

15. Gürtler, L., SIV als Quelle von HIV. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **2004,** *47* (7), 680-684.

16. Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U., *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2003; Vol. 2.

17. NAIAID, U. N. I. o. H. http://www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm.

18. Liu, J.; Bartesaghi, A.; Borgnia, M. J.; Sapiro, G.; Subramaniam, S., Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **2008,** *455* (7209), 109-113.

19. Zhu, P.; Winkler, H.; Chertova, E.; Taylor, K. A.; Roux, K. H., Cryoelectron Tomography of HIV-1 Envelope Spikes: Further Evidence for Tripod-Like Legs. *PLoS Pathog* **2008,** *4* (11), e1000203.

20. Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P.l D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., Wong-Staal, F., Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **1986,** *45* (5), 637-648.

21. Berger, E., And the Best Picture is — the HIV gp120 envelope, please! *Nature Structural Biology* **1998,** *5* (8), 671-674.

22. Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Robinson, J.; Sweet, R. W.; Sodroski, J.; Hendrickson, W. A., Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **1998,** *393* (6686), 648-659.

23. Sattentau, Q. J., HIV gp120: double lock strategy foils host defences. *Structure* **1998,** *6* (8), 945-949.

24. Da, L.-T.; Quan, J.-M.; Wu, Y.-D., Understanding of the Bridging Sheet Formation of HIV-1 Glycoprotein gp120. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009,** *113* (43), 14536-14543.

25. Lynch, R. M.; Shen, T.; Gnanakaran, S.; Derdeyn, C. A., Appreciating HIV Type 1 Diversity: Subtype Differences in Env. *AIDS Research and Human Retroviruses* **2009,** *25* (3), 237-248.

26. Curlin, M. E.; Zioni, R.; Hawes, S. E.; Liu, Y.; Deng, W.; Gottlieb, G. S.; Zhu, T.; Mullins, J. I., HIV-1 Envelope Subregion Length Variation during Disease Progression. *PLoS Pathog* **2010,** *6* (12), e1001228.

27. Lewis, J.; Balfe, P.; Arnold, C.; Kaye, S.; Tedder, R. S.; McKeating, J. A., Development of a Neutralizing Antibody Response during Acute Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and the Emergence of Antigenic Variants. *J. Virol.* **1998,** *72* (11), 8943-8951.

28. Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., Axel, R., The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **1986,** *47* (3), 333-348.

29. Tavassoli, A., Targeting the protein-protein interactions of the HIV lifecycle. *Chemical Society Reviews* **2011,** *40* (3), 1337-1346.

30. Sattentau, Q. J.; Moore, J. P., Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *The Journal of Experimental Medicine* **1991,** *174* (2), 407-415.

31. Pancera, M.; Majeed, S.; Ban, Y.-E. A.; Chen, L.; Huang, C.-c.; Kong, L.; Kwon, Y. D.; Stuckey, J.; Zhou, T.; Robinson, J. E.; Schief, W. R.; Sodroski, J.; Wyatt, R.; Kwong, P. D., Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010,** *107* (3), 1166-1171.

32. Cocchi, F.; DeVico, A. L.; Garzino-Demo, A.; Arya, S. K.; Gallo, R. C.; Lusso, P., Identification of RANTES, MIP-1α, and MIP-1β as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. *Science* **1995,** *270* (5243), 1811-1815.

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

34. Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M., CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology* **1999,** *17* (1), 657-700.

35. Bjorndal, A.; Deng, H.; Jansson, M.; Fiore, J.; Colognesi, C.; Karlsson, A.; Albert, J.; Scarlatti, G.; Littman, D.; Fenyo, E., Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.* **1997,** *71* (10), 7478-7487.

36. Lusso, P., HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* **2006,** *25* (3), 447-456.

37. Dubey, S.; Khalid, M.; Wesley, C.; Khan, S. A.; Wanchu, A.; Jameel, S., Downregulation of CCR5 on activated CD4 T cells in HIV-infected Indians. *Journal of Clinical Virology* **2008,** *43* (1), 25-31.

38. Dong, X.-N.; Chen, X.; Chen, Y.; Ablimit, A.; Ye, Z.; Wu, Y.; Chen, Y.-H., Short Communication: HIV Type 1 Phenotype, Tropism, and Sequence Patterns: Association and Preference. *AIDS Research and Human Retroviruses* **2005,** *21* (3), 234-238.

39. Pastore, C.; Nedellec, R.; Ramos, A.; Pontow, S.; Ratner, L.; Mosier, D. E., Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Switching: V1/V2 Gain-of-Fitness Mutations Compensate for V3 Loss-of-Fitness Mutations. *J. Virol.* **2006,** *80* (2), 750-758.

40. Sundaravaradan, V.; Das, S.; Ramakrishnan, R.; Sehgal, S.; Gopalan, S.; Ahmad, N.; Jameel, S., Role of HIV-1 subtype C envelope V3 to V5 regions in viral entry, coreceptor utilization and replication efficiency in primary T-lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *Virology Journal* **2007,** *4* (1), 126.

41. Coetzer, M.; Nedellec, R.; Salkowitz, J.; McLaughlin, S.; Liu, Y.; Heath, L.; Mullins, J. I.; Mosier, D. E., Evolution of CCR5 use before and during coreceptor switching. *J Virol* **2008,** *82* (23), 11758-66.

42. Bozek, K.; Thielen, A.; Sierra, S.; Kaiser, R.; Lengauer, T., V3 loop sequence space analysis suggests different evolutionary patterns of CCR5- and CXCR4-tropic HIV. *PLoS One* **2009,** *4* (10), e7387.

43. Etemad, B.; Fellows, A.; Kwambana, B.; Kamat, A.; Feng, Y.; Lee, S.; Sagar, M., HIV-1 V1-V5 envelope variants from the chronic phase of infection use CCR5 and fuse more efficiently than those from early after infection. *J. Virol.* **2009**, JVI.00925-09.

44. Dybowski, J. N.; Heider, D.; Hoffmann, D., Prediction of Co-Receptor Usage of HIV-1 from Genotype. *PLoS Comput Biol* **2010,** *6* (4), e1000743.

45. Rosen, O.; Samson, A. O.; Anglister, J., Correlated mutations at gp120 positions 322 and 440: Implications for gp120 structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2008,** *71* (3), 1066-1070.

46. Karlsson, A.; Parsmyr, K.; Sandstrom, E.; Fenyo, E. M.; Albert, J., MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Clin. Microbiol.* **1994,** *32* (2), 364-370.

47. O'Brien, W. A.; Koyanagi, Y.; Namazie, A.; Zhao, J.-Q.; Diagne, A.; ldler, K.; Zack, J. A.; Chen, I. S. Y., HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* **1990,** *348* (6296), 69-73.

48. Buzon, V.; Natrajan, G.; Schibli, D.; Campelo, F.; Kozlov, M. M.; Weissenhorn, W., Crystal Structure of HIV-1 gp41 Including Both Fusion Peptide and Membrane Proximal External Regions. *PLoS Pathog* **2010,** *6* (5), e1000880.

49. Dobrowsky, T. M.; Daniels, B. R.; Siliciano, R. F.; Sun, S. X.; Wirtz, D., Organization of Cellular Receptors into a Nanoscale Junction during HIV-1 Adhesion. *PLoS Comput Biol* **2010,** *6* (7), e1000855.

50. Lederman, M. M.; Penn-Nicholson, A.; Cho, M.; Mosier, D., Biology of CCR5 and Its Role in HIV Infection and Treatment. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **2006,** *296* (7), 815-826.

51. Centers for Disease Control; Division of HIV/AIDS Prevention, N. C. f. H. A., Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to <13 Years. *Recommendations and Reports* **2008,** *57* (RR10), 1-8.

52. Alkhatib, G.; Ahuja, S. S.; Light, D.; Mummidi, S.; Berger, E. A.; Ahuja, S. K., CC Chemokine Receptor 5-Mediated Signaling and HIV-1 Co-receptor Activity Share Common Structural Determinants: CRITICAL RESIDUES IN THE THIRD EXTRACELLULAR LOOP SUPPORT HIV-1 FUSION. *Journal of Biological Chemistry* **1997,** *272* (32), 19771-19776.

53. Alkhatib, G.; Locati, M.; Kennedy, P. E.; Murphy, P. M.; Berger, E. A., HIV-1 Coreceptor Activity of CCR5 and Its Inhibition by Chemokines: Independence from G Protein Signaling and Importance of Coreceptor Downmodulation. *Virology* **1997,** *234* (2), 340-348.

54. Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K., The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2009,** *459* (7245), 356-363.

55. Vassilatis, D. K.; Hohmann, J. G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J. E.; Mortrud, M. T.; Brown, A.; Rodriguez, S. S.; Weller, J. R.; Wright, A. C.; Bergmann, J. E.; Gaitanaris, G. A., The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003,** *100* (8), 4903-4908.

56. Farzan, M.; Mirzabekov, T.; Kolchinsky, P.; Wyatt, R.; Cayabyab, M.; Gerard, N. P.; Gerard, C.; Sodroski, J.; Choe, H., Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of CCR5 Facilitates HIV-1 Entry. *Cell* **1999,** *96* (5), 667-676.

57. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Trong, I. L.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M., Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2000,** *289* (5480), 739-745.

58. Scherres, W. Molecular Modelling des humanen Chemokin-Corezeptors CCR5 mit anschließender Docking-Studie der V3-Loop des gp120 aus dem HIV-1. Universität Hamburg, Hamburg, 2004.

59. Doms, R. W.; Peiper, S. C., Unwelcomed Guests with Master Keys: How HIV Uses Chemokine Receptors for Cellular Entry. *Virology* **1997,** *235* (2), 179-190.

60. Lee, B.; Montaner, L. J., Chemokine immunobiology in HIV-1 pathogenesis. *J Leukoc Biol* **1999,** *65* (5), 552-565.

61. Samson, M.; Labbe, O.; Mollereau, C.; Vassart, G.; Parmentier, M., Molecular Cloning and Functional Expression of a New Human CC-Chemokine Receptor Gene†. *Biochemistry* **1996,** *35* (11), 3362-3367.

62. Zhao, J.; Ma, L.; Wu, Y.-L.; Wang, P.; Hu, W.; Pei, G., Chemokine receptor CCR5 functionally couples to inhibitory G proteins and undergoes desensitization. *Journal of Cellular Biochemistry* **1998,** *71* (1), 36-45.

63. Doranz, B.; Lu, Z.; Rucker, J.; Zhang, T.; Sharron, M.; Cen, Y.; Wang, Z.; Guo, H.; Du, J.; Accavitti, M.; Doms, R.; Peiper, S., Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **1997,** *71* (9), 6305-6314.

64. Liu, R.; Paxton, W. A.; Choe, S.; Ceradini, D.; Martin, S. R.; Horuk, R.; MacDonald, M. E.; Stuhlmann, H.; Koup, R. A.; Landau, N. R., Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* **1996,** *86* (3), 367-377.

65. Lam, S. N.; Acharya, P.; Wyatt, R.; Kwong, P. D.; Bewley, C. A., Tyrosine-sulfate isosteres of CCR5 N-terminus as tools for studying HIV-1 entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008,** *16* (23), 10113-10120.

66. Huang, C.-c.; Lam, S. N.; Acharya, P.; Tang, M.; Xiang, S.-H.; Hussan, S. S.-u.; Stanfield, R. L.; Robinson, J.; Sodroski, J.; Wilson, I. A.; Wyatt, R.; Bewley, C. A.; Kwong, P. D., Structures of the CCR5 N Terminus and of a Tyrosine-Sulfated Antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* **2007,** *317* (5846), 1930-1934.

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

68. Lee, B.; Sharron, M.; Blanpain, C.; Doranz, B. J.; Vakili, J.; Setoh, P.; Berg, E.; Liu, G.; Guy, H. R.; Durell, S. R.; Parmentier, M.; Chang, C. N.; Price, K.; Tsang, M.; Doms, R. W., Epitope Mapping of CCR5 Reveals Multiple Conformational States and Distinct but Overlapping Structures Involved in Chemokine and Coreceptor Function. *Journal of Biological Chemistry* **1999,** *274* (14), 9617-9626.

69. Rizzuto, C. D.; Wyatt, R.; Hernández-Ramos, N.; Sun, Y.; Kwong, P. D.; Hendrickson, W. A.; Sodroski, J., A Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding. *Science* **1998,** *280* (5371), 1949-1953.

70. Moore, J. P.; Thali, M.; Jameson, B. A.; Vignaux, F.; Lewis, G. K.; Poon, S. W.; Charles, M.; Fung, M. S.; Sun, B.; Durda, P. J., Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: probing the structure of the C4 and V4 domains and the interaction of the C4 domain with the V3 loop. *J. Virol.* **1993,** *67* (8), 4785-4796.

71. Wyatt, R.; Thali, M.; Tilley, S.; Pinter, A.; Posner, M.; Ho, D.; Robinson, J.; Sodroski, J., Relationship of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable loop to a component of the CD4 binding site in the fourth conserved region. *J. Virol.* **1992,** *66* (12), 6997-7004.

72. Kalev, I.; Mikelsaar, A. V.; Beckman, L.; Tasa, G.; Pärlist, P., High Frequency of the HIV-1 Protective CCR5 Δ32 Deletion in Native Estonians. *European Journal of Epidemiology* **2000,** *16* (12), 1107-1109.

73. Gorry, P. R.; Zhang, C.; Wu, S.; Kunstman, K.; Trachtenberg, E.; Phair, J.; Wolinsky, S.; Gabuzda, D., Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5[Delta]32 allele. *The Lancet* **2002,** *359* (9320), 1832-1834.

74. Choi, W.-T.; An, J., Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **2011**, ebm.2011.010389.

75. Hütter, G.; Ganepola, S., The CCR5-delta32 polymorphism as a model to study host adaptation against infectious diseases and to develop new treatment strategies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **2011**, ebm.2011.010241.

76. WHO, U., UNAIDS, Towards universal access: Scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. **2010**, 53.

77. Bean, P., New Drug Targets for HIV. *Clinical Infectious Diseases* **2005,** *41* (Supplement 1), S96-S100.

78. Colin, L.; Van Lint, C., Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* **2009,** *6* (1), 111.

79. Menéndez-Arias, L., Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Research* **2010,** *85* (1), 210-231.

80. Wu, Y., Chemokine control of HIV-1 infection: Beyond a binding competition. *Retrovirology* **2010,** *7* (1), 86.

81. Vangelista, L.; Secchi, M.; Lusso, P., Rational design of novel HIV-1 entry inhibitors by RANTES engineering. *Vaccine* **2008,** *26* (24), 3008-3015.

82. Hartley, O.; Gaertner, H.; Wilken, J.; Thompson, D.; Fish, R.; Ramos, A.; Pastore, C.; Dufour, B.; Cerini, F.; Melotti, A.; Heveker, N.; Picard, L.; Alizon, M.; Mosier, D.; Kent, S.; Offord, R., Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: Development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004,** *101* (47), 16460-16465.

83. Saita, Y.; Kodama, E.; Orita, M.; Kondo, M.; Miyazaki, T.; Sudo, K.; Kajiwara, K.; Matsuoka, M.; Shimizu, Y., Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist. *The Journal of Immunology* **2006,** *177* (5), 3116-3122.

84. Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B.; Macartney, M.; Mori, J.; Rickett, G.; Smith-Burchnell, C.; Napier, C.; Webster, R.; Armour, D.; Price, D.; Stammen, B.; Wood, A.; Perros, M., Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005,** *49* (11), 4721-4732.

85. Klibanov, O. M., Vicriviroc, a CCR5 antagonist for the potential treatment of HIV infection. *Crurr Opin Investig Drugs* **2009,** *10* (8), 845-859.

86. Nichols, W. G.; Steel, H. M.; Bonny, T.; Adkison, K.; Curtis, L.; Millard, J.; Kabeya, K.; Clumeck, N., Hepatotoxicity Observed in Clinical Trials of Aplaviroc (GW873140). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008,** *52* (3), 858-865.

87. Jayasuriya, H.; Herath, K. B.; Ondeyka, J. G.; Polishook, J. D.; Bills, G. F.; Dombrowski, A. W.; Springer, M. S.; Siciliano, S.; Malkowitz, L.; Sanchez, M.; Guan, Z.; Tiwari, S.; Stevenson, D. W.; Borris, R. P.; Singh, S. B., Isolation and Structure of Antagonists of Chemokine Receptor (CCR5). *Journal of Natural Products* **2004,** *67* (6), 1036-1038.

88. Scholten, D. J.; Canals, M.; Maussang, D.; Roumen, L.; Smit, M. J.; Wijtmans, M.; de Graaf, C.; Vischer, H. F.; Leurs, R., Pharmacological Modulation of Chemokine Receptor Function. *British Journal of Pharmacology* **2011**, no-no.

89. Merrifield, B., Solid Phase Synthesis. *Science* **1986,** *232* (4748), 341-347.

90. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963,** *85* (14), 2149-2154.

91. Carpino, L. A., Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry* **1972,** *37* (22), 3404-3409.

92. Wellings, D. A.; Atherton, E., [4] Standard Fmoc protocols. In *Methods in Enzymology*, Gregg, B. F., Ed. Academic Press: 1997; Vol. Volume 289, pp 44-67.

93. 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 ert-butyloxycarbonyl amino acids. *Analytical Biochemistry* **1992,** *200* (2), 301-309.

94. 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 Letters* **1989,** *30* (21), 2739-2742.

95. Focused microwave instrumentation from CEM corporation. *Molecular Diversity* **2003,** *7*, 281-286.

96. Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T., Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *The Journal of Organic Chemistry* **1992,** *57* (18), 4781-4784.

97. Jönsson, U., Fägerstam, L, Ivarsson, B, Johnsson, B, Karlsson, R, Lundh, K, Löfås, S, Persson, B, Roos, H, Rönnberg, I, Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **1991,** *11* (5), 620-7.

98. Turbadar, T., Complete Absorption of Light by Thin Metal Films. *Proceedings of the Physical Society* **1959,** *73* (1), 40.

99. Ritchie, R. H., Photon excitation of surface plasmons. *Surface Science* **1965,** *3* (5), 497-499.

100. Piliarik, H. V., and Jirˇí Homola, Surface Plasmon Resonance Biosensing. *Methods in Molecular Biology: Biosensors and Biodetection* **2009,** *503*, 65-88.

101. Rebecca, L. R.; David, G. M., BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION* **2001,** *14* (4), 223-228.

102. Biacore, Biacore Sensor Surface Handbook. 2003.

103. A. Raffael, T. N., *Grundlagen der Duchflußzytometrie*. R. Schmidt, G. Rothe: Stuttgart, 1994.

104. Ormerod, M., *Flow Cytometry: A Practical Approach*. O. U. Press: New York, 1990.

105. MCR Clinical Sciences Centre, Imperial College London, London, 2011.

106. Lenkei, R.; Gratama, J. W.; Rothe, G.; Schmitz, G.; hautcourt, J. L. D.; Årekrans, A.; Mandy, F.; Marti, G., Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry. *Cytometry* **1998,** *33* (2), 188-196.

107. Vogt, R. F.; Cross, G. D.; Henderson, L. O.; Phillips, D. L., Model system evaluating fluorescein-labeled microbeads as internal standards to calibrate fluorescence intensity on flow cytometers. *Cytometry* **1989,** *10* (3), 294-302.

108. Kulwinder, K. P.; Edward, T. J.; Sujata, B. I., Performance evaluation of quantiBRITE phycoerythrin beads. *Cytometry* **2001,** *45* (4), 250-258.

109. Lee, B.; Doms, R. W., Quantification of HIV/SIV Coreceptor Expression. In *Cellular Aspects of HIV Infection*, John Wiley & Sons, Inc.: 2001; pp 53-66.

110. Zenger, V. E.; Vogt, R.; Mandy, F.; Schwartz, A.; Marti, G. E., Quantitative flow cytometry: Inter-laboratory variation. *Cytometry* **1998,** *33* (2), 138-145.

111. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **1999,** *38* (12), 1784-1788.

112. Mayer, M.; Meyer, B., Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *Journal of the American Chemical Society* **2001,** *123* (25), 6108-6117.

113. Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R.; Meyer, B., Direct Observation of Ligand Binding to Membrane Proteins in Living Cells by a Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR Spectroscopy Method Shows a Significantly Higher Affinity of Integrin αIIbβ3 in Native Platelets than in Liposomes. *Journal of the American Chemical Society* **2004,** *127* (3), 916-919.

114. Kötzler, M. NMR-spektroskopische Analyse der Bindung von Fragmenten an Proteinen. Universität Hamburg, Hamburg, 2009.

115. Lautz, J., Kessler, H., Blaney, J. M., Scheek, R. M., Van Gunsteren, W. F., Calculating three-dimensional molecular structure from atom-atom distance information: cyclosporin A. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1989,** *33* (4), 281-288.

116. Wang, A. C.; Bax, A., Determination of the Backbone Dihedral Angles Ï† in Human Ubiquitin from Reparametrized Empirical Karplus Equations. *Journal of the American Chemical Society* **1996,** *118* (10), 2483-2494.

117. Klebe, G., *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2009; Vol. 2.

118. Karplus, M., Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society* **1963,** *85* (18), 2870-2871.

119. Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V., Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1968,** *23*, 283-438.

120. LeMaster, D. M., Kay, L. E., Brünger, A. T., Prestegard, J. H., Protein dynamics and distance determination by NOE measurements. *FEBS Letters* **1988,** *236* (1), 71-76.

121. Neuhaus, D., Williamson, M. P., *The nuclear Overhause effect in structural and conformational analysis*. Wiley-VCH: University of Michigan, 2000; Vol. 2, p 619.

122. Vögeli, B.; Segawa, T. F.; Leitz, D.; Sobol, A.; Choutko, A.; Trzesniak, D.; van Gunsteren, W.; Riek, R., Exact Distances and Internal Dynamics of Perdeuterated Ubiquitin from NOE Buildups. *Journal of the American Chemical Society* **2009,** *131* (47), 17215-17225.

123. Solomon, I., Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Physical Review* **1955,** *99* (2), 559.

124. Claridge, T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Tetrahedron Organic Chemistry: 2009; Vol. 27.

125. Kumar, A., Wagner, G., Ernst, R. R., Wuethrich, K., Buildup rates of the nuclear Overhauser effect measured by two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy: implications for studies of protein conformation. *Journal of the American Chemical Society* **1981,** *103* (13), 3654-3658.

126. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley-Interscience: New York, 1986.

127. Thiele, C.; Katja, P.; Jürgen, S., EASY ROESY: Reliable Cross-Peak Integration in Adiabatic Symmetrized ROESY. *Chemistry - A European Journal* **2009,** *15* (3), 585-588.

128. Arnautova, Y. A.; Jagielska, A.; Scheraga, H. A., A New Force Field (ECEPP-05) for Peptides, Proteins, and Organic Molecules. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006,** *110* (10), 5025-5044.

129. Güntert, P., Automated NMR Structure Calculation With CYANA. In *Protein NMR Techniques*, 2004; pp 353-378.

130. Güntert, P.; Mumenthaler, C.; Wüthrich, K., Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program D. *Journal of Molecular Biology* **1997,** *273* (1), 283-298.

131. Güntert, P.; Wüthrich, K., Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *Journal of Biomolecular NMR* **1991,** *1* (4), 447-456.

132. Herrmann, T.; Güntert, P.; Wüthrich, K., Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *Journal of Molecular Biology* **2002,** *319* (1), 209-227.

133. Güntert, P., Automated NMR structure calculation. Center, *R.* G. S., Ed. Yokohama, 2005.

134. Klebe, G.; Dullweber, F.; Boehm, H. J.; Raffa, R. B., *Drug−Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications*. 2001; Vol. null, p 83.

135. Sharma, A.; Gupta, H., Molecular modeling. *J of Pharmacy & BioAllied Sciences* **2009,** *1* (1), 16-22.

136. van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F. A.; Yu, H. B., Biomolekulare Modellierung: Ziele, Probleme, Perspektiven. *Angewandte Chemie* **2006,** *118* (25), 4168-4198.

137. Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M., A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010,** *53* (14), 5061-5084.

138. Morner, A.; Bjorndal, A.; Albert, J.; KewalRamani, V. N.; Littman, D. R.; Inoue, R.; Thorstensson, R.; Fenyo, E. M.; Bjorling, E., Primary Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates, Like HIV-1 Isolates, Frequently Use CCR5 but Show Promiscuity in Coreceptor Usage. *J. Virol.* **1999,** *73* (3), 2343-2349.

139. Rehm, H., Letzel, T., *Der Experimentator: Proteinchemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2010; Vol. 6.

140. Lee, B.; Sharron, M.; Montaner, L. J.; Weissman, D.; Doms, R. W., Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999,** *96* (9), 5215-5220.

141. Hünnefeld, B. Analyse der Bindung von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich mit dem humanen Korezeptor CCR5. Universität Hamburg, Hamburg, 2006.

142. Hwang, T. L.; Shaka, A. J., Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1995,** *112* (2), 275-279.

143. Mansiaux, Y.; Joseph, A. P.; Gelly, J.-C.; de Brevern, A. G., Assignment of PolyProline II Conformation and Analysis of Sequence – Structure Relationship. *PLoS One* **2011,** *6* (3), e18401.

144. Finn, R. D.; Mistry, J.; Tate, J.; Coggill, P.; Heger, A.; Pollington, J. E.; Gavin, O. L.; Gunasekaran, P.; Ceric, G.; Forslund, K.; Holm, L.; Sonnhammer, E. L. L.; Eddy, S. R.; Bateman, A., The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **2010,** *38* (suppl 1), D211-D222.

145. Crooks, G. E.; Hon, G.; Chandonia, J.-M.; Brenner, S. E., WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Research* **2004,** *14* (6), 1188-1190.

146. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **1992,** *2* (6), 661-665.

147. Gottlieb; H. E., K., V., ; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* **1997,** *62* (21), 7512-7515.

148. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **1990,** *215* (3), 403-410.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben. Mein Dank gilt:

- meiner Mutter Anke Jürs, die mich während der gesamten Zeit unterstützt hat und mir erholsame und abwechslungsreiche Momente in Barcelona, Prag, Istanbul und Athen ermöglichte
- meinem Freund Janusz Wesolowski für die starke Schulter, das offene Ohr und das geduldige Gemüt
- meinen Freundinnen Katja Uhlemann, Svenja Johnsson, Maja Blaß und Dodo Sorokowska für die vielen schönen und lustigen Momente
- den Chemiemädels Franzi Krause, Maike Tober, Claudia Lippek, Inga Inhülsen, Katrin Schaefer und Julia Heick für die gemeinsame Zeit während all der Jahre

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Bernd Meyer bedanken:

- Katrin Schaefer für die super Zeit in der 13a, den spitzen Momenten im Roosen, Fritz und Zoes und dem Gruseln in der Geisterbahn
- Anna-Winona Struck für ihre Kommunikationsfreude in und außerhalb der Uni
- Kathrin Althof für die erheiternden Freitagslaunen
- Miriam Kötzler für die unterstützende Begleitung ins UKE, die anregenden Gespräche und das Externe…
- Patrizia Leccese für ihre Herzlichkeit
- Nadja Haberz für die nette Zeit als Praktikantin (Der Deutsche hat den Fisch!-Biacore J-Sessions) und als 13a-Mitbewohnerin
- Henning Behnken für die prima Zeit mit Konzerten, Kicker und Werwölfen
- Alex Stark für Admin-Super-Boot und Bohemian Rhapsody
- Meike Fellenberg für die NMR-Unterstützung und das gemeinsame Durchstehen
- Martin Wienke für die vielen Maestrohilfen
- Moritz Waldmann (für die Hilfen beim Liberty), Karsten Winkel (für Adminhilfen) und Felix Niemeyer dafür, dass sie meinen youtube-Horizont erweitert haben
- den ehemaligen Mitgliedern Dennis Wilhelm, Kolja Klein und Dirk Rehders für die wirklich tolle Zeit (auch wenn Captain Jack dabei war…)
- Ilona Grüneberg, Wei Liao, Tobias Gloe und allen anderen ehemaligen Mitgliedern für die nette Zeit im AK

Meinen Praktikanten Robert Bernin und Nadja Haberz und meiner Bachelorstudentin Olga Lebedewa für die Unterstützung meines Themas.

Meinem Dank gilt weiterhin:

- Thomas Hackl für den Ausbau von EASYROESY, weiteren Hilfen bei NMR-Problemen und der netten Zeit in und außerhalb des AKs
- der FACS Core Facility des UKE für die Aufnahme der Daten und den anregenden Interpretationshilfen
- Malik Alawi aus der Bioinformatik Service Facility für das Alignment
- Christian Schmidt für die Linux-Hilfe und dem IT-Service im Allgemeinen
- Julia Pruns und Stephan Francke für die Instandhaltungshilfe des BiflexIII
- dem AK Bredehorst für das Bereitstellen der Sterilbank und Nicolas Piganeau (AK Hahn) und Hans-Willi Mittrücker (Institut für Immunologie) für die anfänglichen FACS-Hilfen
- Brita Werner als Chefin, wie man sie sich wünscht
- dem AK Peters aus Lübeck für die netten Zusammenkünfte in Dänemark, Lübeck und Hamburg

und Miriam Kötzler, Janusz Wesolowski, Thomas Hackl und Anna-Winona Struck für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Lebenslauf

Ausbildung	
10/1999-04/2008	Chemiestudium (Diplom) an der Universität Hamburg
	Abschluss: Diplom
	Zwischenprüfung (Vordiplom, 04/2004)
08/1990-07/1999	Gymnasium Ohmoor, Hamburg
	Abschluss: Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang	
07/2008-10/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg
07/2008-10/2011	Lehrbeauftragte für das Grundpraktikum der Organischen Chemie für Chemiestudierende und Strukturbiologie für Studierende des Studiengangs Life Science, Universität Hamburg
10/2010-01/2011	Betreuerin einer Bachelorarbeit, Universität Hamburg *Thema: Synthese und Bindungsstudien von Liganden des Glycoproteins gp120 mit dem Corezeptor CCR5*
seit 07/2008	Beginn der Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer, Universität Hamburg *Thema: Synthese und Analyse von Liganden des CCR5-Rezeptors*
10/2007-03/2008	Lehrbeauftragte für das Grundpraktikum Chemie für Medizinstudierende, Universität Hamburg
08/2007-05/2008	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer, Universität Hamburg *Titel: Design und Synthese von Liganden des Myelin-assozierten Glycoproteins*

Lebenslauf

Wissenschaftliche Publikationen	
12/2009	Erster Hamburger Biacore Anwendertag, Hamburg *Vortrag: SPR-Bindungsstudien des gp120 mit seinem Corezeptor CCR5*
09/2009	3rd ECCLS - European Congress on Chemistry for Life Sciences, Frankfurt, Deutschland *Poster: Design and synthesis of ligands of the myelin-associated glycoprotein,* Beatrice Jürs, Bernd Meyer

Erklärung

Erklärung:

Ich erkläre hiermit von Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht habe.
Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
Die Arbeit darf in Bibliotheken ausgestellt und ausgeliehen werden.

Hamburg, den 25.10.11

_____

Beatrice Jürs