

Charakterisierung der
Wechselwirkung von
V3-Peptiden aus dem
HIV-1 GP120 mit dem
humanen Corezeptor
CCR5 mittels SPR
und STDD-NMR

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Katharina Barbara Wallach
aus Darmstadt

Hamburg, 2011

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2006 bis April 2011 am Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie, der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Bernd Meyer, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine Unterstützung und die mir gewährte Freiheit bei der Bearbeitung.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Tag der Disputation: 27.01.2012

Inhalt

Inhalt	I
1 Einleitung.....	1
1.1 HIV und AIDS	1
1.2 Beschreibung des HI-Virus.....	2
1.3 HIV-Replikationszyklus und Verlauf der Infektion.....	4
1.4 Die HIV-Rezeptoren	7
1.4.1 Der Primärrezeptor CD4	7
1.4.2 Die Corezeptoren CCR5 und CXCR4.....	7
1.5 Das HIV-1 Oberflächenprotein GP120.....	9
1.5.1 Glycoproteine - Aufbau und Funktion	9
1.5.2 Die Struktur des HIV-1-Oberflächenproteins GP120	11
1.5.2.1 Der V3-Loop des GP120.....	12
1.6 Therapieansätze.....	15
1.6.1 <i>Entry</i> -Inhibitoren.....	17
2 Methoden.....	19
2.1 Festphasenpeptidsynthese	19
2.1.1 Darstellung von Glycopeptiden.....	21
2.1.2 Darstellung von cyclischen Peptiden.....	22
2.2 Circular dichroismus	23
2.3 STD-NMR	27
2.3.1 STD-NMR-Experimente mit zellulären Systemen.....	30
2.3.2 Liposomen.....	32
2.4 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	34
3 Zielsetzung der Arbeit.....	38
4 Ergebnisse und Diskussion.....	39
4.1 Synthese des N_{γ} -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6)	39
4.1.1 Enzymatische Gewinnung von Chitobiose (3).....	41
4.1.2 Aminierung von Chitobiose (3) zu Chitobiosylamin (4).....	45
4.2 Synthese der Peptide und Glycopeptide.....	50
4.2.1 Übersicht der synthetisierten V3-Peptide und -Glycopeptide	50
4.2.2 Synthese der offenkettigen Peptide und Glycopeptide	51
4.2.3 Cyclisierung der Peptide und Glycopeptide	56
4.2.3.1 Cyclisierung in Lösung durch Oxidation mit Luftsauerstoff (v3c, v3cg).....	56

4.2.3.2	Cyclisierung an der festen Phase (v3c37).....	58
4.3	CD-spektroskopische Analyse der V3-Peptide.....	61
4.4	Konformative Untersuchungen der Peptide und Glycopeptide mittels NMR.....	64
4.5	Liposomenpräparation	69
4.6	NMR-Experimente.....	72
4.6.1	Optimierung der Wasserunterdrückung für die STD-NMR-Experimente.....	72
4.6.2	STDD-NMR-Experimente	74
4.6.2.1	Bestimmung der Bindungs epitope und der Dissoziationskonstanten der Peptide mit CCR5-Liposomen.....	75
4.6.2.2	Negativkontrolle des Peptids v3ct21 mit Parentalliposomen	87
4.6.2.3	STD-NMR-Experimente der Peptide v3o und v3og mit CCR5-Liposomen	90
4.7	SPR-Bindungsstudien	94
4.8	Generelle Diskussion der Ergebnisse der Bindungsstudien.....	104
4.9	<i>In silico</i> Untersuchungen der V3-CCR5-Wechselwirkung.....	106
5	Zusammenfassung	116
6	Summary	118
7	Experimenteller Teil	120
7.1	Geräte und Chemikalien	120
7.1.1	Geräte.....	120
7.1.2	Chemikalien	121
7.1.3	Materialien	122
7.1.4	Medien und Pufferlösungen	123
7.1.5	Zelllinien	123
7.1.6	Software	123
7.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	124
7.3	Darstellung des N_{γ} -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6).....	132
7.3.1	Darstellung von Chitobioseoctaacetat (2)	132
7.3.2	Versuch der enzymatischen Darstellung von Chitobioseoctaacetat (2).....	133
7.3.3	Darstellung von Chitobiose (3)	134
7.3.4	Darstellung von Chitobiosylamin (4).....	135
7.3.5	Darstellung des <i>t</i> Bu-geschützten N_{γ} -Chitobiosylasparagin-Bausteins (5).....	137
7.3.6	Darstellung des N_{γ} -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6).....	139
7.4	Darstellung der peptidischen Liganden.....	141
7.4.1	Darstellung des Peptids v3con.....	141
7.4.2	Darstellung des Glycopeptids v3cong	142
7.4.3	Darstellung des Peptids v3ct15.....	144

Inhaltsverzeichnis

7.4.4	Darstellung des Peptids <i>v3ct21</i>	146
7.4.5	Darstellung des Peptids <i>v3o</i>	148
7.4.6	Darstellung des Glycopeptids <i>v3og</i>	151
7.4.7	Versuchte Darstellung des cyclischen Peptids <i>v3c</i>	154
7.4.8	Versuchte Darstellung des cyclischen Glycopeptids <i>v3cg</i>	154
7.4.9	Versuchte Darstellung des cyclischen Peptids <i>v3c37</i> an der festen Phase	155
7.5	STD-NMR	156
7.5.1	STDD-NMR-Experimente	157
7.6	SPR-Bindungsstudien	159
8	Sicherheitshinweise und Toxikologie	161
9	Literaturverzeichnis	166
	Abkürzungsverzeichnis.....	185
	Aminosäuren.....	188
Anhang	I
	Daten der STD-NMR-Messungen	I
	Daten der SPR-Messungen	II
	Wissenschaftliche Beiträge.....	IV
	Danksagung	V
	Curriculum Vitae	VIII

1 Einleitung

1.1 HIV und AIDS

Die Isolierung und Identifizierung des Humanen Immundefizienz-Virus (*human immunodeficiency virus*, HIV) als Auslöser des erworbenen Immundefizienzsyndroms AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) gelang zwei französischen Forschergruppen im Jahr 1983.^[1,2] 2008 wurden Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi für ihre Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.^[3] Das HI-Virus infiziert Zellen der humanen Immunabwehr und schwächt diese so stark, dass es nach mehreren Jahren zum Ausbruch von opportunistischen Infektionen kommen kann, die ohne Behandlung schließlich zum Tod führen.

AIDS hat mittlerweile das Ausmaß einer Pandemie erreicht. So lebten Ende 2009 weltweit geschätzt 33 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion, darunter befanden sich ungefähr 2.6 Millionen Neuinfizierte. Die Zahl der an AIDS Verstorbenen betrug 2009 etwa 1.8 Millionen.^[4] Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht der globalen Ausbreitung von HIV wieder.



Abbildung 1: Globale Ausbreitung des HI-Virus (Stand: Ende 2009).

Die Gesamtzahl der HIV-Infizierten Ende 2009 betrug etwa 33.3 Millionen. Besonders betroffen sind Süd- und Südostasien sowie Zentral- und Südafrika. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte der Schätzungen.^[4]

Die Verbreitung von HIV hat nicht nur Folgen für die Gesundheit der Betroffenen, sondern stellt ebenfalls einen relevanten Schaden für soziale und wirtschaftliche Strukturen dar.^[4]

Die Entwicklung eines Impfstoffes zur Eindämmung der Pandemie verlief bislang erfolglos, sodass zurzeit als einzige wirksame Behandlungsmöglichkeit die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART, Kapitel 1.6) zur Verfügung steht. Im Rahmen dieser Therapie ist jedoch lediglich eine Verzögerung des Krankheitsverlaufes, aber keine vollständige Heilung möglich.

1.2 Beschreibung des HI-Virus

Es gibt zwei Stämme von HI-Viren (HIV-1, HIV-2), die sich in eine Vielzahl von Subtypen unterteilen lassen. HIV-1 ist global verbreitet, wohingegen HIV-2 überwiegend in Westafrika und Indien auftritt. Aufgrund seiner geringeren Prävalenz und des schwächeren pathogenen Potentials spielt HIV-2 nur eine untergeordnete Rolle.^[5,6]

HIV-1 wird aufgrund von Sequenzunterschieden in drei Subtypgruppen, M (*main*), O (*outlier*) und N (*non-M, non-O* bzw. *new*), unterteilt. 99 % der HIV-Infektionen werden durch die Subtypen A bis K der M-Gruppe hervorgerufen. Die einzelnen Subtypen treten jeweils in bestimmten geografischen Regionen bevorzugt auf.^[7] So findet man in Afrika überwiegend die Subtypen A und C vor, wohingegen in Europa und auf dem amerikanischen sowie dem australischen Kontinent der Subtyp B am weitesten verbreitet ist. Die genetische Variabilität zwischen den Subtypen der M-Gruppe beträgt etwa 25 bis 35 %, innerhalb eines Subtyps 15 bis 20 %.^[8]

Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren und zur Gattung der Lentiviren, die sich durch eine besonders lange Latenzzeit auszeichnen.^[9]

Ein HI-Virion hat einen Durchmesser von ca. 100 nm und trägt in seinem Inneren ein konisches Nucleocapsid, welches das virale Genom enthält (Abbildung 2).^[10,11] Die Erbinformation des HIV liegt in Form von einzelsträngiger RNA positiver Polarität ((+)ssRNA) vor. Jeder Viruspartikel enthält zwei Kopien der ssRNA. Für die Replikation werden die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase benötigt, die das Virus im Capsid mit sich führt, sowie die Protease, die sich zwischen innerem und äußerem Kern befindet.

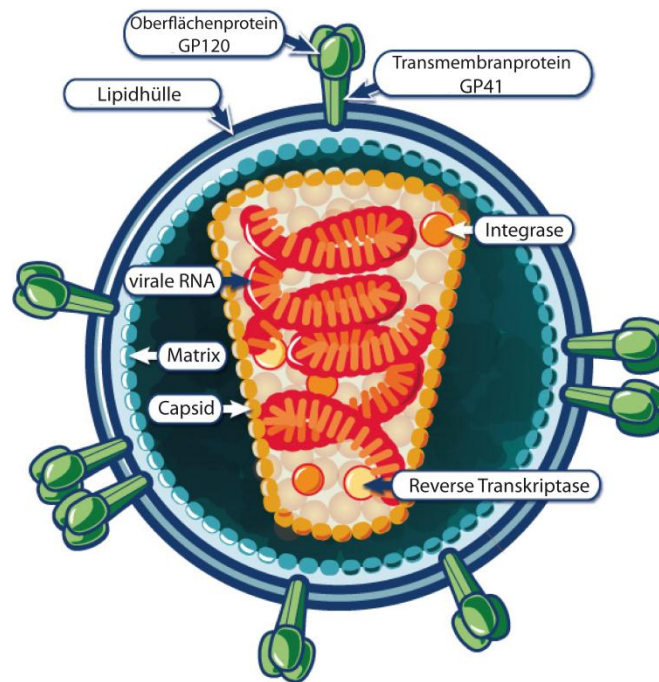


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines HI-Virions.

Das virale Genom in Form von *ssRNA* liegt in einem Capsid vor, das zusätzlich die Integrase sowie die Reverse Transkriptase beinhaltet. Zwischen Capsid und Virusmembran befindet sich die virale Protease. Auf der Oberfläche trägt das Virus Trimere aus GP41/GP120-Heterodimeren. Über diese beiden Glycoproteine wird die Fusion mit der Wirtszellmembran vermittelt.^[12]

Durch Assoziation mit dem Nucleocapsidprotein P7 werden die beiden RNA-Moleküle stabilisiert. Die innere Oberfläche der Virushülle ist aus P17-Matrixmolekülen aufgebaut, welche über P6-Linkerproteine mit dem Viruscapsid verbunden sind.^[13]

In der Lipiddoppelschicht, die das Virus umhüllt, sind u. a. Trimere des transmembranen Glycoproteins 41 (GP41) verankert.^[14] Jedes GP41-Monomer ist extrazellulär nichtkovalent mit der Ectodomäne eines Moleküls des Oberflächen-Glycoproteins 120 (GP120) assoziiert.^[15,16] Die beiden Glycoproteine werden durch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins GP160 gebildet.^[17] Jedes Virion trägt etwa 72 der GP41/GP120-Trimere auf seiner Oberfläche.^[18,19] Aktuellere Untersuchungen mittels Cryoelektronenmikroskop lassen aber auch eine Anzahl von 14 ± 7 Trimere der Heterodimere je Virion vermuten.^[20] Zusätzlich trägt die virale Oberfläche wirtseigene Proteine, die eine Erkennung durch die humane Immunabwehr erschweren.

1.3 HIV-Replikationszyklus und Verlauf der Infektion

HI-Viren infizieren Zellen, die den CD4-Rezeptor (*cluster of differentiation*) tragen.^[21,22] Dazu gehören Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.^[23] Den Erstkontakt mit der Zielzelle über den CD4-Rezeptor vermittelt das virale GP120.^[24] Dadurch kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung im Glycoprotein unter Exposition der dritten hypervariablen Schleife (V3-Loop).^[25,26] Der V3-Loop tritt mit einem Corezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren (meist CCR5 oder CXCR4, Kapitel 1.4.2) in Wechselwirkung und leitet die Membranfusion ein (Abbildung 3).^[27,28]

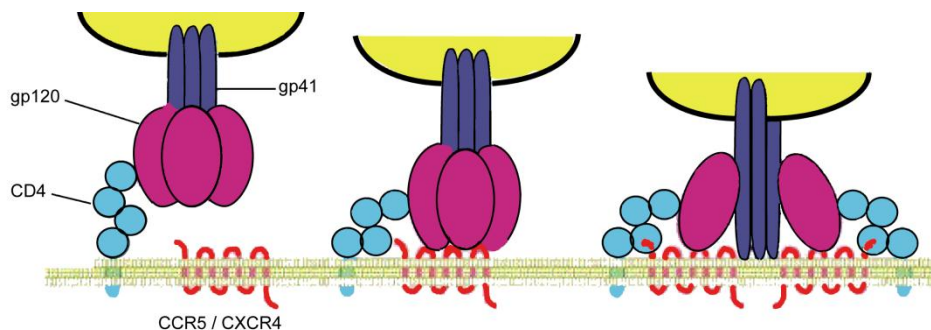


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HIV *entries*.

Nach der primären Interaktion des viralen GP120 (magenta) mit dem CD4-Rezeptor (hellblau) erfolgt die Exposition der V3-Bindungssepitope des GP120. So wird die Wechselwirkung mit den Chemokinrezeptoren (rot) ermöglicht. Im Anschluss inseriert das transmembrane GP41 (lila) in die Membran der Zielzelle und es kommt zur Fusion der Membranen.^[29]

Die Membranverschmelzung erfolgt nach einer Destabilisierung des GP41/GP120-Komplexes durch die Interaktion mit dem Corezeptor. Die veränderte Tertiärstruktur führt zur Freilegung einer aminoterminalen hydrophoben Peptidsequenz des GP41, die in die Membran der Zielzelle inseriert wird.^[30,31] Im Verlauf der Fusion kommt es zur Ausbildung einer *trimer of hairpin*-Struktur zwischen den beiden helicalen Bereichen des GP41 (N-Helix, C-Helix). Drei N-Helices eines GP41-Trimers bilden eine *coiled core*-Struktur, in deren Vertiefungen sich drei C-Helices antiparallel einlagern. Dies bewirkt eine Annäherung der Virus- und der Wirtszellmembran und führt anschließend zu ihrer Verschmelzung.^[27,32]

Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) haben zur Diskussion einer weiteren Möglichkeit des viralen *entries* geführt (Abbildung 4). Dieser verläuft über eine rezeptorvermittelte Endocytose und wurde bereits *in vitro* für die Chemokinrezeptoren beschrieben.^[33,34]

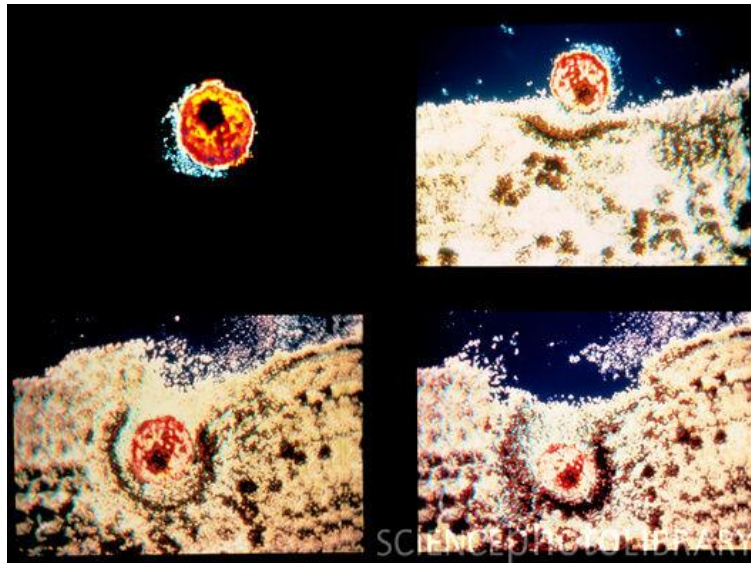


Abbildung 4: Colorierte TEM-Aufnahmen der rezeptorvermittelten Endocytose von HIV.

Die Aufnahme zeigt oben links: ein freies HI-Virion; oben rechts: das Virus tritt in Interaktion mit einer T-Zelle; unten rechts und links: das HI-Virion wird von der Wirtszellmembran umstülpt und gelangt in die Zielzelle.^[35]

Nach der Fusion gelangen die viralen Bestandteile in das Cytoplasma der Zielzelle. Dort wird die virale *ssRNA* mithilfe der RT in doppelsträngige DNA transkribiert und durch die viruseigene Integrase im Nucleocapsid in das Wirtszellgenom eingebaut (Abbildung 5).^[36,37]

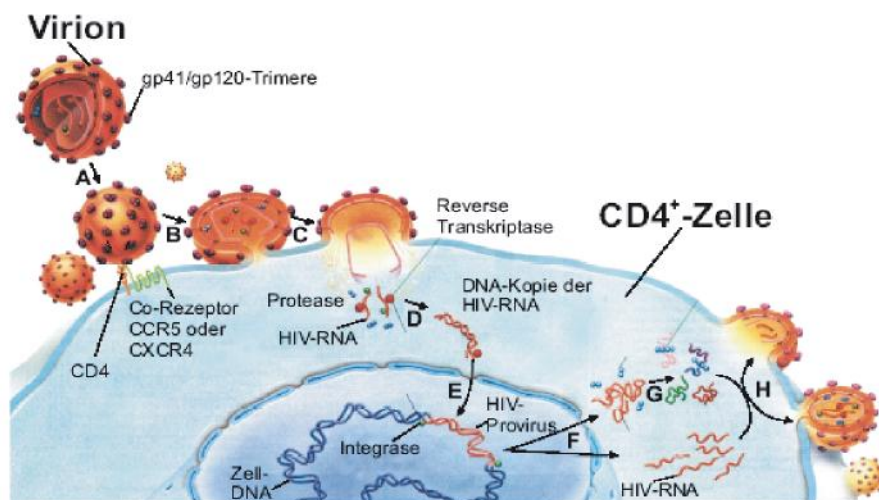


Abbildung 5: Lebenszyklus des HIV.

A: Interaktion des viralen GP41/GP120-Komplex mit dem humanen Primärrezeptor CD4 und einem Corezeptor (CCR5 oder CXCR4). B: Membranfusion. C: Einbringen des Capsidinhalts in das Cytoplasma der Zielzelle. D: Reverse Transkription der *ssRNA* in *dsDNA*. E: Integration der DNA in das Wirtszellgenom. F: Expression der proviralen Bestandteile. G: Prozessierung der Vorläuferproteine und *assembly*. H: Knospung neuer Virionen.^[38]

Die RT übt ihre Funktion ohne 3',5'-Exonucleasefunktion aus und besitzt dadurch eine zehnmal höhere Fehlerrate als andere DNA-Polymerasen.^[39] Die Wahrscheinlichkeit für den Einbau falscher Basenpaare beträgt etwa 10^{-3} bis 10^{-4} , was zu der außergewöhnlich hohen Mutationsrate des HI-Virus führt.^[40-42] Dies erfordert eine ständige Weiterentwicklung der Medikamente und Therapiemöglichkeiten, für die eine Aufklärung der Bindung des Virus an die humanen Zielzellen essenziell ist.

Mit der Integration der viralen Erbinformation in das Wirtsgenom schließt die frühe Phase der Replikation ab. Dieser provirale Zustand kann unterschiedlich lange andauern. In diesem Zeitraum kann das Virus vom Immunsystem unerkant persistieren. Die Ursache für die Beendigung dieser Latenzphase ist bislang ungeklärt.

Die Replikation der viralen DNA sowie die Expression und die posttranslationale Modifikation der viralen Proteine in der infektiösen Phase erfolgen durch zelleigene Prozesse, die von viralen Helferproteinen kontrolliert werden.^[38] Die neu gebildeten Viruskomponenten lagern sich an der Zellmembran zusammen (*assembly*) und schnüren sich aus der Wirtszelle ab.^[10] Nach diesem Schritt folgt die abschließende Reifung des infektiösen Partikels durch Spaltung der Vorläuferproteine mittels der viralen Protease. Auf diese Weise können täglich bis zu 10^{10} neue Viruspartikel gebildet werden.^[41,43] Die Oberfläche der neu gebildeten Viren hat ihren Ursprung in der Wirtszellmembran und trägt daher Proteine der Wirtszelle wie z. B. HLAs (*human leukocyte antigene*).^[44]

Die ständige Produktion neuer Virionen führt nach und nach zum Absterben der Wirtszellen, die somit ihrer eigentlichen Aufgabe, der Immunabwehr, nicht mehr nachkommen können. Infizierte $CD4^+$ -Lymphozyten haben eine Halbwertszeit von etwa zwei Tagen im Gegensatz zu nichtinfizierten Lymphozyten, die eine Halbwertszeit von etwa drei Wochen besitzen.^[45,46]

Zu Beginn einer HIV-Infektion kann es zum Auftreten unspezifischer, grippeähnlicher Symptome kommen, die kurze Zeit später abklingen. Unbehandelt kommt es nach einer mehrjährigen asymptomatischen Phase, in der die Virusreplikation weiter fortschreitet, zum Auftreten opportunistischer Infektionen. Zu diesen zählen u. a. Erkrankungen wie bestimmte Formen von Lungenentzündungen oder das Auftreten spezieller maligner Tumore. Der Ausbruch dieser opportunistischen Infektionen markiert den Beginn der symptomatischen Phase der Erkrankung (AIDS). In diesem Stadium fällt die Zahl der $CD4^+$ -Zellen stark ab, und die Virenkonzentration nimmt rapide zu. Ohne Therapie führt AIDS innerhalb von etwa 15 Jahren bei zwei Dritteln der Patienten zum Tod.^[47,48]

1.4 Die HIV-Rezeptoren

1.4.1 Der Primärrezeptor CD4

Die primäre Interaktion des HI-Virus mit einer Zielzelle erfolgt über den CD4-Rezeptor. CD4 ist ein glycosyliertes Transmembranprotein mit einer Molmasse von ungefähr 55 kDa und ist ein Oberflächenmarker von T-Helferzellen. Es ist aus jeweils einer intra- und extrazellulären sowie einer transmembranen Domäne aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne besteht aus vier immunglobulinartigen Einheiten. CD4 ist der natürliche Ligand der MHC-Klasse II-Moleküle und spielt eine Rolle bei der T-Zell-Signalübertragung und der immunologischen Erkennung.^[49-51]

Das virale GP120 bindet hochaffin an die Domäne 1 des CD4-Rezeptors.^[52,53] Einige HIV-Isolate sind jedoch auch ohne die Primärwechselwirkung mit CD4 in der Lage, über einen noch nichtaufgeklärten Mechanismus an die sekundären Chemokinrezeptoren zu binden. Mutationen innerhalb der Sequenz oder eine geringere Glycosylierung des GP120 könnten hierfür die Ursache sein. Das Bindungsepitop für die Corezeptorwechselwirkung kann in diesen Fällen leichter zugänglich und die Bindungsaffinität dadurch in dem Maße gesteigert sein, dass eine primäre Interaktion mit CD4 unnötig wird.^[54-56]

1.4.2 Die Corezeptoren CCR5 und CXCR4

Die wichtigsten HIV-Corezeptoren CCR5 und CXCR4 sind der Klasse der Chemokinrezeptoren zuzuordnen.^[57-59] Diese gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die durch sieben membrandurchspannende α -Helices charakterisiert sind. Die Helices sind durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen (ICLs, ECLs) miteinander verbunden. Der N-Terminus der GPCRs befindet sich extrazellulär, der C-Terminus im Cytosol (Abbildung 6).^[60,61] Die physiologische Aufgabe der GPCRs besteht u. a. in der Signalweiterleitung in die Zelle über ein G-Protein mithilfe von sekundären Botenstoffen.^[62]

Die *in vivo* Funktion der Chemokinrezeptoren besteht u. a. darin, Leukozyten zu Entzündungsherden zu führen. Dies geschieht per Chemotaxis entlang eines Gradienten von Signalproteinen, den Chemokinen (*chemoattractant cytokines*), die an Entzündungsschauplätzen ausgeschüttet werden.^[63] Die Benennung der Chemokine, die zur Familie der Cytokine gehören, leitet sich von ihrer Sequenz ab, in der zwei Cysteinreste entweder direkt

benachbart (CC- bzw. β -Chemokine) oder durch eine oder drei Aminosäuren (CXC- und CX₃C- bzw. α -Chemokine) getrennt vorliegen können.^[64]

Die natürlichen Liganden der Chemokinrezeptoren sind u. a im Fall von CCR5 die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β (*macrophage inhibitory protein*) und RANTES (*regulated upon activation T-cell expressed and secreted*) sowie das Chemokin SDF-1 (*stromal cell-derived factor*) bei CXCR4.^[65,66] Diese Chemokine können zwar prinzipiell Zellen vor einer HIV-Infektion schützen, eignen sich dennoch nicht als Inhibitoren, da beispielsweise Störungen bei der Regulierung von Entzündungsprozessen auftreten können.^[67,68]

Die Spezifität der Chemokine wird durch die Ladung von sulfatierten Tyrosinen des N-terminalen Bereichs und von bestimmten Aminosäuren aus dem Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) der Rezeptoren hervorgerufen.^[69,70] Es wird vermutet, dass einige Aminosäuren der ECLs die Ausbildung einer bindungsaktiven Konformation des Corezeptors verursachen und andere Aminosäuren ein oder mehrere Bindungs epitope bilden.^[71]

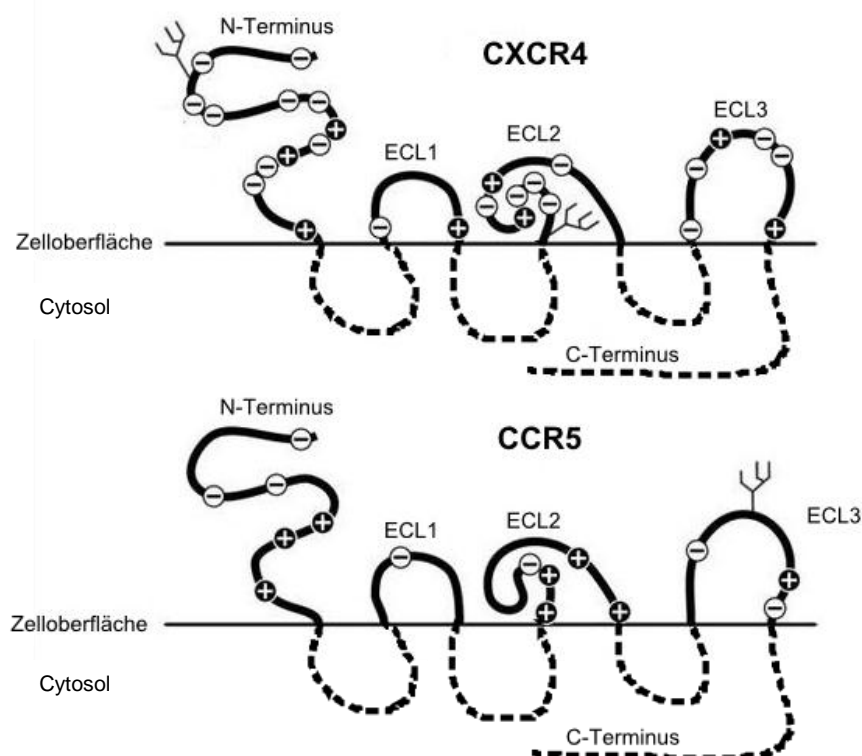


Abbildung 6: Schematische Darstellung der HIV-Corezeptoren CXCR4 und CCR5.

Die Darstellung zeigt die Formalladungen und die Glycosylierungen der extrazellulären Bereiche (ECL) der Corezeptoren. CXCR4 trägt mehr Ladungen und ist stärker glycosyliert als CCR5. Die intrazellulären Bereiche und der C-Terminus sind gestrichelt dargestellt. Abbildung nach: Thorsen *et al.*^[72]

Neben CCR5 und CXCR4 wurden weitere Chemokinrezeptoren identifiziert, die als HIV-Corezeptor fungieren können.^[73,74] Die native Funktion dieser Corezeptoren ist häufig noch nicht aufgeklärt. Da die Corezeptor-Funktion dieser Moleküle in Bezug auf eine HIV-Infektion nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von CCR5 oder CXCR4 ausgeführt werden kann, spielen diese zusätzlichen Rezeptoren nur eine untergeordnete Rolle für den HIV *entry*.

CCR5-Moleküle befinden sich auf Lymphozyten und Makrophagen, CXCR4 auf Lymphozyten und T-Zelllinien. Hiervon leiten sich die Benennungen des Rezeptor-Tropismus des Virus als M- bzw. R5-trop und T- bzw. X4-trop ab.^[75] Virenstämme, die beide Corezeptoren nutzen können, werden als dual- bzw. R5/X4-trop bezeichnet.^[76] Im frühen Stadium einer HIV-Infektion überwiegen die M-tropen R5-Viren, im späteren Krankheitsverlauf liegen zunehmend die T-tropen X4-Viren vor.^[77] Der Tropismus hängt anscheinend mit dem Glycosylierungsmuster bzw. der Sequenz des V3-Loops des GP120 zusammen.^[78-81] Die M-tropen Viren werden langsamer repliziert und sind vermutlich weniger infektiös, da erst das Auftreten der sich schnell vermehrenden T-tropen Viren in 50-60 % der Patienten zu einer beschleunigten Progression des Krankheitsverlaufes mit einhergehender Abnahme der CD4⁺-Zellzahl führt.^[82-84]

Der CCR5-Corezeptor stellt ein attraktives Ziel für die Entwicklung von HIV *entry*-Inhibitoren dar, da das Auftreten eines Defekts im Gen des CCR5-Proteins zu einer Resistenz gegenüber einer HIV-Infektion bzw. zu einem verlangsamten Krankheitsverlauf führt.^[85-87] Eine homozygote 32-Basenpaar-Deletion bewirkt eine Suppression der Expression des CCR5-Rezeptors an der Zelloberfläche.^[88] Eine heterozygot auftretende Deletion führt zu einer verringerten Präsentation des Rezeptors bzw. zur Exposition eines verkürzten Rezeptors und somit zu einer verminderten Infektionswahrscheinlichkeit. Das Auftreten von HIV-Infektionen bei Patienten mit einer homozygoten 32-Basenpaar-Deletion ist auf die Nutzung des CXCR4-Corezeptors zurückzuführen.^[89]

1.5 Das HIV-1 Oberflächenprotein GP120

1.5.1 Glycoproteine - Aufbau und Funktion

Glycoproteine lassen sich grundsätzlich anhand der Verknüpfungsart ihrer Glycanreste unterscheiden. Bei N-Typ-Glycoproteinen ist der Kohlenhydratrest N-glycosidisch über den

γ -Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette verknüpft. *O*-Typ-Glycoproteine tragen ihre Glycanstrukturen *O*-glycosidisch in der Regel über das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette gebunden. Sie machen einen großen Anteil der Mucine aus und kommen insgesamt wesentlich häufiger vor als die *N*-Typ-Varianten. *S*-Typ-Glycosylierungen über den Schwefel einer Cysteinseitenkette treten äußerst selten auf.^[90]

Kohlenhydrate sind u. a. für ihre Funktion als Gerüst- und Speicherstoffe bekannt.^[91] Proteine können als strukturbildende Bestandteile oder Träger spezifischer Funktionen (z. B. Rezeptorvermittlung oder Signalweiterleitung) dienen.^[92] Die genaue Funktion von Glycoproteinen ist in vielen Bereichen noch ungeklärt.^[93,94] Die Wechselwirkung und der Informationsaustausch von Zellen über komplexe Protein-gebundene Saccharidstrukturen konnte mit der Entdeckung der Glycocalix nachgewiesen werden.^[95]

N-Typ-Glycostrukturen in Eukaryoten basieren alle auf einem einheitlichen Pentasaccharidgrundgerüst.^[96] Diese *core*-Struktur besteht aus zwei β 1,4-glycosidisch verbundenen *N*-Acetylglucosamineinheiten (GlcNAc), die wiederum β 1,4-glycosidisch mit einer Mannoseeinheit verknüpft sind. An diesem Konstrukt sind an den Positionen 3 und 6 α -glycosidisch zwei weitere Mannoseeinheiten gebunden.^[97]

Die Grundstruktur wird je nach Funktion um weitere Saccharideinheiten ergänzt. Diese höheren Glycosylierungsmuster lassen sich in drei Kategorien einteilen: den hochmannosidischen Typ, den Komplex-Typ und den Hybrid-Typ. Der hochmannosidische Typ trägt mindestens zwei weitere α -glycosidisch verknüpfte Mannoseeinheiten und ist ausschließlich in höheren Organismen zu finden. Beim Komplex-Typ ist die *core*-Struktur durch zwei bis sechs Verzweigungen aus unterschiedlichen Kohlenhydratresten ergänzt (GlcNAc, Gal, Sia), wodurch sich eine große Mikroheterogenität ergibt. Der Hybrid-Typ trägt Strukturmerkmale sowohl des hochmannosidischen als auch des komplexen Typs.^[98]

Die Glycosylierung der Proteine erfolgt posttranslational im endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat der Wirtszelle.^[98] Damit ein Glycosylrest auf ein Asparagin übertragen werden kann, muss diese Aminosäure Teil der Sequenz Asn-X-Thr/Ser-Y sein, wobei X jede beliebige natürliche Aminosäure außer Prolin (bei Anwesenheit von Thr) oder Asparaginsäure, Glutamin bzw. Tryptophan (beim Vorliegen von Ser) sein kann. Y repräsentiert jede natürliche Aminosäure außer Prolin.^[99-101]

1.5.2 Die Struktur des HIV-1-Oberflächenproteins GP120

Das GP120 besteht je nach HIV-Subtyp aus 470 - 500 Aminosäuren und hat eine Molmasse von ungefähr 120 kDa. Es besitzt etwa 24 - 30 potenzielle Glycosylierungsstellen.^[102] 50 % der Masse des Glycoproteins entfallen auf den Kohlenhydratanteil.^[103,104]

Die Tertiärstruktur des GP41/GP120-Komplexes wird durch zehn Disulfidbrücken bestimmt, von denen wiederum neun zur Ausbildung von fünf konservierten Bereichen (C1-C5) und fünf hypervariablen Schleifen (V1-V5) im GP120 führen (Abbildung 7).^[105]

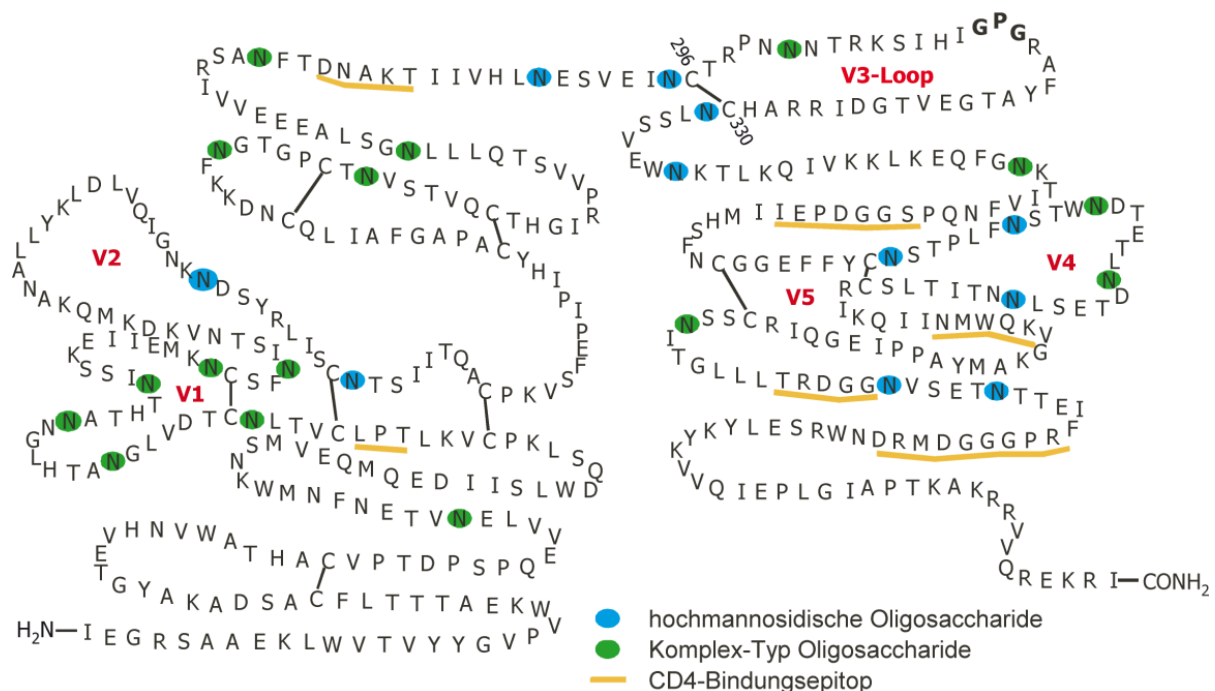


Abbildung 7: Schematische Darstellung des GP120 aus dem HIV-1.

Grüne und blaue Ellipsen markieren die potenziellen Glycosylierungsstellen. Das CD4-Bindungssepitop ist durch gelbe Linien markiert, die hypervariablen Regionen V1-V5 sind durch Beschriftung gekennzeichnet. An der Spitze des V3-Loops befindet sich fett markiert die „Prinzipiell neutralisierende Domäne“ (Kapitel 1.5.2.1), gegen die Antikörper gebildet werden können.

Neutralisationsassays mit Permutationen der nativ hochkonservierten Cysteine des GP41/GP120-Komplexes zeigen, dass lediglich fünf der zehn Disulfidbrücken für die korrekte Faltung und insgesamt acht von zehn Disulfidbrücken für die Funktion essenziell sind.^[106]

Die konservierten Bereiche des GP120 befinden sich innerhalb des Proteins, die hypervariablen Bereiche liegen exponiert an dessen Oberfläche.^[107] Die Varianz zwischen den GP120-Sequenzen unterschiedlicher HIV-Stämme ist auf Mutationen sowie Deletionen und Insertionen in den hypervariablen Bereichen zurückzuführen.

Die Kohlenhydratstrukturen des GP120 sind *N*-Typ-Strukturen des hochmannosidischen und des komplexen Typs. Sie dienen vermutlich als *glycan shield* und schützen das Glycoprotein vor dem Angriff humaner Antikörper.^[18,108,109] Es ist noch weitgehend unklar, ob die Kohlenhydrate des GP120 für eine Infektion erforderlich sind oder ob sie eine Bedeutung bei der Proteinfaltung spielen.^[110,111]

1998 gelang die Akquisition einer Röntgenkristallstruktur eines verkürzten GP120 im Komplex mit zwei extrazellulären Domänen des CD4-Rezeptors und einem Antikörper-F_{ab}-Fragment. Die variablen Bereiche V1/V2 und V3 fehlen jedoch in diesem Modell und die Glycanstrukturen wurden enzymatisch bis auf einen GlcNAc-Rest verkürzt.^[19] Anhand dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Bindung an den Primärrezeptor CD4 über ein diskontinuierliches Epitop erfolgt (Abbildung 7). Die vier konservierten Bereiche C1-C4, die vierte variable Region (V4-Loop) sowie eine teilweise konstante und teilweise variable Region (C4/V5) sind an dieser Interaktion beteiligt.^[19,112,113]

2005 konnte das Modell des GP120 um den unglycosylierten V3-Loop erweitert werden.^[114] Dieser Struktur kann entnommen werden, dass die Bindung an CD4 vermutlich eine Translokation des V3-Bereichs um 30 Å in Richtung Zielzelle zur Folge hat. Dadurch wird eine optimale Präsentation der Corezeptorbindungsepitope erreicht. Beide Röntgenkristallstrukturen stimmen in großen Teilen überein. Dennoch ist zu beachten, dass im Modell eine Stabilisierung des V3-Loops durch den Antikörper und weitere GP120-Strukturen erreicht wird, die nicht dem nativen Zustand entspricht.

Das GP120 M-troper Viren ist stärker glycosyliert als das der T-tropen Viren. Das Immunsystem erkennt die M-tropen Viren im Frühstadium einer HIV-Infektion vermutlich durch dieses *glycan shield* deutlich schlechter. T-trope Viren werden zunächst besser vom humanen Immunsystem neutralisiert; ihre höhere Infektiosität kommt dann aber bei einem vorgeschädigten Immunsystem zum Tragen.^[115] Fehlende *N*-Glycane in den Bereichen V1/V2 und V3 des GP120 von T-tropen Viren führen außerdem zu einer verminderten Replikationsfähigkeit des Virus.^[116]

1.5.2.1 *Der V3-Loop des GP120*

Dem V3-Loop des GP120 wird eine wichtige Rolle bei der Bindung an humane Zielzellen zugeschrieben. Zum einen erfolgt die Wechselwirkung mit den Chemokinrezeptoren hauptsächlich über diesen Bereich.^[117] Zum anderen sind HIV-Mutanten ohne V3-Loop nicht zur Replikation befähigt.^[118]

Der V3-Loop besteht je nach Subtyp aus 33-37 Aminosäuren (Abbildung 8). Der N- und der C-Terminus sind über eine Disulfidbrücke verknüpft, die maßgeblich zur Struktur und Funktionalität des GP120 beiträgt. Offenkettige V3-Loops zeigen eine verminderte Bindungsaffinität zum Corezeptor CCR5.^[119]

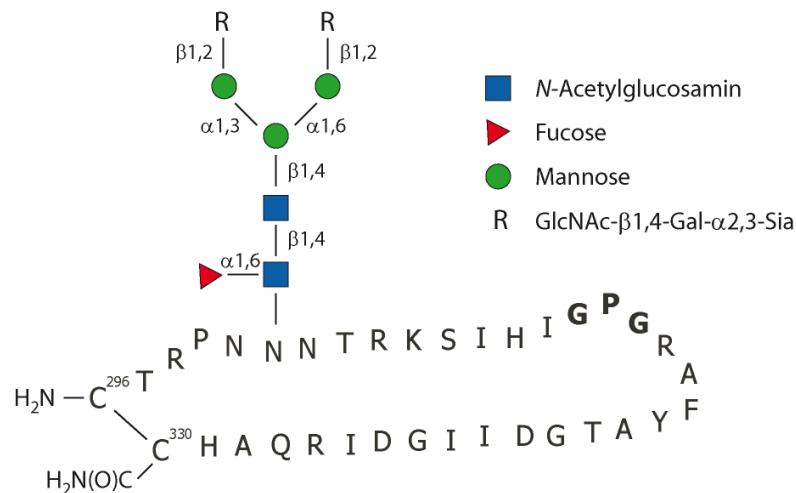


Abbildung 8: Schematische Darstellung des V3-Loops des GP120.

Die Darstellung zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenz des V3-Loops. An Position 301 befindet sich ein Asparagin mit einer Glycosylierung des komplexen Typs. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des GP120.

Die Sequenz des Loops lässt sich in mehrere Bereiche unterteilen: den *stem*-Bereich (Positionen 296-305 und 321-330) und den *crown*-Bereich (Positionen 306-320).^[120] Es wird vermutet, dass der *stem*-Bereich hauptsächlich für die Bindung an den N-terminalen Bereich des Corezeptors verantwortlich ist und der *crown*-Bereich allein die Rezeptorspezifität bestimmt. Ein dritter funktionaler Bereich des V3-Loops ist ein hochkonserviertes Strukturmotiv (³¹⁰GPG³¹², Subtyp B). Dieser Bereich wird auch als „Prinzipiell neutralisierende Domäne“ (PND) bezeichnet, da gegen diesen Sequenzabschnitt Antikörper gebildet werden.^[121] Eine HIV-Infektion kann allerdings durch diese Antikörper über einen längeren Zeitraum nicht verhindert werden, da zusätzlich Epitope aus anderen Bereichen des GP120 am viralen *entry* beteiligt sind.^[122]

Bei der Bindung an die humanen Corezeptoren findet vermutlich zunächst eine Interaktion des V3-*stem*-Bereichs mit den sulfatierten Tyrosinen des N-terminalen Bereichs des Rezeptors statt. Im nächsten Schritt tritt der V3-*crown*-Bereich mit der ECL2 des Rezeptors in Wechselwirkung und leitet die anschließende Fusion der Membranen ein (Abbildung 9).^[114]

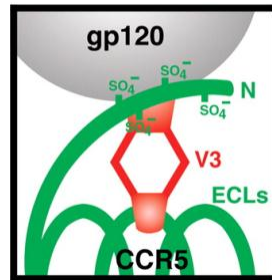


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Kontakts zwischen dem V3-Loop des GP120 und dem humanen Corezeptor CCR5.

Der *stem*-Bereich des V3-Loops tritt mit den sulfatierten Tyrosinen des N-Terminus des Corezeptors in Interaktion. Im Anschluss erfolgt die Wechselwirkung des *crow*n-Bereichs des V3-Loops mit der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors.^[114]

Viren mit identischen V3-Sequenzen können sich in ihrem Rezeptortropismus unterscheiden. Dies führte zu der Vermutung, dass andere Bereiche des GP120 wie die V1- und V2-Bereiche ebenfalls Bedeutung bei der Wahl des Corezeptors haben.^[123,124]

Die Formalladung des V3-Loops beträgt je nach Virusstamm +2 bis +10. Der zunehmende Krankheitsfortschritt und der Tropismuswechsel zu T-tropen Viren korrelieren mit dem vermehrten Auftreten von basischen Aminosäuren innerhalb der Sequenz. Das hohe elektrostatische Potential des V3-Loop kann so zu einer stärkeren Wechselwirkung mit der Wirtszellmembran führen und effektiv mit Antikörpern um die Corezeptorbindung konkurrieren, was die höhere Infektiosität erklärt.^[125]

Der V3-Loop besitzt eine stark konservierte potenzielle Glycosylierungsstelle in der Nähe des N-Terminus.^[119] Die Glycosylierung an dieser Position ist vom komplexen Typ und nimmt etwa den gleichen Raum in Anspruch wie der V3-Loop selbst (Abbildung 8). Die Wahl des Corezeptors wird entscheidend durch die Sequenz des V3-Loops des GP120 bestimmt. Wird dieses Strukturmotiv eines R5-tropen Virus durch die Sequenz eines X4-tropen ausgetauscht, ist das Virus in der Lage, CXCR4-tragende Zellen zu infizieren.^[117,126] Fehlt das Komplex-Typ-Glycan des V3-Loops, wird die Nutzung von CCR5 beeinträchtigt und der *entry* von X4-tropen Virenstämmen begünstigt.^[81,127,128]

Der Einfluss der Glycosylierung sowie der Cyclisierung des V3-Loops zugunsten einer höheren Bindungsaffinität gegenüber CCR5 konnte in SPR (*surface plasmon resonance*)-basierten Studien nachgewiesen werden.^[129,130]

Der virale V3-Loop stellt durch seine Schlüsselfunktion in der Corezeptorbindung ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren dar, die den Eintritt von HIV in humane Zielzellen verhindern könnten. Zu beachten ist hierbei, dass niedermolekulare Verbindungen

unter Umständen nicht zur Inhibition der Corezeptoren geeignet sind, da das GP120 auch mit einem reduzierten Bindungsepitop eine Infektion hervorrufen kann.^[131] Zur Entwicklung von HIV *entry*-Inhibitoren (Kapitel 1.6.1) ist ein detailliertes Verständnis der V3-CCR5-Interaktion auf atomarer Ebene unverzichtbar.

1.6 Therapieansätze

Seit 1995 ist die übliche Behandlungsform von HIV-Infektionen eine Kombinationstherapie, die auf der Verabreichung mehrerer Substanzen aus mindestens zwei verschiedenen Wirkstoffklassen basiert (HAART).^[39,132] Die kombinierte Anwendung von Medikamenten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen soll vor allem einer Resistenzbildung des Virus vorbeugen.^[133-135]

Im Mai 2011 standen 24 Einzel- und sechs Kombinationspräparate zur Behandlung von HIV und AIDS im Rahmen der HAART zur Verfügung.^[136] Die Präparate werden in mehrere Wirkstoffklassen eingeteilt, wobei sich die Klassifizierung der Medikamente nach dem Stadium richtet, in welchem sie in den HIV-Replikationszyklus (Kapitel 1.3) eingreifen.^[137-139] Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Wirkstoffklassen wieder.

Tabelle 1: Übersicht über die Wirkstoffklassen der im Mai 2011 zugelassenen HIV-Medikamente.

Wirkstoffklasse	Unterkategorien
Reverse Transkriptase-Inhibitoren (RTIs)	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) • Nicht-nucleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) • Nucleotid-analoge Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NtRTIs)
Protease-Inhibitoren (PIs)	
Integrase-Inhibitoren (IIs)	
<i>entry</i> -Inhibitoren (EIs)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>attachment</i>-Inhibitoren • Corezeptorantagonisten • Fusionsinhibitoren

Eine Erradikation des Virus aus dem Organismus ist mithilfe der HAART nicht möglich. Die Lebensqualität der Patienten kann jedoch verbessert und der Krankheitsfortschritt deutlich verzögert werden, wobei häufig erhebliche Nebenwirkungen der Medikamente in Kauf genommen werden müssen.^[134,140]

Die meisten der zurzeit eingesetzten Präparate sind den Wirkstoffklassen der Reverse Transkriptase-Inhibitoren und der Protease-Inhibitoren zuzuordnen.^[141-143] In den Bereichen der Integrase- und Fusionsinhibitoren sowie der Corezeptorantagonisten ist bislang jeweils nur ein Wirkstoff zugelassen.^[136]

Reverse-Transkriptase-Inhibitoren funktionieren nach zwei Mechanismen. NRTIs und NtRTIs sind Nucleosid- bzw. Nucleotidanaloga und konkurrieren nach mehrfacher Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen mit den natürlichen Nucleotiden bei der Elongation der viralen DNA. Durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe bricht die Kettenverlängerung ab, was u. a. zu einer unvollständigen Replikation der viralen DNA führt.^[144] NNRTIs inaktivieren die katalytische Funktion der RT, indem sie allosterisch an eine Subdomäne in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms binden.^[145] Inhibitoren der RT können ihre Wirkung nur entfalten, solange die virale RNA noch nicht in die DNA der Wirtszelle inseriert ist.

Die HIV-Protease spaltet virale Vorläuferproteine. Protease-Inhibitoren konkurrieren mit diesen Precursorproteinen um die Substratbindungsstelle des Enzyms.^[146] Auf diese Weise werden lediglich nichtinfektiöse Viren produziert.^[147,148] Die überwiegend peptidomimetischen Inhibitormoleküle sind so modifiziert, dass die Peptidbindungen durch z. B. Hydroxyethylenbindungen ersetzt sind, die die Protease nicht spalten kann.^[149]

Der bislang einzige zugelassene Integrase-Inhibitor *Raltegravir* greift an der Stelle des Strangtransfers ein.^[150,151] Ein weiterer Integrase-Inhibitor, *Elvitegravir*, befindet sich zurzeit in Studien der klinischen Phase III.^[152] Weitere Schritte der Integration, die potenzielle Ziele von Inhibitoren darstellen können, sind die Bindung der viralen DNA an die Wirtszell-DNA, die 3'-Prozessierung und die Lückenreparaturfunktion der Integrase.^[137,153,154] Der Vorteil einer Blockierung der Integrase liegt darin, dass es sich um einen viruseigenen Bestandteil handelt, dessen Inhibition keinen Einfluss auf humane Enzyme hat.^[155]

Eine weitere Möglichkeit, die HIV-Replikation zu unterbinden, besteht in der Inhibition der Reifung und Ausknospung infektiöser Virionen (Maturation). Dies wird erreicht, indem die Umwandlung des HIV-1-Capsid-Vorläuferproteins zum reifen Capsidprotein P24 unterbrochen wird.^[156] In diesem Bereich wurde bislang noch kein Wirkstoff zugelassen.^[157] *Bevirimat* hat jedoch erfolgreich Studien der klinischen Phase IIb durchlaufen.^[158,159]

Ein anderer Ansatz wird mit Mikrobiziden erprobt. Diese sollen das Eindringen von HIV in den Körper verhindern und stellen somit eine mögliche prophylaktische Maßnahme als Alternative zu einem Vakzin dar.^[160,161]

Die Entwicklung eines Impfstoffes ist bislang erfolglos geblieben. Der Einsatz von genetisch veränderten, nichtpathogenen Viren zur Aktivierung einer humanen Immunantwort verlief nur wenig vielversprechend.^[162-165] Versuche unter Verwendung von rekombinant hergestelltem GP120, das die wirtseigene Produktion von Antikörpern anregen soll, brachten ebenfalls nur geringe Erfolge.^[166]

1.6.1 *Entry*-Inhibitoren

Die bislang zugelassenen Wirkstoffe aus dem Bereich der *entry*-Inhibitoren setzen an verschiedenen Punkten des Eintritts der HI-Viren in die Zielzelle an.^[167-169] Der frühe Eingriff in die HIV-Replikation hat den Vorteil, dass das Virus gar nicht erst in die Wirtszelle gelangen kann.^[133] Haben diese Wirkstoffe einen zellulären Rezeptor als *target*, kommt es deutlich verzögert zu einer viralen Resistenzbildung.^[170]

Die Blockierung der Wechselwirkung des HIV mit dem Primärrezeptor CD4 (*attachment*-Inhibitoren) hat den Vorteil der Unabhängigkeit vom Corezeptortropismus. Geschieht die Inhibition auf humaner Seite, kann es allerdings zur Beeinträchtigung der für das Immunsystem notwendigen nativen CD4-Funktion kommen. Nebenwirkungen durch CD4-bindende Antikörper wie z. B. Immunsuppression können nicht ausgeschlossen werden.^[171]

Abhilfe kann hier die Entwicklung von CD4-mimikrierenden Wirkstoffen schaffen, die mit dem viralen GP120 interagieren. Die große Variabilität des Virus kann allerdings zu Problemen bei der Entwicklung geeigneter Liganden führen. Die Verabreichung von löslichem CD4 bietet keinen ausreichenden antiviralen Effekt.^[172,173] Wirkstoffe, die sich gegenwärtig in klinischen Studien befinden, sind beispielsweise ein monoklonaler Antikörper (TNX-355), der eine Konformationsänderung im CD4 auslöst und eine weitere Interaktion mit den Corezeptoren verhindert, sowie BMS-488043, das spezifisch und reversibel mit GP120 wechselwirkt und die CD4/GP120-Bindung blockiert.^[174,175]

2003 wurde *Enfuvirtide* (T20, *Fuzeon*®) aus dem Bereich der Fusionsinhibitoren von der U. S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen.^[176,177] *Enfuvirtide* ist ein 36 Aminosäuren langes Peptid aus dem C-terminalen Bereich des GP41. Es verhindert die für die Fusion notwendige Ausbildung der *trimer of hairpin*-Struktur des Glycoproteins (Kapitel 1.3).^[178] Aufgrund seiner schlechten Bioverfügbarkeit muss der Wirkstoff jedoch subkutan injiziert werden.^[179]

Wegen der nicht einzuschätzenden Folgen der Blockierung der CD4/GP120-Wechselwirkung bieten sich die Corezeptoren CCR5 und CXCR4 als weiteres *target* an. Ein weiteres Argument für diesen Ansatzpunkt ist, dass die Blockierung der CD4/GP120-Interaktion zu einer Konformationsänderung des GP120 führen kann, die eine Bindung an einen der Corezeptoren beschleunigt.^[180,181]

In vitro-Studien haben gezeigt, dass die natürlichen Liganden der Chemokinrezeptoren antivirale Aktivität aufweisen und sich als mögliche Liganden zur Inhibition des HIV *entries* anbieten.^[65] Die kurze Halbwertszeit *in vivo*, ihre Internalisierung bei Corezeptorbindung und das Auftreten von beträchtlichen Nebenwirkungen machen die Erforschung von Alternativen dringend notwendig. Bei der Inhibition der Sekundärrezeptoren bleibt zu beachten, dass die nativen Funktionen der Chemokinrezeptoren noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Bei CXCR4 *knockout*-Mäusen traten z. B. Entwicklungsstörungen der Föten auf.^[182,183] Der Tropismuswechsel im späten Stadium einer HIV-Infektion zu X4-tropen Virenstämmen haben dennoch zur Entwicklung einiger niedermolekularer, stark positiv geladener Inhibitoren als CXCR4-blockierende Wirkstoffe geführt (AMD3100, AMD11070, T22, T143, u. a.).^[184-188]

Da bei Trägern einer homozygoten 32-Basenpaar-Deletion und der damit einhergehenden Suppression der CCR5-Expression (Kapitel 1.4.2) eine Resistenz gegenüber einer HIV-Infektion aber keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen festzustellen sind, ist dieser Rezeptor ein äußerst attraktives Ziel für die Entwicklung von *entry*-Inhibitoren.^[86,87] 2007 wurde *Maraviroc* als erster Vertreter der Klasse der Corezeptorantagonisten zugelassen.^[189,190] *Maraviroc* blockiert CCR5 und verhindert die Anbindung des GP120. Mit *Vicriviroc* befindet sich ein weiterer potenzieller Corezeptorinhibitor in klinischen Studien.^[191] Weiterhin ist die Entwicklung von Antikörpern von großem Interesse. PRO-140 z. B. ist ein monoklonaler anti-CCR5-Antikörper; der den HIV *entry* blockiert, ohne die bekannten nativen Funktion von CCR5 einzuschränken.^[192]

Durch die Inhibition der Wechselwirkung nur eines Corezeptors kann es jedoch zu einem beschleunigten Tropismuswechsel kommen.^[59,193] Daher stehen Substanzen, die eine Infektion mit R5-, X4- und R5/X4-trope Virenstämmen verhindern können, im Fokus.^[194-196] Ebenfalls erprobt werden Maßnahmen, die die Expression von CXCR4 und CCR5 auf den Zellen herunterregulieren können.^[197]

2 Methoden

2.1 Festphasenpeptidsynthese

Zur Darstellung von Peptiden und Glycopeptiden eignen sich unterschiedliche Methoden. Biochemisch kann die Synthese zum einen unter Einsatz von Enzymen, zum anderen rekombinant unter Verwendung von Expressionssystemen erfolgen, was vor allem bei der Herstellung von Proteinen Anwendung findet.^[198,199]

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Peptide und Glycopeptide wurden mithilfe der Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) nach Merrifield synthetisiert.^[200] Dieses Verfahren eignet sich nicht nur für die Kupplung von Standard-aminosäuren, sondern ebenfalls für die Darstellung von Peptiden mit unnatürlichen Aminosäuren oder mit posttranslationalen Modifikationen. Durch die mehrmalige Abfolge identischer Arbeitsschritte lässt sich dieses Verfahren leicht automatisieren.^[201] Die Kupplung von Peptiden an einem unlöslichen Träger erleichtert die Aufarbeitung erheblich und ermöglicht dadurch das Arbeiten mit hohen Reagenzienüberschüssen sowie die Entfernung nichtumgesetzter Komponenten in Waschschrinen.

Sehr lange Peptide können zunächst in kürzeren Einzelsequenzen synthetisiert und nachträglich verknüpft werden. Dies kann mittels nativer Ligation unter Ausbildung einer Peptidbindung erfolgen oder nichtnativ über eine nichtamidische Verknüpfung.^[202,203]

Durch die Multifunktionalität von Aminosäuren muss eine geeignete Schutzgruppenstrategie gewählt werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden und eine selektive Ausbildung der Peptidbindung zu erreichen. Die α -Aminofunktionen werden bei der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Fmoc-Strategie mit einer 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe geschützt, die unter mild basischen Bedingungen abgespalten werden kann und eine photometrische Verfolgung der Kupplungsausbeuten ermöglicht.^[204] Die Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren werden orthogonal hierzu mit säurelabilen Schutzgruppen (z. B. Trt-, Pbf-, *t*Bu- und Boc-Gruppen) blockiert.

Als feste Phase wird häufig ein quervernetztes, funktionalisiertes Polystyrolharz eingesetzt, welches mit einem Linker versehen ist. Der Linker dient als Abstandshalter, der die Wechselwirkung der Peptidkette mit dem Harz reduzieren soll. Die Struktur des Linkers ermöglicht die Abspaltung der Peptide z. B. als Carbonsäure oder Carbonsäureamid.

In Abbildung 10 ist schematisch der Ablauf der automatisierten SPPS nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie dargestellt. Dabei erfolgt der Aufbau des Peptids entgegen der biologischen Syntheserichtung vom C- zum N-Terminus. Die Aminofunktion des eingesetzten polymeren Trägers wird zu Beginn der Synthese unter Bildung von Methylenfluoren und Kohlendioxid nach einem $E1_{cb}$ -Mechanismus entschützt.

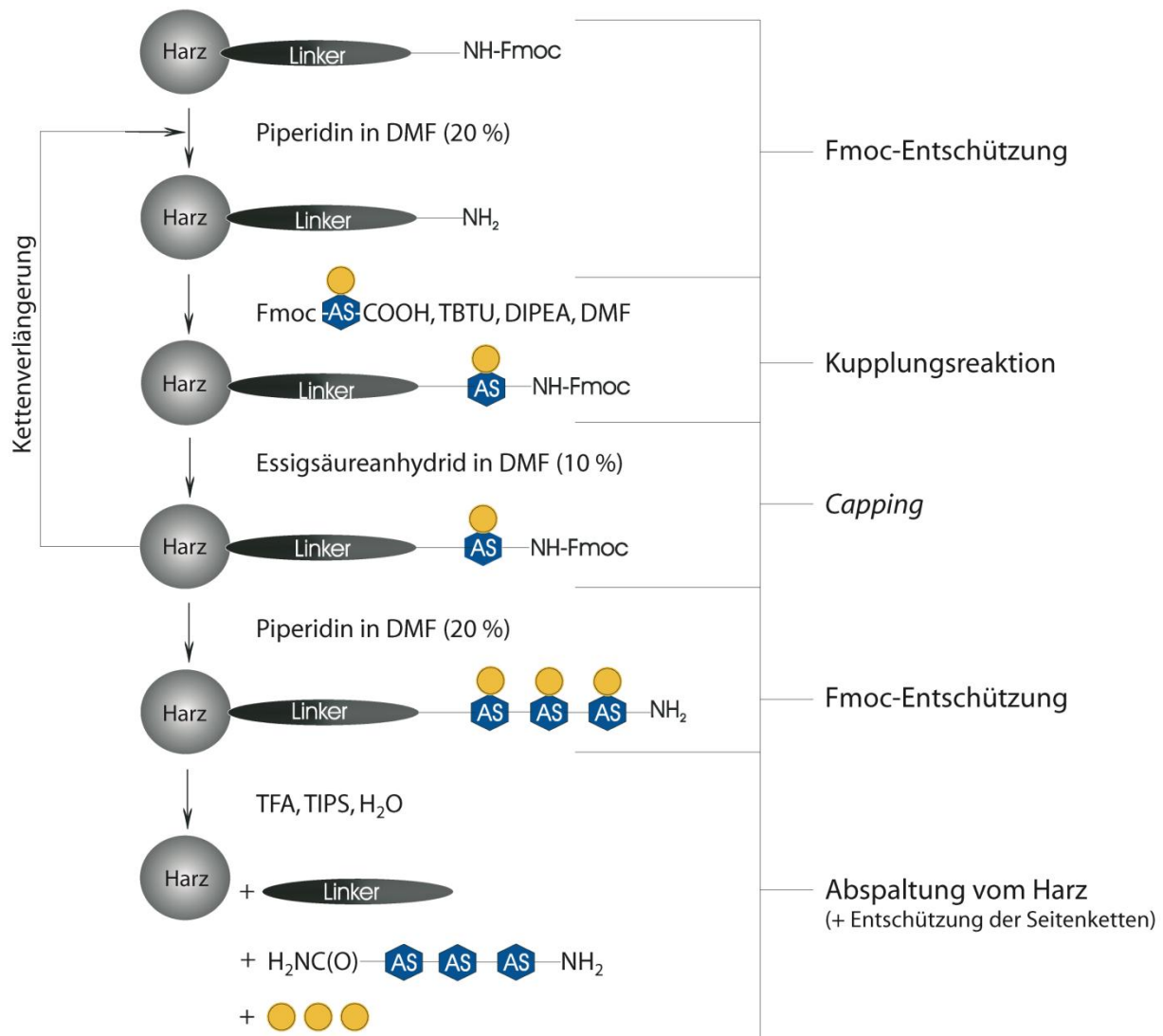


Abbildung 10: Schematische Darstellung der automatisierten Festphasenpeptidsynthese.

Wird nach der Fmoc-Strategie gearbeitet, wird zunächst das Harz entschützt. Danach folgen wiederholt die Kupplungs-, *capping*- und Fmoc-Entschützungsreaktionen. Abschließend werden unter sauren Bedingungen in einem Schritt das Peptid vom polymeren Träger abgespalten sowie die Seitenketten der Aminosäuren entschützt.

Danach folgt die Kupplungsreaktion, bei der die α -Carboxylfunktion der zu kuppelnden Aminosäure unter Einsatz von Aktivator in einen Aktivester überführt wird. Als Aktivator eignen sich z. B. Uroniumsalze wie TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-

tetramethyluroniumtetrafluoroborat) und HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat).^[205,206] Die Vorteile liegen in einer hohen Kupplungseffizienz auch sterisch gehinderter Aminosäuren bei einer geringen Reaktionszeit. Das reaktive Intermediat hierbei ist ein *O*-Acyluronium-Derivat.^[207] Die Bildung von Tetramethylharnstoff verschiebt das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Produkts.

Nach der Kupplung werden nichtumgesetzte Aminofunktionen in einer Acetylierungsreaktion blockiert (*capping*), um die Bildung von Deletionspeptiden zu vermeiden, die sich nach der Synthese nur schwer chromatographisch abtrennen lassen würden. Mit der Fmoc-Entschützung der zuletzt gekuppelten Aminosäure wird der nächste Syntheszyklus eingeleitet.

Unter sauren Bedingungen wird zum Abschluss das Peptid unter gleichzeitiger Entschützung der Seitenkettenfunktionalitäten vom polymeren Träger abgespalten. Bei der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen bilden sich Carbeniumionen, die elektrophil mit den aromatischen Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan reagieren können. Um dies zu vermeiden, wird der Abspaltung der Hydridionendonator *Triisopropylsilan* (TIPS) zugesetzt.^[208]

Probleme bei der SPPS können durch intra- und intermolekulare Aggregation, Ausbildung von Sekundärstrukturelementen sowie sterische Hinderung durch die Seitenkettenschutzgruppen hervorgerufen werden und zum vorzeitigen Abbruch der Synthese führen. Unter anderem aus diesen Gründen werden seit einigen Jahren Mikrowellensynthesereaktoren eingesetzt.^[209,210] Besonders bei der Synthese von Peptiden mit mehr als sechs Aminosäuren kommt es häufig zu Aggregation der wachsenden Peptidkette am Harz. Beim Einsatz von Mikrowellen richten sich die Dipole des Peptidrückgrats entlang einer elektromagnetischen Welle aus und die Peptidkette erfährt eine Deaggregation.^[211] Das aminoternale Ende des wachsenden Peptids wird somit leichter für die folgenden Reaktionsschritte zugänglich. Weiterhin werden Rotations- und Schwingungsbewegungen der Moleküle des Lösungsmittels angeregt, die zu einem raschen Erwärmen der Reaktionslösung auf die gewünschte Temperatur führen, welches ebenfalls vorteilhaft für die Synthese ist.^[212]

2.1.1 Darstellung von Glycopeptiden

Eine einheitliche Glycosylierung von Peptiden ist auf biochemischem Weg nicht möglich, da es sich um eine spezie- und zellspezifische posttranslationale Modifikation

handelt.^[213,214] Auf chemischem Weg kann die Darstellung von Glycopeptiden entweder konvergent mit dem Einführen des Saccharidteils nach abgeschlossener Peptidsynthese oder sequenziell unter dem Einsatz von Glycosylaminosäurebausteinen während der Peptidsynthese erfolgen.^[215,216]

Zum nachträglichen Einbau eines *N*-Typ-Saccharids in ein Harz-gebundenes Peptid mittels konvergenter Synthesestrategie wird z. B. ein in der Seitenkette Allyl-geschütztes Aspartat eingeführt.^[217] Nach der selektiven Entschützung und Aktivierung wird die Glycosyleinheit als Amin gekuppelt. Ein Vorteil der konvergenten Synthese besteht darin, dass das Glycosylamin nur in geringen Mengen am Ende der Synthese eingesetzt werden muss. Nachteilig kann sich auswirken, dass Peptide bereits am Harz eine Sekundärstruktur ausbilden und damit die Kupplung des Saccharids sterisch gehindert ist.

Der Vorteil der sequenziellen Synthese liegt darin, dass sowohl mehrfach als auch differenziell glycosyliert werden kann. Die Entschützung der Hydroxylgruppen des Saccharidbausteins kann leicht quantitativ am Harz erfolgen. Der Nachteil besteht darin, dass der Baustein zunächst aufwändig synthetisiert werden muss und unter den Bedingungen aller folgenden Schritte der Peptidsynthese stabil sein muss. Weiterhin müssen Ausbeuteverluste aufgrund einer nichtquantitativen Kupplung des Bausteins und der nachfolgenden Aminosäuren in Kauf genommen werden. Die komplexe Struktur der Glycosyleinheit kann zu einer verringerten Zugänglichkeit der terminalen Aminogruppe für folgende Kupplungsschritte führen.

Eine unerwünschte Nebenreaktion, sowohl der sequenziellen als auch der konvergenten Glycopeptidsynthese, ist die intramolekulare Aspartimidbildung.^[218] Unter basischen Bedingungen kann es zur Deprotonierung der Amidgruppe des Aspartats und einem nachfolgenden nucleophilen Angriff an der β -Carbonylgruppe unter Ausbildung eines thermodynamisch sehr stabilen Succinimidrings kommen.^[219,220] Diese Nebenreaktion kann durch den Einsatz von Piperazin als Base mit einem Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol reduziert werden.^[221]

2.1.2 Darstellung von cyclischen Peptiden

Die Cyclisierung von Peptiden und Glycopeptiden über eine Disulfidbrücke kann biochemisch durch den Einsatz von Enzymen oder auf chemischem Weg entweder am polymeren Träger oder in Lösung erreicht werden.^[222,223] In Abhängigkeit von der Wahl der

Schutzgruppen der Cysteinseitenketten kann die Entschützung simultan oder schrittweise erfolgen.

Die oxidative Cyclisierung in Lösung erfolgt nach der sauerstofffreien Abspaltung vom Harz in großen Verdünnungen, um eine intermolekulare Polymerisation zu vermeiden. Als Oxidationsmittel können beispielsweise Iod, DMSO oder Luftsauerstoff dienen. Der Vorteil der Cyclisierung in Lösung liegt im Einsatz preiswerter Chemikalien. So kann die Cyclisierung in einer wässrigen Ammoniumhydrogencarbonatlösung mit Luftsauerstoff als Oxidationsmittel durchgeführt werden.^[224] Der Zusatz geringer Mengen DMSO kann beschleunigend auf die Oxidationsreaktion wirken und die Löslichkeit von sehr hydrophoben Peptiden erhöhen.^[225]

Bei Cyclisierungen am polymeren Träger muss ein Harz mit niedriger Belegung (< 0.2 mmol/g) gewählt werden, um intermolekulare Reaktionen zu vermeiden. Hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Harz nehmen mit steigender Kettenlänge der Peptide zu und können eine Cyclisierung erschweren. Außerdem sind mehrere Reaktionsschritte notwendig, um eine Ausbildung von Disulfidbrücken zu bewirken.^[226] Bei niedrig gewählten Ansatzgrößen sollte es bei dieser Methode jedoch ausschließlich zur gewünschten Cyclisierungsreaktion kommen.

2.2 Circulardichroismus

Eine einfache und schnelle Methode zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von z. B. Proteinen oder DNA stellt die CD-Spektroskopie dar.^[227] Sie ist eine spezielle Art der Absorptionsspektroskopie im UV/Vis-Bereich und beruht auf der Wechselwirkung von circular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Chromophoren.^[228] Mit dieser Methode ist die Untersuchung von Sekundär- und Tertiärstrukturelementen sowie von Konformationsänderungen von z. B. Proteinen möglich.

Circular polarisiertes Licht besteht aus zwei orthogonalen elektromagnetischen Wellen gleicher Amplitude mit einem Phasenunterschied von 90° . Links und rechts circular polarisiertes Licht (E_L , E_R) wird durch optisch aktive Substanzen unterschiedlich stark absorbiert. Die Differenz ist eine ellipsoide Polarisation, welche als Circulardichroismus bezeichnet wird (Abbildung 11).^[229,230]

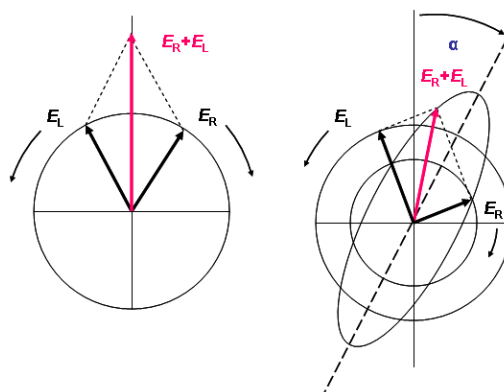


Abbildung 11: Darstellung des CD-Effekts.

Links: Beide Basisvektoren (E_L , E_R) des circular polarisierten Lichts haben die gleiche Magnitude und erscheinen als lineare Vektoren. Rechts: Die links- und rechtsdrehende Komponente haben unterschiedliche Magnituden, was eine elliptische Polarisierung zur Folge hat.^[231]

Es wird zwischen positivem und negativem Circular dichroismus (*Cotton-Effekt*) unterschieden, je nachdem welche Komponente der Basispolarisation stärker absorbiert wird. Angegeben wird meist die Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Eine Normierung der erhaltenen Werte der Elliptizität wird durch die Umrechnung in die *mean residue ellipticity* $[\Theta]$ erreicht (Gleichung 1).^[231,232]

$$[\Theta] = \Theta \cdot \frac{M[\text{g/mol}]}{10 \cdot c[\text{mol/L}] \cdot l[\text{cm}] \cdot n} \quad \text{Gleichung 1}$$

Gleichung 1: Umrechnung der Elliptizität Θ in die *mean residue ellipticity* $[\Theta]$.

Θ = gemessene Elliptizität in Milligrad (mdeg), M = Molmasse, c = Konzentration des Analyten, l = Länge der Küvette und n = Anzahl der Aminosäuren im untersuchten Protein.

In der Regel werden Messungen bis zu einer minimalen Wellenlänge von 180 nm durchgeführt. Messungen im Bereich < 180 nm sind durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung (SRCDD) möglich und ermöglichen eine genauere Spezifizierung der Molekülstruktur.

Die Konformationsanalyse erfolgt durch die Betrachtung der gemessenen Absorptionsbande, die mit bekannten Referenzspektren verglichen wird.^[233] In Peptiden oder Proteinen lassen sich die Anteile von α -Helices, β -Faltblättern, β -turns und ungeordnete Strukturen (*random coil*) bestimmen, wobei Einflüsse von aromatischen Seitenketten eine exakte Konformationsanalyse erschweren können. Eine Lokalisierung oder Bestimmung der Abfolge der Sekundärstrukturelemente ist mit der CD-Spektroskopie nicht möglich.

CD-Spektren werden in drei Bereiche unterteilt:

- den fernen UV-Bereich (< 250 nm)
- den nahen UV-Bereich (250 – 300 nm)
- den nahen UV/Vis-Bereich (300 – 700 nm)

Der ferne UV-Bereich enthält Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins (Abbildung 12). Die Absorption wird hier durch elektronische Übergänge der Amidbindungen hervorgerufen, deren Asymmetrie durch die Nachbarschaft zu stereogenen Zentren (α -C-Atom) induziert wird und die optische Aktivität verursacht. Liegt eine α -Helix vor, ruft der niedrigste $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang im CD-Spektrum ein Minimum bei etwa 210 nm, der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang ein Minimum bei etwa 220 nm hervor. Die Amplitude steigt mit zunehmender Länge der Helix. Die β -Faltblatt-Konformation ist weniger gut untersucht, da dieses Strukturelement zu einer schlechten Löslichkeit der untersuchten Substanzen führen kann. Ein typisches Spektrum, das eine β -Faltblattstruktur repräsentiert, zeigt ein Maximum bei 195 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und ein Minimum bei 215 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang).^[234,235] Eine Verstärkung der Amplitude kann durch zunehmende Verdrillung und steigende Länge des Faltblattes hervorgerufen werden. Als Modelle für Absorptionsspektren von *turn*-Motiven werden häufig cyclische Peptide verwendet. Die erhaltenen Spektren sind jedoch insgesamt wenig definiert.^[236]

Abbildung 12 zeigt die Fern-UV-CD-Spektren von Poly-L-lysin, die unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen wurden. Die erhaltenen Spektren dienen als Modelle für unterschiedliche Sekundärstrukturelemente.

Der nahe UV-Bereich gibt Auskunft über die Tertiärstruktur eines Proteins. Die Absorption ist durch aromatische Seitenketten (260 – 320 nm) und Disulfidbrücken (schwache, breite Absorptionsbanden bei etwa 260 nm) geprägt. Die Signalform hängt von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren, ihrer Beweglichkeit, ihrer chemischen Umgebung (Wasserstoffbrücken, polare Gruppen, Polarisierbarkeit) sowie ihrer räumlichen Anordnung ab. Eine Blauverschiebung deutet z. B. auf eine Exposition aromatischer Seitenketten an der Oberfläche hin. Die Intensität der Banden ist in diesem Bereich aufgrund des geringeren Vorkommens dieser Chromophore deutlich schwächer.^[234]

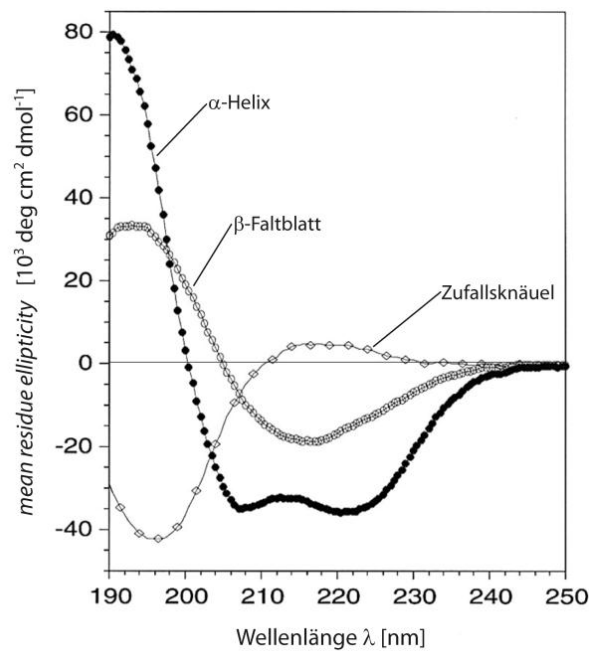


Abbildung 12: Fern-UV-CD-Spektren unterschiedlicher Konformationen von Poly-L-lysin.

Die α -Helix-Konformation bildet sich bei RT und einem pH-Wert von 11.1 aus. Sie ist geprägt von zwei Minima bei 208 und 222 nm. Das β -Faltblatt wird nach dem 15-minütigen Erwärmen auf 52 °C bei pH 11.1 erhalten. Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 215 nm. In entsalztem Wasser liegt Poly-L-lysin als Zufallsknäuel vor, das durch ein Minimum bei 195 nm und ein Maximum bei 218 nm charakterisiert ist.^[237]

Im nahen UV/Vis-Bereich wird die Absorption u. A. von prosthetischen Gruppen (z. B. im Hämoglobin) hervorgerufen. Bei etwa 300 nm kann es zu einem *tailing* von Disulfidbrücken oder einer Tryptophan-Bande kommen.

Aus den aufgenommenen Spektren können anschließend die einzelnen Anteile der Sekundärstrukturelemente errechnet werden. Die beobachtbaren Übergänge im fernen UV-Bereich sind u. A. von den erlaubten Torsionswinkeln des Peptidrückgrats abhängig. Eine Anpassung an Referenzspektren wird umso schwieriger, je variabler die Torsionswinkel sind. Dies ist beispielsweise bei β -Faltblättern oder *random*-Strukturen der Fall.^[232]

Die akquirierten Daten müssen vor der Auswertung häufig mathematisch geglättet werden, da eine mangelnde Lampenintensität < 190 nm zu verrauschten Messwerten führen kann. Für die Auswertung steht eine Vielzahl von Software zur Verfügung, die zum Teil die Erstellung eigener Referenzdatenbanken ermöglichen.^[238,239]

2.3 STD-NMR

Im Rahmen der Entwicklung neuer Wirkstoffe muss die Interaktion von niedermolekularen Liganden mit z. B. Rezeptormolekülen oder Enzymen charakterisiert und verstanden werden. Eine ligandbasierte Methode, die hierfür zur Verfügung steht, ist die Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Spektroskopie (STD-NMR), die sowohl in der universitären als auch der industriellen Forschung eine vielfältige Anwendung erfährt.^[240-242]

Die STD-NMR-Spektroskopie ermöglicht die Aufklärung von Bindungssepitopen von Liganden mit Proteinen auf atomarer Ebene sowie die Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D der Liganden. Hierzu reichen geringste Stoffmengen (nmol - μ mol) sowohl der Liganden als auch der Proteine aus.

Für STD-NMR-Experimente macht man sich das Phänomen der Spindiffusion, welches bei Makromolekülen mit einer molaren Masse > 10 kDa auftritt, zunutze. Durch die Spindiffusion verteilt sich die Magnetisierung über das gesamte Molekül. Eine spezifische Sättigung der Protonenfrequenzen von Makromolekülen ist aufgrund ihrer kurzen Kreuzrelaxationszeiten und der damit verbundenen großen Linienbreite möglich und lässt sich durch die Anwendung einer Serie von Gauß-Pulsen erreichen. Die Einstrahlfrequenz wird dabei so gewählt, dass keine spezifische Sättigung des Liganden erfolgt. Die Resonanzen des Liganden liegen meist im spektralen Bereich von ungefähr 0 bis 10 ppm. Die Einstrahlfrequenz zur Sättigung des Proteins wird als *on resonance*-Frequenz bezeichnet. Um das Maß der Sättigung quantifizieren zu können, wird ein NMR-Spektrum derselben Probe mit einem selektiven Vorsättigungspuls außerhalb des spektralen Fensters des Proteins akquiriert, das einem normalen ^1H -NMR-Spektrum entspricht (*off resonance*). Unerwünschte Artefakte durch thermische Effekte in der Probe können ebenfalls durch die Aufnahme des *off resonance*-Spektrums vermieden werden.

Bei einem schnellen Austausch der Liganden am Rezeptormolekül kann die Sättigung mittels Kreuzrelaxation vom Protein auf den Liganden übertragen werden.^[243] Diffundiert der Ligand nach der Bindung an den Rezeptor zurück in Lösung, kann er dort detektiert werden (Abbildung 13). Die Sättigungsintensität der Ligandresonanzen korreliert über $1/r^6$ mit dem Abstand r der Ligandprotonen zu den Proteinprotonen. Ligandprotonen, die sich näher am Rezeptor befinden, erfahren eine stärkere Sättigungsübertragung als weiter entfernte. Die Signalintensität der Protonen wird also stärker reduziert, je geringer die Distanz zum Makromolekül ist. Subtrahiert man nun das *on resonance*- vom *off resonance*-Spektrum,

wird das STD-Spektrum erhalten, in welchem die intensiveren Ligandsignale von Protonen verursacht werden, die stärker mit dem Protein wechselwirken. Durch den Vergleich des STD-Spektrums mit dem entsprechenden *off resonance*-Spektrum lassen sich die absoluten STD-Prozente ermitteln. Das Bindungssepitop kann dann aus der relativen Sättigung der einzelnen Protonen bestimmt werden.

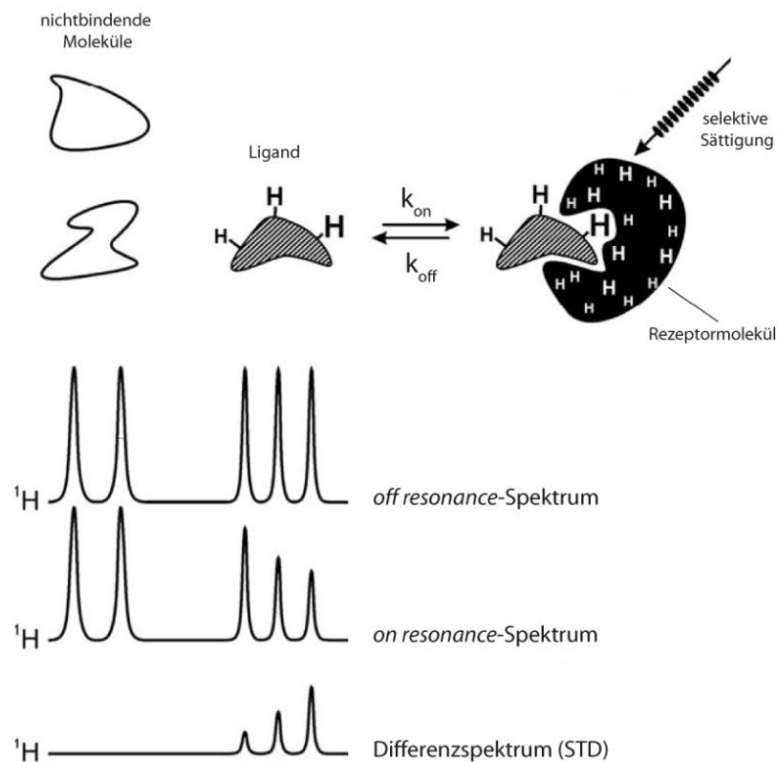


Abbildung 13: Prinzip der STD-NMR-Spektroskopie.

Durch Einstrahlen eines selektiven Pulses (*on resonance*) kommt es zu einem Populationsausgleich zwischen den α - und β -Energieniveaus der Wasserstoffkerne und damit zu einer Sättigung eines Rezeptormoleküls. Diese kann mittels Kreuzrelaxation auf einen bindenden Liganden übertragen werden. Diffundiert dieser in Lösung, kann das Maß der Sättigungsübertragung bestimmt werden. Das Maß der Sättigung korreliert dabei mit dem Abstand r der Protonen zum Rezeptor. Protonen, die sich näher am Protein befinden, werden stärker gesättigt. Die Differenz aus einem *on* und einem *off resonance*-Spektrum (STD-Spektrum) zeigt nur Signale von Protonen, die an der Interaktion beteiligt sind.^[242]

Da das Differenzspektrum ausschließlich Signale bindender Moleküle enthält, eignet sich die STD-NMR-Methode hervorragend zum *screening* von Substanzbibliotheken. Proteinsignale, die nach der Differenzbildung im STD-Spektrum auftreten, können effektiv durch einen $T_{1\rho}$ -Filter (Spinlock) unterdrückt werden.^[244]

Die Bestimmung von Bindungskonstanten erfolgt über die Aufnahme einer Konzentrationsreihe mit unterschiedlichen Ligandüberschüssen. Die Ligandkonzentration wird durch die Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors berücksichtigt (Gleichung 2).

$$STD_{Amp.} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \cdot \frac{[L]_{total}}{[P]_{total}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Gleichung 2: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors ($STD_{Amp.}$).

I_0 = Signalintensität des *off resonance*-Spektrums, I_{sat} = Signalintensität des *on resonance*-Spektrums, $[L]_{total}$ = Gesamtkonzentration des Liganden und $[P]_{total}$ = Gesamtkonzentration des Proteins in der Probe.

Die K_D -Werte erhält man durch die Anpassung an ein geeignetes Bindungsmodell. Dazu werden die maximalen Werte der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Für das *one site binding*-Modell liegt Gleichung 3 zugrunde.

$$STD_{Amp.} = \frac{STD_{Amp.max} \cdot c_B}{K_D + c_B} \quad \text{Gleichung 3}$$

Gleichung 3: K_D -Wert-Bestimmung von STD-NMR-Experimenten durch mathematische Anpassung an das *one site binding*-Modell.

$STD_{Amp.}$ = STD-Amplifikationsfaktor, c_B = Konzentration des Liganden, $STD_{Amp.max.}$ = Gleichgewichtswert des STD-Amplifikationsfaktors bei unendlich hoher Ligandkonzentration und K_D = thermodynamische Dissoziationskonstante.

Es ist allerdings zu beachten, dass die beobachteten STD-Effekte u. a. von der Dissoziationsrate (*off rate*) der Ligandmoleküle abhängen. Eine sehr hohe Dissoziationsgeschwindigkeit kann eine nicht ausreichende Sättigungsübertragung auf den Liganden zur Folge haben. Eine zu langsame Dissoziation führt zu einer geringen Anzahl gesättigter Liganden in Lösung und damit zu Spektren mit einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis.^[241] Die Werte für k_{off} sollten mindestens 0.01 s^{-1} betragen.

Da die STD-NMR-Methode ligandbasiert ist, ist sie nicht nur auf lösliche Makromoleküle beschränkt. So sind z. B. HR-MAS-STD-Messungen mit Proteinen möglich, die auf *controlled pore glass beads* immobilisiert sind.^[245] Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Resonanzen des makromolekularen Bindungspartners nicht identifiziert werden müssen.

Die Effizienz der Spindiffusion steigt mit zunehmender Größe des Makromoleküls. Somit ist dieses Verfahren ebenfalls sehr gut für die Untersuchung von zellulären Systemen und Viren geeignet.^[246] Es ist daher z. B. möglich, membranständige Proteine zu untersuchen, ohne diese aus ihrer natürlichen Umgebung entfernen und damit einen Verlust ihrer Struktur und Funktionalität in Kauf nehmen zu müssen.^[247,248]

NMR-Messungen mit Proteinen oder zellulären Systemen (Kapitel 2.3.1) finden in der Regel in deuterierten wässrigen Medien statt. Die Unterdrückung des (Rest-)Wassersignals ist daher von entscheidender Bedeutung für das Gelingen eines NMR-Experiments.^[249] Hierzu können unterschiedliche Standardpulssequenzen angewendet werden. Bei der *presat*-Wasserunterdrückung wird das HDO-Signal durch selektive Einstrahlung auf die Frequenz der Wasserprotonen vorgesättigt. Bei einem WATERGATE-Experiment wird die Wasserunterdrückung über das Dephasieren mittels Feldgradienten mit einer einfachen Spin-Echo-Sequenz erreicht.^[250,251] Die Weiterentwicklung führte zum *excitation sculpting*-Experiment mit einer doppelten Spin-Echo-Sequenz mit selektivem Rechteckpuls.^[252]

2.3.1 STD-NMR-Experimente mit zellulären Systemen

Das Interesse an der Untersuchung membranständiger Rezeptoren wie den G-Proteingekoppelten Rezeptoren in ihrer nativen Umgebung hat in den letzten Jahren bei der Entwicklung von Medikamenten immer weiter zugenommen. Die GPCRs bilden die größte Familie der Membranproteine und vermitteln einen großen Teil der zellulären Antworten auf Hormone und Neurotransmitter.^[62]

NMR-Experimente ermöglichen die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden auf atomarer Ebene. Zur Untersuchung der GPCRs besteht hierfür die Möglichkeit, Liposomen aus Rezeptor-überexprimierenden Zellen (z. B. humane Osteosarcoma (HOS)-Zellen) herzustellen. Dieses Verfahren bietet mehrere Vorteile: zum einen ist die Herstellungsprozedur der Liposomen schnell und einfach; zum anderen werden die Rezeptormoleküle nicht aus ihrer nativen Umgebung entfernt und nachträglich in die Liposomenmembran integriert, wie dies bei Rekonstitutionsverfahren üblich ist (Kapitel 2.3.2).^[253] Liposomen besitzen zudem die ideale Größe für NMR-Experimente, da sie deutlich langsamer sedimentieren als Zellen.

Für die Charakterisierung der Wechselwirkung membranständiger GPCRs mit peptidischen Liganden kann das STD-NMR-Verfahren angewendet werden. Allerdings sind diese Untersuchungen nicht trivial, da es hierbei zum Auftreten störender Signale kommen kann. Ein angewendeter $T_{1\rho}$ -Filter (Spinlock) unterdrückt lediglich Signale großer Moleküle. Signale von Bindungsereignissen kleinerer Moleküle, die an zellulären Prozessen beteiligt sind, können auf diese Weise nicht effektiv eliminiert werden. Um solche Signale von den gewünschten Signalen unterscheiden zu können, wurde das STD-NMR-Verfahren erweitert.^[248] Es wird zunächst ein STD-NMR-Experiment einer Probe akquiriert, die

ausschließlich das Protein enthält. Dann wird ein zweites STD-NMR-Experiment einer Probe, die sowohl das Protein als auch den Liganden enthält, unter exakt gleichen Messbedingungen aufgenommen. Wird nun das STD-NMR-Spektrum der ligandfreien Probe von dem der ligandhaltigen Probe abgezogen, erhält man ein Spektrum, das nur die Signale des Bindungsereignisses zwischen Protein und Ligand zeigt. Das durch diese doppelte Differenzbildung erhaltene Spektrum wird als STDD-NMR-Spektrum bezeichnet (Abbildung 14:). Die Anwendung eines Spinlock-Filters, der zum Verlust der Ligandsättigung durch T_1 - und T_2 -Relaxation und damit zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen kann, kann in Einzelfällen völlig umgangen werden.

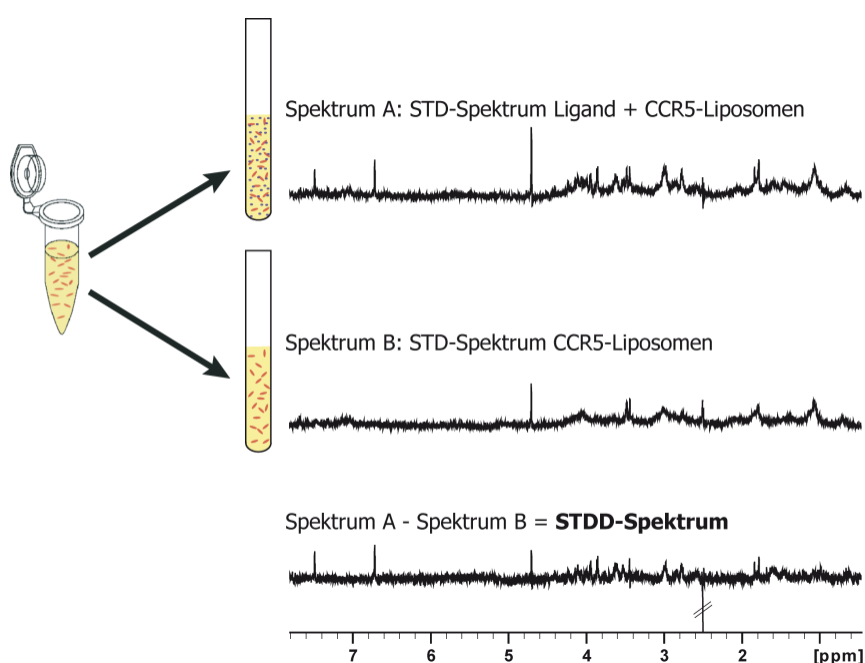


Abbildung 14: Prinzip des STDD-NMR-Experiments.

Es werden zwei STD-NMR-Spektren akquiriert: eines einer ligandfreien und eines einer ligandhaltigen Liposomenprobe. Die Differenz der beiden Spektren ergibt das STDD-NMR-Spektrum, welches nur Signale der interessierenden Ligand-Protein-Wechselwirkung zeigt.

Für die Erstellung eines Bindungs epitops werden die absoluten STD-Prozent-Werte benötigt. Diese werden durch den Vergleich der Integrale des STDD-NMR-Spektrums mit denen des *off resonance*-Spektrums erhalten. Die Aufnahme einer Titrationsreihe ermöglicht die Ermittlung der thermodynamischen Dissoziationskonstanten K_D des Liganden über die Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Rezeptorkonzentration (Gleichung 3, Kapitel 2.3).

STDD-NMR-Experimente wurden bereits erfolgreich mit dem auf Sepharose immobilisierten Enzym Cytidin-5'-monophosphatsialinsäure-Synthetase durchgeführt, um

die Interaktion mit dem Ligand Cytidin-5'-triphosphat zu charakterisieren.^[254] Es ist ebenfalls gelungen, eine Bibliothek mariner Naturstoffe in Interaktion mit den humanen Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2, die zur Familie der GPCRs gehören, zu untersuchen.^[255]

2.3.2 Liposomen

Liposomen sind kugelförmige Partikel, die aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut sind.^[256] Diese Membran umschließt einen wässrigen Innenraum. Liposomen bilden sich durch spontane Selbstassoziation von amphiphilen Molekülen, in der Regel Phospholipiden, im wässrigen Milieu. Zunächst dienten Liposomen zur Simulation von Diffusionsvorgängen durch Zellmembranen.^[257] Die Partikel können u. a. als Transportvehikel für hydrophile Wirkstoffe verwendet werden. In der Lipidmembran können lipophile bzw. amphiphile Moleküle inkorporiert werden.^[258]

Unterschieden werden Liposomen anhand ihrer Größe und ihrer Lamellarität.^[259] Sie werden in kleine unilamellare (*small unilamellar vesicles*, SUV), große unilamellare (*large unilamellar vesicles*, LUV), große multilamellare (*multilamellar vesicles*, MLV) und multivesikuläre (*multivesicular vesicles*, MVV) Liposomen unterteilt.

Die Lipidmembran von Liposomen ist ungefähr 5 nm dick. SUVs haben einen Durchmesser von bis zu 50 nm, LUVs bis zu 200 nm. Die Lipidhülle der LUVs ist weniger gekrümmt als die von SUVs. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Spannung der Membran und zu einer deutlich besseren (Lager-)Stabilität. MLVs bestehen aus mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten, bei MVVs werden ein oder mehrere kleine Liposomen von einer Lipiddoppelschicht umhüllt. Diese beiden Vesikeltypen können einen Durchmesser von 100 nm bis zu mehreren Mikrometern aufweisen.

Bei der Liposomenherstellung spielt die Phasenübergangstemperatur (T_C) eine wesentliche Rolle. Unterhalb dieser Temperatur bilden die Membranen eine geordnete, feste Gelphase. Die Lipidmoleküle liegen dabei in einem quasikristallinen Gitter hexagonal angeordnet vor. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur weisen die Lipide einen flüssigkristallinen Zustand auf. Dadurch wird den Lipidmolekülen eine laterale Diffusion innerhalb der Doppelschicht und eine Eigenrotation ermöglicht.^[260-262] Bei der Liposomenherstellung muss oberhalb der Phasenübergangstemperatur der jeweiligen Lipide gearbeitet werden. In den meisten Fällen liegt diese bei etwa 25 °C.^[263,264]

Zur Herstellung von Liposomen eignen sich unterschiedliche Verfahren. Bei der Filmmethode werden die Lipide in organischen Lösungsmitteln aufgenommen und diese anschließend entfernt, wobei sich ein gleichmäßiger Lipidfilm auf der Gefäßwand bildet.^[257]

Bei Aufnahme der Lipide in einen Puffer bilden sich spontan multilamellare Vesikel. Durch anschließende Extrusion (s. u.) erhält man große unilamellare Vesikel.^[265]

Bei der Herstellung mittels Detergenzanreicherung wird zunächst ebenfalls eine Lipidschicht auf eine Gefäßwand aufgebracht.^[266] Durch Zugabe von Detergenzien, wie z. B. Triton-X-100, werden die Lipide wieder in Lösung gebracht. Nach der Entfernung des Detergenzes durch Dialyse, Gelfiltration oder Adsorption werden LUVs in sehr guter Homogenität erhalten. Die Filmmethode und das Verfahren mittels Detergenzanreicherung eignen sich besonders gut zur Einkapselung hydrophiler Substanzen.

Liposomen mit membranständigen Molekülen lassen sich u. a. durch Rekonstitution erhalten. Dazu werden zunächst Liposomen nach der Filmmethode hergestellt. Im Anschluss werden diese mit gereinigten, His₆-gelabelten Membranproteinen oder Enzymen inkubiert. Die Inkorporation und Funktionalität kann mit geeigneten biochemischen Methoden (Immunoassays, Adhäsionsassays, Bestimmung der Enzymprodukte) kontrolliert werden.^[267-271]

Eine weitere Möglichkeit, Liposomen mit funktionalen Membranproteinen zu erhalten, bietet die Stickstoff-Homogenisation und anschließende Extrusion von Zellen.^[272] Geeignete Zellen, die das Membranprotein überexprimieren, werden in einem Puffer einem hohen Stickstoffdruck ausgesetzt. Das spontane Ablassen des Drucks führt zum Zerplatzen der Zellen. Durch mehrschrittige Zentrifugation werden nicht benötigte Zellbestandteile von den Membranfragmenten abgetrennt. Diese Fragmente werden dann während der Extrusion wiederholt durch eine Filtermembran geeigneter Porengröße gepresst.^[273] Dabei formen sich LUVs in der gewünschten Größe aus. Durch die Krümmung der Membran liegen die membranständigen Proteine überwiegend in der richtigen Orientierung vor. Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass die Proteine während des gesamten Prozesses in ihrer nativen Umgebung vorliegen und durch die Zentrifugation keine weiteren Reinigungsschritte notwendig sind. Eine Kontrolle über die erfolgreiche Inkorporation der Membranproteine mit biochemischen Methoden entfällt in der Regel ebenfalls.

NMR-spektroskopische Untersuchungen mit CCR5-tragenden Liposomen aus humanen Osteosarcomazellen konnten bereits erfolgreich durchgeführt werden.^[274] Für die NMR-

Experimente kann bereits während der Extrusion ein geeigneter deuterierter Puffer eingesetzt werden, so dass ein zeit- und materialaufwändiger Pufferwechsel entfällt.

2.4 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung von biologisch aktiven Liganden mit Rezeptormolekülen oder Enzymen kommt seit den 1990er Jahren ein Sensorchip-Verfahren zum Einsatz, bei dem man sich das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) zunutze macht.^[275]

Die SPR-Methode ermöglicht das Verfolgen von Bindungsereignissen in Echtzeit unter annähernd physiologischen Bedingungen in einem wässrigen Pufferflusssystem. Eine Markierung (z. B. durch Fluoreszenzfarbstoffe) der zu untersuchenden Substanzen, die zu einer Änderung der Bindungseigenschaften führen kann, ist hierbei nicht nötig. Die hohe Empfindlichkeit der Messmethode ermöglicht das Arbeiten mit niedermolekularen Verbindungen und sehr geringen Stoffmengen. Die Untersuchung von Systemen mit Bakterien, Viren und Zellen sowie membranständigen Rezeptoren ist ebenfalls möglich.^[268,276-278]

SPR-Messchips bestehen aus einem mit Metall beschichteten Glasträger, über den ein Bindungspartner durch eine Flusszelle geleitet wird (Abbildung 15). Aufgrund der Inertheit gegenüber (Luft-)Sauerstoff besteht die Metallbeschichtung meistens aus Gold. Trifft parallel polarisiertes Licht unter Totalreflexion auf die Grenzfläche zwischen Glasträger und Goldschicht, entsteht im optisch dünneren Medium ein evaneszierendes Feld. Innerhalb des optisch dünneren Mediums nimmt die Intensität der evaneszierenden Welle exponentiell ab. Die Eindringtiefe der Welle entspricht dabei in etwa der Wellenlänge des verwendeten Lichtstrahls. Unter bestimmten Einfallswinkeln kommt es zur Anregung von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche der leitenden Metallschicht. Eine Wechselwirkung der Oberflächenplasmonen mit der evaneszierenden Welle verstärkt das Feld im optisch dünneren Medium.^[279-281]

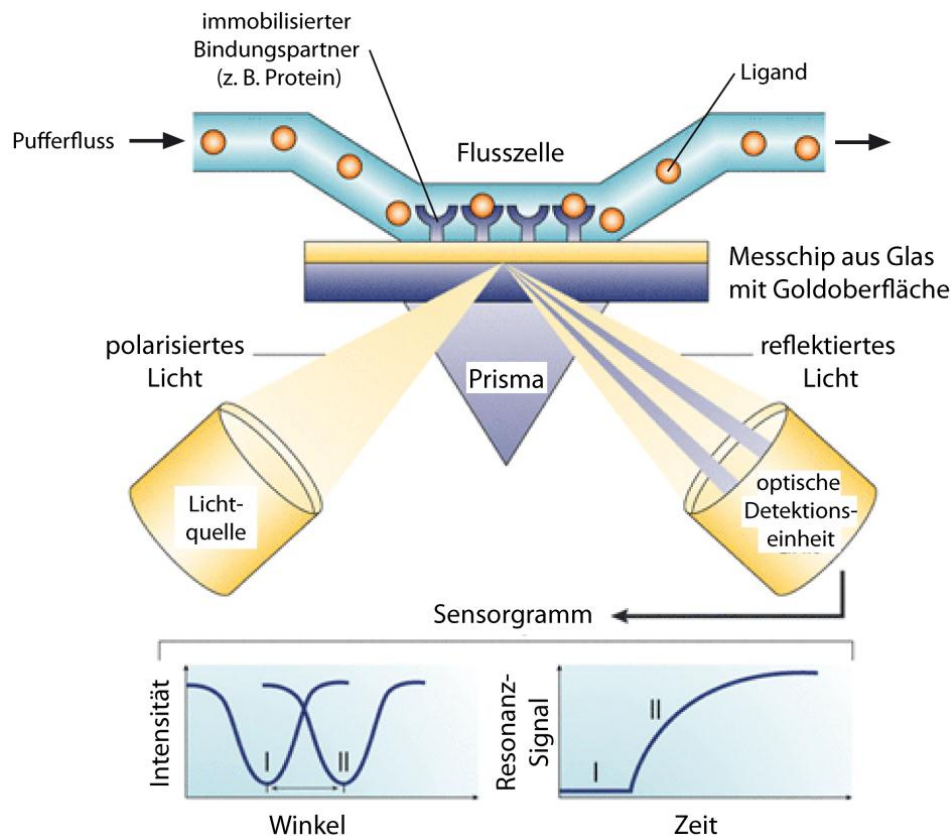


Abbildung 15: Messprinzip der SPR-Methode.

Trifft parallel polarisiertes Licht unter Totalreflexion auf die Grenzfläche von zwei unterschiedlich optisch dichten Medien, entsteht im optisch dünneren Medium ein evaneszierendes Feld. Unter bestimmten Einfallswinkeln kommt es zur Anregung von Oberflächenplasmonen einer leitenden Metallschicht an der Grenzfläche. Eine Wechselwirkung der Oberflächenplasmonen mit der evaneszierenden Welle verstärkt das Feld im optisch dünneren Medium. Bei dem Winkel, in dem Totalreflexion auftritt, kommt es zur Intensitätsabschwächung des reflektierten Lichts. Das erhaltene Signal entspricht der Änderung dieses Winkels und wird in *response units* (RU) angegeben.^[282]

Bei dem Winkel, in dem Totalreflexion auftritt, kommt zu einer Intensitätsabschwächung des reflektierten Lichts. Eine Änderung dieses Winkels um 0.1° wird durch eine Änderung des Brechungsindex im optisch dünneren Medium von $1 \cdot 10^{-3}$ hervorgerufen. Zurzeit erhältliche Geräte ermöglichen die Verfolgung von Winkeländerungen von 0.0001° . Das erhaltene Signal entspricht der Änderung des Resonanzwinkels und wird in *response units* (RU) angegeben. Werden Proteine untersucht, so ist die Änderung des Resonanzsignals nahezu proportional zur Massenzunahme und der Änderung des Brechungsindex in der Nähe der Chipoberfläche.^[283] Die Zunahme des Signals von 1 RU entspricht in etwa einer gebundenen Masse von 1 pg/mm^2 .

Die Goldoberfläche kann für die Immobilisierung des einen Bindungspartners unterschiedlich funktionalisiert werden. Biotinylierte Proteine können z. B. über Streptavidin

und Proteine mit His₆-Tag über einen Nickelchelatkomplex gebunden werden. Moleküle, die Thiolgruppen enthalten, können direkt auf der Goldoberfläche immobilisiert werden.^[284] Soll ein Bindungspartner mittels Amidkupplung immobilisiert werden, kann dies mithilfe einer carboxymethylierten Dextranschicht geschehen.

Nach der Immobilisierung des einen Bindungspartners wird der zweite in einem geeigneten Puffer durch die Flusszelle geleitet. Tritt ein Bindungsereignis ein, so ändern sich der Resonanzwinkel und damit das SPR-Antwortsignal. Da auch nichtspezifische Bindungsereignisse und Einflüsse des Laufpuffers zu einer Änderung der SPR-Antwort führen können, wird parallel zur eigentlichen Messung eine Referenzmessung mit einer Flusszelle durchgeführt, in der kein Bindungspartner immobilisiert wurde.

Die Differenz der Signale der Mess- und der Referenzzelle stellen somit das eigentliche Sensorgramm dar. Abbildung 16 zeigt schematisch den idealisierten Verlauf eines SPR-Experiments.^[285]

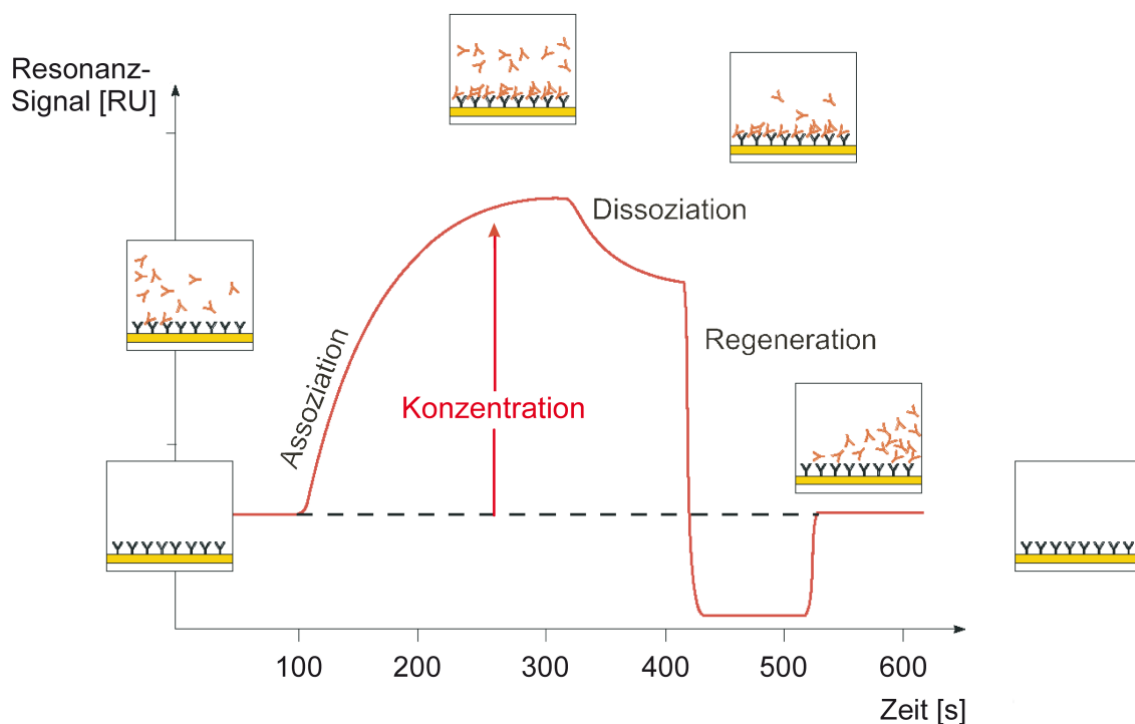


Abbildung 16: Idealisiertes Sensorgramm einer SPR-Messung.

Das Sensorgramm wird durch die Auftragung der *resonance units* [RU] gegen die Zeit erhalten. Die Assoziationsphase der Messung beginnt mit der Injektion des mobilen Bindungspartners. Im Idealfall wird innerhalb des Injektionszeitraums ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation erreicht (Sättigung). Nach dem Ende der Injektion kommt es zur Dissoziation der Probenmoleküle. Wird keine vollständige Regeneration der Chipoberfläche erreicht, kann dies durch Zugabe von Detergenzien (z. B. SDS) oder Änderung des pH-Werts herbeigeführt werden. Die kinetischen Parameter (k_{on} , k_{off}) können aus dem Kurvenverlauf erhalten werden. Der Wert der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D kann durch die Aufnahme einer Konzentrationsreihe und die Anpassung an ein geeignetes Bindungsmodell erhalten werden.

Erfolgen die Bindungsprozesse nicht zu schnell, lassen sich direkt aus dem Sensorgramm die kinetischen Daten der Assoziation (k_{on}) und der Dissoziation (k_{off}) und damit die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D bestimmen (Gleichung 4).^[286]

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad \text{Gleichung 4}$$

Gleichung 4: Berechnung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D .

k_{on} = Assoziationskonstante und k_{off} = Dissoziationskonstante, [A] = Konzentration des immobilisierten Bindungspartners, [B] = Konzentration des Bindungspartners in Lösung, [AB] = Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes.

In bestimmten Fällen kann die Bestimmung der Dissoziationskonstante nur über die Aufnahme von Konzentrationsreihen möglich sein.^[287,288] So kann es bei den Messungen zu einer Verfälschung der Werte von k_{on} und k_{off} durch Rückbindungseffekte, Massentransportlimitierungen des mobilen Bindungspartners bei hohen Konzentrationen und langsamen Flussraten oder die gerätespezifische Datenrate kommen.^[289,290] Der K_D -Wert kann dann durch die Anpassung an ein geeignetes Bindungsmodell erhalten werden. Dazu werden die maximalen Werte der SPR-Antwort gegen die Konzentration des mobilen Bindungspartners aufgetragen. Dem *one site binding*-Modell liegt Gleichung 5 zugrunde.

$$RU = \frac{RU_{max} \cdot c_B}{K_D + c_B} \quad \text{Gleichung 5}$$

Gleichung 5: K_D -Wert-Bestimmung bei SPR-Experimenten durch mathematische Anpassung an das *one site binding*-Modell.

RU = Gleichgewichtswert der SPR-Antwort bei der Konzentration c , RU_{max} = Sättigungswert der SPR-Antwort bei unendlich hoher Konzentration des gelösten Liganden, c_B = Konzentration des in Lösung befindlichen Bindungspartners, K_D = thermodynamische Dissoziationskonstante [mol/L]. Das Ergebnis der Anpassung ist eine Funktion, die direkt die Dissoziationskonstante der Konzentration bei $RU_{max}/2$ ergibt.

Moderne SPR-Geräte ermöglichen die Bestimmung von K_D -Werten bei unterschiedlichen Temperaturen und dadurch zusätzlich die Ermittlung thermodynamischer Daten der Entropie und Enthalpie.

3 Zielsetzung der Arbeit

Das HI-Virus befällt Zellen des humanen Immunsystems. Für die Bindung an humane Wirtszellen sind mehrere Interaktionsschritte notwendig. Nach der Bindung an den CD4-Rezeptor kommt es zur Exposition des V3-Loops des viralen GP120. Der V3-Loop tritt in Wechselwirkung mit einem membranständigen Corezeptor aus der Familie der GPCRs (CCR5 oder CXCR4).^[119] Im Anschluss kommt es zur Fusion des Virus mit der Wirtszelle. Da es sich um ein frühes Stadium des HIV-Replikationszyklus handelt, ist die Inhibition des HIV *entries* ein sehr gut geeigneter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Jedoch ist die genaue Interaktion zwischen dem V3-Loop und den Corezeptoren noch weitgehend unbekannt. Teilen der V3-Sequenz sowie der Glycosylstruktur an Position 301 wird eine entscheidende Bedeutung beim HIV *entry* zugeschrieben.^[291] Für ein genaues Verständnis sind daher Untersuchungen auf molekularer und besonders atomarer Ebene unverzichtbar.

Hierfür sollen u. a. Peptide aus dem C-terminalen V3-Bereich, sowie lineare und cyclische Peptide und Glycopeptide, die die gesamte Sequenz des V3-Loops beinhalten, untersucht werden. Als Referenz zu vorangegangenen Studien sollen ein kürzeres Peptid sowie ein Glycopeptid aus dem N-terminalen Bereich des V3-Loops dienen.^[274] Glycopeptide sollen an Position 301 das Minimalmotiv eines Komplex-Typ-N-Glycans, die Chitobiose, enthalten. Das Disaccharid soll zunächst dargestellt und in einer linearen Synthesestrategie in Form eines Chitobiosylasparagin-Bausteins mittels SPPS in die Peptide eingebaut werden. Zwei Stufen der literaturbekannten fünfstufigen Bausteinsynthese sollen dabei optimiert werden.

Die Konformation der Peptide soll mittels CD-Spektroskopie sowie NOESY-NMR-Experimenten analysiert werden. Zur Untersuchung der Interaktion der Peptide und Glycopeptide mit dem CCR5-Corezeptor sollen zwei Methoden, STDD-NMR und SPR, angewendet werden. Dafür werden HOS-Zellen eingesetzt, die den membranständigen Corezeptor überexprimieren. Dieser muss somit für die unterschiedlichen Analysetechniken nicht aus seiner nativen Umgebung entfernt werden. Untersuchungen mittels SPR ermöglichen die Analyse der Kinetik sowie der Affinität der V3-CCR5-Bindung.^[275] Mithilfe von STDD-NMR-Studien können zusätzlich detaillierte Bindungsepitope auf atomarer Ebene sowie kinetische Daten erhalten werden.^[248]

Die Ergebnisse der Untersuchungen können somit eine wertvolle Grundlage für das Design potenzieller *entry*-Inhibitoren sein.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese des N_γ -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6)

Das Asparagin an Position 301 des V3-Loops des GP120 trägt eine Glycosylierung des komplexen Typs. Die Darstellung dieser Kohlenhydratstruktur kann auf chemischem oder enzymatischem Weg erfolgen. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bindungsstudien mittels SPR und STD-NMR wurde die Saccharidstruktur auf das Minimalmotiv, die Chitobiose (β -D-GlcNAc- β 1,4-D-GlcNAc), reduziert. Eine komplexere Kohlenhydratstruktur würde eine Signalzuordnung bei den NMR-Experimenten erheblich erschweren. Untersuchungen, die den Einfluss einer komplexeren Glycosylierung des V3-Loops auf die Bindungeigenschaften mit CCR5 zum Schwerpunkt haben, wurden in vorangegangenen Arbeiten durchgeführt.^[292,293]

Die Syntheseroute der Darstellung des N_γ -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6) ist in Abbildung 17 gezeigt.

Als Edukt für den ersten Syntheseschritt diente preiswertes Chitin (1) aus Krabbenschalen.^[294] Das Chitin (1) wurde zunächst fein gemahlen und in einem Gemisch aus Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid unter Einwirkung von Ultraschall zu Chitobioseoctaacetat (2) umgesetzt. Anschließend wurde das Produktgemisch, das neben Chitobiose noch GlcNAc-Monomere sowie Tri- und Tetramere enthielt, säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Anstelle der Trennung mittels Kieselgelsäule hat es sich als sinnvoll erwiesen, eine Filtration über einen mit Kieselgel befüllten Büchnertrichter durchzuführen. Diese Form der Reinigung führte wesentlich schneller und mit vergleichbarem Ergebnis zur Abtrennung des Rohprodukts für die abschließende Umkristallisation aus Ethanol. Dadurch wurde selektiv das α -Anomer erhalten.

Anschließend erfolgte die Deacetylierung nach Zemplén *et al.* mit einer frisch angesetzten Natriummethanolatlösung (pH 9) zu Chitobiose (3), welche als α/β -Anomerengemisch (5:1) erhalten wurde.^[295] Überschüssige Salze wurden mittels Biogelsäule abgetrennt. Die Einführung einer β -Aminofunktion am anomeren Zentrum wurde durch Umsetzung mit einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonatlösung und anschließender Trocknung bis zur Gewichtskonstanz an einer Gefriertrocknungsanlage erreicht.^[296]

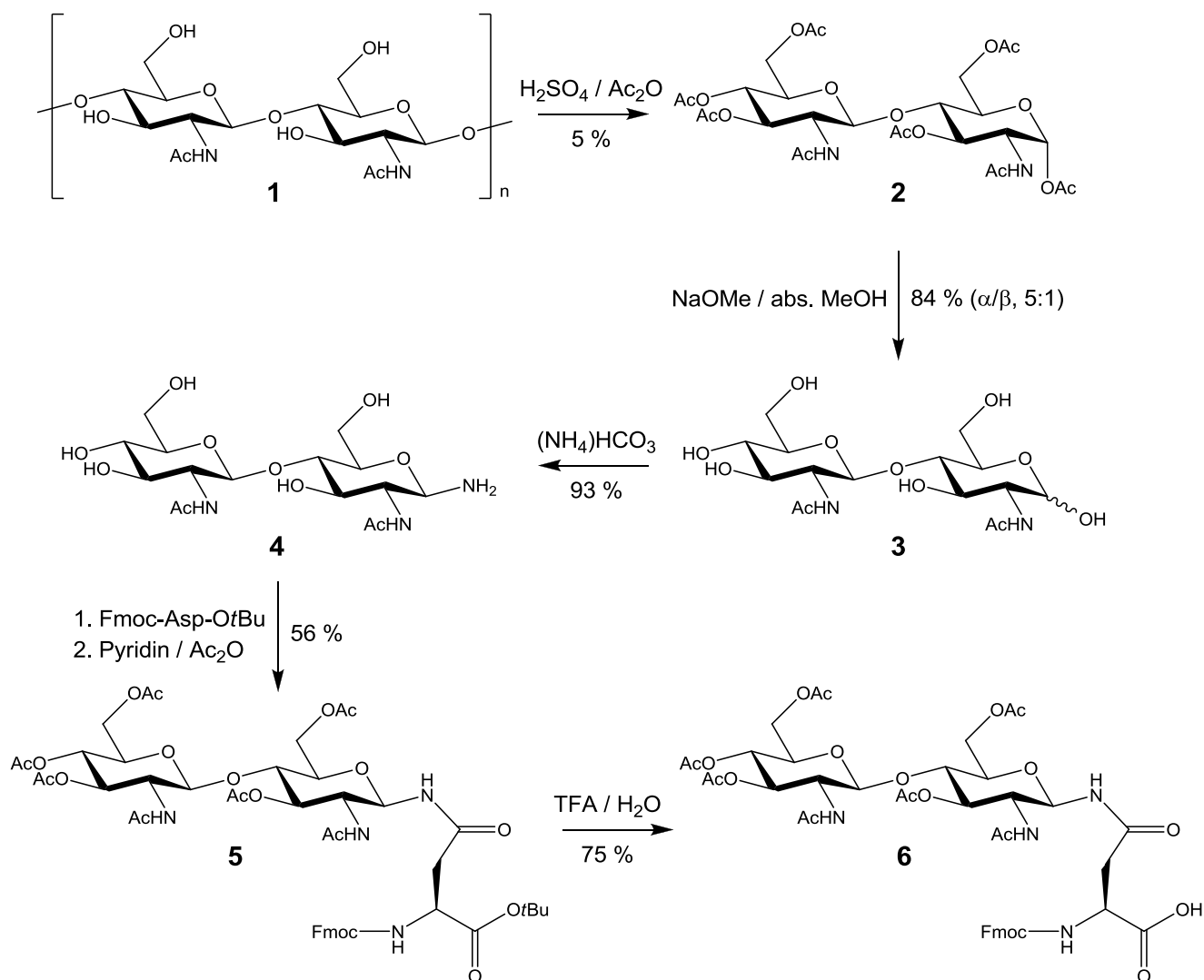


Abbildung 17: Darstellung des *N*₇-Chitobiosylasparagin-Bausteins (6).

Aus Chitin (**1**) gewonnene Chitobiose wurde *in situ* für die säulenchromatografische Reinigung acetyliert (**2**). Nach der basischen Deacetylierung (**3**) wurde durch Umsetzung mit Ammoniumhydrogencarbonat selektiv das β -Chitobiosylamin (**4**) erhalten. Dieses konnte mit Fmoc-L-Asp-OtBu zum Chitobiosylasparagin-Baustein (**5**) gekuppelt werden. Vor dem Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese musste die Carboxylfunktion unter sauren Bedingungen geschützt werden (**6**).

Das erhaltene Chitobiosylamin (**4**) wurde für die Bausteinkupplung im nächsten Schritt an den Hydroxylfunktionen geschützt, da acetylierte Kohlenhydrate eine zu geringe Nucleophilie aufweisen. Zur Bausteinkupplung wurde das Chitobiosylamin (**4**) mit Fmoc-L-Asp-OtBu zu Fmoc-Asn(β -D-GlcNAc- β 1,4-D-GlcNAc)-OtBu (**5**) umgesetzt. Diese Reaktion erfolgte analog zur Verknüpfung zweier Aminosäuren unter Aktivierung der Seitenkettencarboxylfunktion des Asparagins mit TBTU. Der Einsatz von HATU führte in vorangegangenen Arbeiten zu zahlreichen Nebenprodukten durch Reaktionen der saccharidischen Hydroxylfunktionen, weshalb auf dessen Einsatz verzichtet wurde.^[130] Die Aminosäure wurde im Unterschuss (0.9 Äq) eingesetzt, um Ausbeuteverluste durch unerwünschte Reaktionen an den

freien Hydroxylgruppen des Kohlenhydrats zu vermeiden. Ebenfalls aus diesem Grund wurde bei tiefen Temperaturen in einer Stickstoffatmosphäre gearbeitet.^[130]

Für den späteren Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese wurden die Hydroxylgruppen der Saccharideinheit durch eine *in situ* Acetylierung mit Essigsäureanhydrid geschützt (**5**). Um den an der α -Carboxylgruppe entschützten Baustein (**6**) zu erhalten, wurde die *tert*-Butyl-Schutzgruppe im finalen Schritt vor dem Einsatz in der Peptidsynthese unter sauren Bedingungen (TFA/H₂O) entfernt. Bei diesem einfach durchführbaren Entschützungsprozess wurden überschüssige Reagenzien und das entstandene Isobuten im Ölpumpenvakuum entfernt. Weitere Reinigungsschritte waren nicht notwendig.^[130,292]

Um die Ausbeute an Baustein (**6**) zu erhöhen, wurde diese bereits bekannte Syntheseroute an mehreren Stellen abgewandelt.

Die Umsetzung zum Chitobioseoctaacetat (**2**) verlief bislang in schlechten bis mäßigen Ausbeuten. Dies kann z. T. auf das Auftreten einer unerwünschten irreversiblen Ringöffnung der reduzierenden GlcNAc-Einheit der Chitobiose zum Aldehyd zurückzuführen sein. Um dies zu vermeiden, darf die Temperatur während der Spaltung des Chitins (**1**) 34 °C nicht überschreiten. Bei zu niedriger Temperatur wiederum ist die Bildung längerer Oligomere bevorzugt. Daher wurde eine Strategie erprobt, in der das Chitin (**1**) zunächst in HCl unter Einwirkung von Ultraschall hydrolysiert wurde und das so erhaltene kolloidale Chitin enzymatisch zur Chitobiose (**3**) abgebaut wurde (Kapitel 4.1.1).

Bei der Reaktion zum Chitobiosylamin (**4**) mit gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung wird in wässriger Lösung gearbeitet. Die bei der Reaktion gebildeten Salze und das Wasser müssen nach der Reaktion zügig und sorgfältig mittels Gefriertrocknung abgetrennt werden, da es sonst zur Rückreaktion zur Chitobiose (**3**) kommt. Das Chitobiosylamin (**4**) ist daher nur in geringem Maße zur Lagerung geeignet und muss in der Regel sofort für die nachfolgende Kupplung mit der Aminosäure eingesetzt werden. Eine alternative Möglichkeit für die Aminierung von Chitobiose (**3**), bei der ein lagerstabiles Produkt erhalten wird, bietet die Umsetzung mit Ammoniumcarbammat zum Carbamidsäuresalz (**4b**) (Kapitel 4.1.2).^[297]

4.1.1 Enzymatische Gewinnung von Chitobiose (**3**)

Enzyme finden in der organischen Chemie eine breite Anwendung. Sie ermöglichen u. a. die Isolierung von hochverzweigten Oligosacchariden ebenso wie deren selektive Degradation aus komplexeren Strukturen.^[298-300] Der stereo- und regioselektive Aufbau komplexer Oligo-

saccharidstrukturen mittels klassischer organischer Synthese ist nicht trivial. Häufig kommt es zur Bildung von Nebenprodukten, die u. U. nach jedem Syntheseschritt abgetrennt werden müssen. Dies kann mit steigender Anzahl von Reaktionsschritten zu erheblichen Ausbeuteverlusten führen und bedeutet einen erhöhten zeitlichen Aufwand.

Der Einsatz von Enzymen bietet daher mehrere Vorteile. Bei einer hohen Substratspezifität der Enzyme werden die stereo- und regioselektiven Produkte in meist hohen Ausbeuten ohne größere Anteile an Nebenprodukten erhalten. Aufgrund der selektiven Arbeitsweise der Enzyme erfolgen diese Reaktionen mit einem hohen Maße an Reproduzierbarkeit. Nachteilig wirken sich die häufig hohen Kosten für die rekombinant gewonnenen Enzyme aus. Die Substratspezifität führt zu einer begrenzten Einsatzmöglichkeit unter speziellen Reaktionsbedingungen, die für jede Anwendung untersucht und evtl. optimiert werden müssen. So müssen die gewünschten Reaktionen im optimalen pH-Bereich des Enzyms möglich sein. Auch dürfen die gebildeten Produkte und Nebenprodukte die Funktionalität des Enzyms nicht einschränken.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Enzym Chitinase (EC 3.2.1.14, aus *Streptomyces griseus*) spaltet selektiv β 1,4-glycosidische Bindungen von Chitinpolymeren.^[301] Um eine optimale Effizienz des enzymatischen Umsatzes zu erreichen, müssen die langen Chitinketten (**1**) zunächst in kürzere Oligomere degradiert werden. Dies erfolgt durch Aufnahme in eine konzentrierte Salzsäurelösung unter Einwirkung von Ultraschall.^[297,302] Das auf diesem Weg erhaltene kolloidale Chitin besteht aus Chitinoligomeren mit einer Kettenlänge von etwa 20 - 30 Monomereinheiten. Die Syntheseroute der enzymatischen Gewinnung von Chitobiose (**3**) ist in Abbildung 18 gezeigt.

Im Anschluss wird das Enzym hinzugegeben. Das pH-Optimum der Chitinase liegt bei 6.4 und das Temperaturoptimum bei 37 °C. Diese Bedingungen müssen über den gesamten Reaktionszeitraum von 15 Tagen aufrechterhalten werden, da es bei langen Reaktionszeiten unter basischen Bedingungen durch die Deacetylierung der Aminogruppen zu einer Chitosanbildung kommen kann. Die erhaltene rohe Chitobiose (**3a**) liegt zunächst in einem Gemisch mit anderen kurzkettigen Chitinoligomeren und GlcNAc-Monomeren vor, die sich bei der enzymatischen Hydrolyse bilden. Für eine Umkristallisation des Chitobioseoctaacetats (**2**) aus Ethanol muss das Saccharidgemisch mit Essigsäureanhydrid acetyliert werden. Die Umkristallisation bietet den Zugang überwiegend zum α -Anomer des Chitobioseoctaacetats (**2**). Um die Chitobiose (**3**) zu erhalten, wird die acetylierte Chitobiose (**2**) abschließend unter basischen Bedingungen mit Natriummethanolat entschützt.^[297]

Die Hydrolyse des Chitins (**1**) erforderte im Gegensatz zu dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Weg keine strenge Temperaturkontrolle, da das Polysaccharid in wesentlich geringerem Ausmaß unter Erhalt längerer Kohlenhydratketten abgebaut wird. Das kolloidale Chitin konnte auf diesem Weg in einer Ausbeute von 9 % erhalten werden (Abbildung 18). Diese liegt deutlich unter der in der Literatur angegebenen Ausbeute von 63 %.^[302]

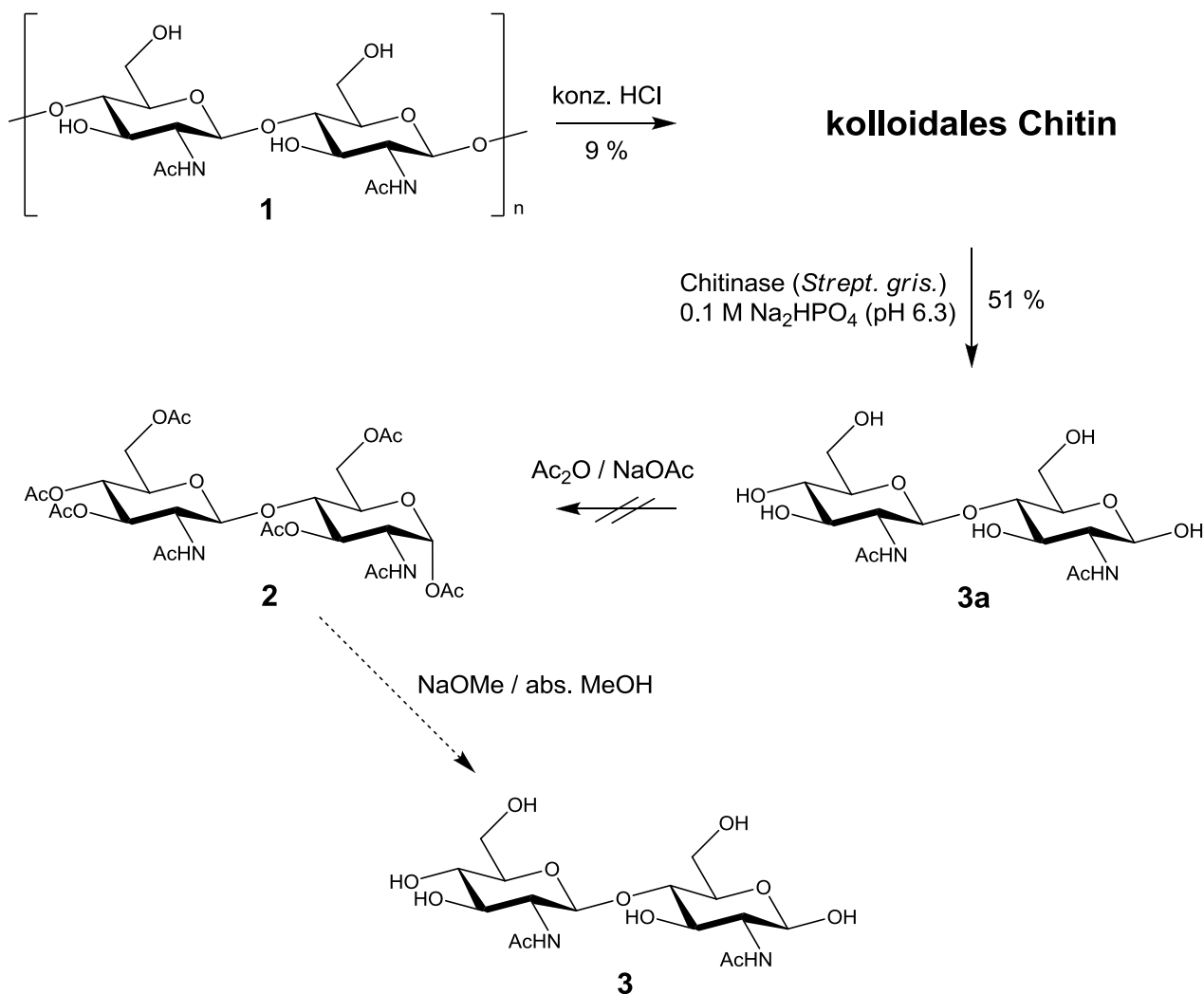


Abbildung 18: Enzymatische Gewinnung von Chitobiose (3) mit dem Enzym Chitinase.

Chitin (**1**) wurde zunächst zu kolloidalem Chitin abgebaut. Der Verdau mit dem Enzym Chitinase (aus *Streptomyces griseus*) machte die rohe Chitobiose (**3a**) in einem Gemisch mit anderen kurzkettigen Chitinoligomeren zugänglich. Die anschließende Acetylierung lieferte nicht das gewünschte Produkt (**2**). Daher konnten die folgende Umkristallisation und die Deacetylierung zur Chitobiose (**3**) nicht durchgeführt werden.

Da die Edukte Chitin (**1**) und Salzsäure leicht verfügbar und sehr preiswert sind, wurde keine Optimierung dieses Syntheseschritts durchgeführt. Zudem war die erhaltene Stoffmenge an kolloidalem Chitin für die anschließende enzymatische Umsetzung zur rohen Chitobiose (**3a**) ausreichend.

In einem Inkubator wurde das kolloidale Chitin in einem 0.1 M Na_2HPO_4 -Puffer aufgenommen und mit Chitinase versetzt. Das Gemisch wurde für 15 Tage bei 37 °C gerührt, wobei der pH-Wert regelmäßig kontrolliert wurde. Eine Änderung des pH-Wertes durch die Hydrolyseprodukte konnte nicht beobachtet werden. Nach Filtration und anschließendem Einengen des Filtrats wurde das Produktgemisch (rohe Chitobiose (**3a**)) in 51 % Ausbeute bezogen auf die Literatursausbeute erhalten.^[297] Eine massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS sowie eine NMR-spektroskopische Analyse der rohen Chitobiose (**3a**) bestätigte die Anwesenheit von Chitobiose (**3**) im Produktgemisch.

Die geringe Ausbeute lässt sich durch den Einsatz von zu fein gemahlenem Chitin erklären. Im Schritt der Hydrolyse mit Salzsäure kann es dadurch zur Bildung von einem großen Anteil sehr kurzer Chitinketten kommen. Hierdurch und durch die sehr lange Reaktionszeit wird der enzymatische Abbau zugunsten der Bildung von GlcNAc-Monomeren beeinflusst. Eine z. T. nichtvollständige Hydrolyse kann zu länger-kettigen Saccharidoligomeren geführt haben, die im Filtrationsschritt abgetrennt wurden und somit ebenfalls zu Ausbeuteverlusten führten.

Nach der anschließenden Acetylierung und Umkristallisation des Chitobioseoctaacetats (**2**) wurde ein schwerlöslicher farbloser Feststoff erhalten. Der R_f -Wert von 0.30 stimmte gut mit dem Literaturwert von 0.31 überein. Eine massenspektrometrische Analyse per MALDI-TOF-MS und eine Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie (in $\text{DMSO}-d_6$) konnten die Anwesenheit von Chitobioseoctaacetat (**2**) nicht bestätigen. Die NMR-spektroskopischen Messungen deuteten darauf hin, dass es zu einer Abspaltung der Acetylgruppen gekommen sein könnte. Dies wurde nicht näher untersucht. Die Nebenprodukte, die auf dieser Stufe des Synthesewegs entstanden sind, konnten somit weder per NMR noch per MALDI eindeutig identifiziert werden. Um den Acetylierungsschritt zu umgehen und damit die Bildung möglicher Nebenprodukte zu vermeiden, kann es sinnvoll sein, die rohe Chitobiose (**3a**) über eine Biogelsäule zu reinigen.

Die generell schlechten Ausbeuten bei der Herstellung des kolloidalen Chitins und der enzymatischen Degradation zur rohen Chitobiose (**3a**) führten dazu, dass keine weiteren Optimierungsversuche dieser Synthesestrategie durchgeführt wurden.

Ob der Einsatz von weniger fein gemahlenem Chitin zu einer gesteigerten Ausbeute führt und insgesamt der Einsatz des teuren Enzyms gerechtfertigt ist, bleibt zu untersuchen. Eine mögliche Rückgewinnung des Enzyms für einen erneuten Einsatz stellt eine Möglichkeit dar, die Kosten zu verringern. Dies erfordert jedoch eine sorgfältige Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch mittels Dialyse oder Ultrafiltration und die Lagerung des Enzyms unter

optimalen Bedingungen. Eine nichtvollständige Regeneration der Enzymaktivität kann hierbei die Folge sein. Ein ähnlicher Ansatz zur Gewinnung von Chitobiose ohne den kostenintensiven Einsatz von Enzymen erscheint vielversprechend.^[303]

4.1.2 Aminierung von Chitobiose (3) zu Chitobiosylamin (4)

Glycosylamine sind in Regelfall nicht lagerstabil. Bereits geringe Spuren von Wasser können dazu führen, dass das Amin zur entsprechenden Hydroxylverbindung reagiert. Ebenfalls kann ein diglycosyliertes Amin gebildet werden.

Eine einfache Syntheseroute, die einen Zugang zu unterschiedlichen lagerfähigen Glycosylaminen ermöglicht, wurde von Likhoshev *et al.* beschrieben.^[304] Die analoge Umsetzung von enzymatisch gewonnener Chitobiose (3) (Kapitel 4.1.1) zum Chitobiosylamin (4) basiert auf den Untersuchungen von Hackenberger *et al.*^[297]

Chitobiose (3) wird in Methanol mit einem vierfachen Überschuss Ammoniumcarbamat versetzt. Dabei wird unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid Ammoniak gebildet, der *in situ* mit dem Kohlenhydrat zum Amin (4a) reagiert (Abbildung 19). Durch den Nachbargruppen-effekt der *N*-Acetylgruppe wird selektiv das β -Anomer erhalten. Das Arbeiten mit hohen Überschüssen des Carbamats führt zur Bildung eines Carbamidsäuresalzes (4b), welches als farbloser Feststoff erhalten wird. Solange die Trocknung im Feinvakuum weniger als zehn Sekunden lang durchgeführt wird, ist dieses Salz lagerstabil. In einem einfachen Schritt kann das Addukt für die anschließende Aminosäurekupplung aktiviert werden. Dazu muss das Salz (4b) lediglich für einen Zeitraum von etwa zehn Minuten im Feinvakuum behandelt werden, woraufhin das Chitobiosylamin (4) erhalten wird.

Das Chitobiosylamin (4) konnte in D₂O NMR-spektroskopisch eindeutig durch das im Vergleich zum Edukt etwas hochfeldverschobene Dublett von H-1 bei 4.17 ppm nachgewiesen werden.

Die anschließende Kupplung mit Fmoc-L-Asp-O*t*Bu zum geschützten Chitobiosylasparagin-Baustein (5) verlief in sehr schlechten Ausbeuten. So wurden auf diesem Weg lediglich 6 % des Produkts (5) erhalten, im Gegensatz zur Umsetzung des Chitobiosylamins (4), welches aus Chitobiose (3) durch Zugabe von NH₄HCO₃ dargestellt wurde (56 %, Abbildung 17).

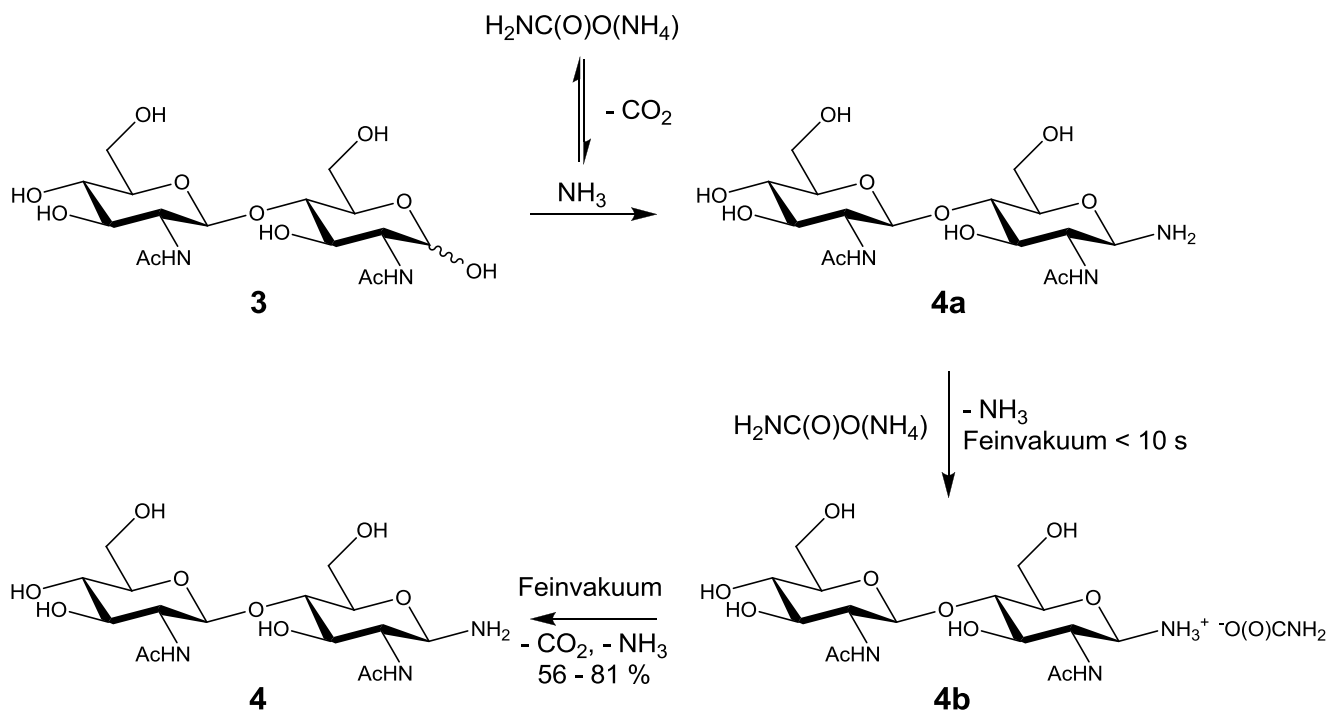


Abbildung 19: Darstellung von Chitobiosylamin (4) aus Chitobiose (3) mit Ammoniumcarbammat.

Chitobiose (3) wurde mit Ammoniumcarbammat versetzt. Dabei bildete sich zunächst das Chitobiosylamin (4a), das mit einem Überschuss $\text{H}_2\text{NC(O)O(NH}_4\text{)}$ zum Carbamidsäuresalz (4b) reagierte. Dieses Produkt ist im Gegensatz zum Amin (4a) lagerstabil. Durch Einwirkung von Feinvakuum konnte das Salz (4b) für die Kupplung des Chitobiosylasparagin-Bausteins (5) zum Amin (4) umgesetzt werden.

Daraufhin wurde eine NMR-spektroskopische Reaktionsverfolgung über 85 Stunden durchgeführt. Hierfür wurden 13 mg (32 μmol) Chitobiose (3) und 10.0 mg (128 μmol) Ammoniumcarbammat in je 400 μL deuteriertem Methanol aufgenommen, in einem NMR-Röhrchen zusammengegeben und ^1H -NMR-Spektren bei 310 K (37 °C) akquiriert. Für die Aufnahme der Spektren wurde eine Scanzahl von 64 gewählt.

Die Integrale der anomeren Protonen H-1 des Eduktes (3) (α und β) wurden mit dem Integral des anomeren Protons des Amins (4) ins Verhältnis gesetzt, um den Reaktionsfortschritt abschätzen zu können (Tabelle 2).

Tabelle 2: NMR-spektroskopische Reaktionsverfolgung der Umsetzung von Chitobiose (3) mit Ammoniumcarbammat zum Chitobiosylamin (4) in MeOD.

Verschiebung ¹ H	5.06 ppm	4.59 ppm	4.17 ppm	
Reaktionsdauer [h]	Integral H-1 α (Chitobiose (3))	Integral H-1 β (Chitobiose (3))	Integral H-1 (Chitobiosylamin (4))	Verhältnis Produkt/Edukt
0.78	0.504	0.412	0.066	0.072
24.1	0.434	0.376	0.070	0.087
36.2	0.580	0.329	0.083	0.091
48.3	0.561	0.327	0.093	0.105
60.4	0.592	0.396	0.102	0.130
72.9	0.558	0.316	0.114	0.130
85.0	0.579	0.287	0.122	0.141

Der geringe Anteil des Chitobiosylamins (**4**) ist damit zu erklären, dass das eigentlich gewünschte lagerstabile Carbamidsäureaddukt (**4b**) in Methanol als Feststoff ausfällt und somit NMR-spektroskopisch nicht nachweisbar war. Auffallend war jedoch, dass selbst nach einer Reaktionsdauer von 85 Stunden immer noch ein sehr großer Anteil (86 %) Edukt vorhanden war. Dies war überraschend, da eine Hydrolyse zum Edukt in MeOD nur in wesentlich geringerem Umfang erwartet wurde. Die in der Literatur beschriebene Reaktionsdauer beträgt 16 Stunden bei einer Ausbeute von 69 %.^[297]

Es wurden 200 μ L DMSO-*d*₆ zur Reaktionslösung hinzugefügt, um einen Nachweis des in MeOD unlöslichen Produkts (**4b**) zu erbringen. Die Analyse sollte anhand von ¹³C-NMR-Spektren erfolgen, da sich die Verschiebung des anomeren Kohlenstoffs C-1 des Carbamidsäuresalzes (**4b**) deutlich von der C-1-Verschiebung des Edukts (**3**) bzw. des Amins (**4**) unterscheiden müsste. Neben den Signalen der anomeren Kohlenstoffe C-1' (101.5 ppm) bzw. C-1 des Amins (**4**) (84.2 ppm) konnte ein Signal bei etwa 90.4 ppm beobachtet werden. Da in der Literatur keine Charakterisierung der Verbindung (**4b**) mittels ¹³C-NMR vorlag, wurde zunächst davon ausgegangen, dass es sich hierbei um das C-1-Signal des Carbamidsäureaddukts (**4b**) handelte. Es wurde daher angenommen, dass die Reaktion das gewünschte lagerstabile Addukt (**4b**) lieferte und lediglich die Ausbeute optimiert werden müsste.

Die Reaktion wurde hierzu mit unterschiedlichen Reaktionszeiten durchgeführt (Kapitel 7.3.4, Variante 2). Anschließend wurden in D₂O zügig NMR-Spektren des entstandenen farblosen Feststoffes nach dem Anlegen eines Feinvakuums von zehn Minuten aufgenommen. In den ¹³C-NMR-Spektren fand sich entgegen der Erwartung kein Signal für das C-1 des Chitobiosylamins (**4**) bei 84.2 ppm. Auch in den entsprechenden ¹H-NMR-Spektren

konnte das anomere Proton H-1 des Amins (**4**) nicht durch ein Signal bei 4.17 ppm nachgewiesen werden. Obwohl die Synthesebedingungen nach der Vorschrift von Hackenberger *et al.* eingehalten wurden, wurde das Produkt (**4**) nicht erhalten.

Die oben beschriebene Reaktion wurde in abs. Methanol durchgeführt. Nach der Vorschrift von Likhoshesterov *et al.* wurden der Reaktionslösung für die Aminierung 1.6 % Wasser zugesetzt.^[304] Daher wurde die Reaktion analog dieser Vorschrift unter Zusatz von Wasser mit einer Reaktionsdauer von 48 Stunden durchgeführt. Nach der Filtration sollte das Carbamidsäuresalz (**4b**) in Form eines farblosen Feststoffes vorliegen. Mittels massenspektrometrischer Untersuchung des Feststoffs mittels MALDI-TOF konnte jedoch weder das Produkt (**4b**) noch das Amin (**4**) nachgewiesen werden.

Im ¹³C-NMR-Spektrum trat erneut das Signal bei 90.4 ppm auf, von dem vermutet wurde, dass es sich um das C-1-Signal des Addukts (**4b**) handelte. Ein Vergleich mit der chemischen Verschiebung des C-1-Signals des Amins (**4**), das bei 84.2 ppm liegt, ließ allerdings an dieser Vermutung zweifeln. Die Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Signalen von Aminen und ihren entsprechenden Ammoniumsalzen liegt bei etwa 1 ppm. Die hier beobachtete Verschiebung von fast 6 ppm scheint daher nicht für die Anwesenheit des Ammoniumsalzes (**4b**) zu sprechen.

Die Hydrolyse zur Chitobiose (**3**) wurde ebenfalls nicht für wahrscheinlich gehalten, da das C-1-Signal der Chitobiose (**3**) bei etwa 89.3 ppm liegt und auch die übrigen Signale des ¹³C-NMR-Spektrums nicht mit denen des Eduktes übereinstimmten.

Eine Übersicht über die Produkte und die möglichen Nebenprodukte der Umsetzung von Chitobiose (**3**) mit Ammoniumcarbammat zum Chitobiosylamin (**4**) zeigt Abbildung 20.

Als ein mögliches Nebenprodukt der Aminierungsreaktion konnte laut Literatur die Bildung eines Carbamats (**B**) beobachtet werden.^[297] Die Differenz der chemischen Verschiebungen eines Carbamats und einem vergleichbaren Amin beträgt etwa 2 ppm. Daher wurde nicht von der Bildung eines Carbamats anstelle des Amins bzw. des Ammoniumsalzes (**4b**) ausgegangen.

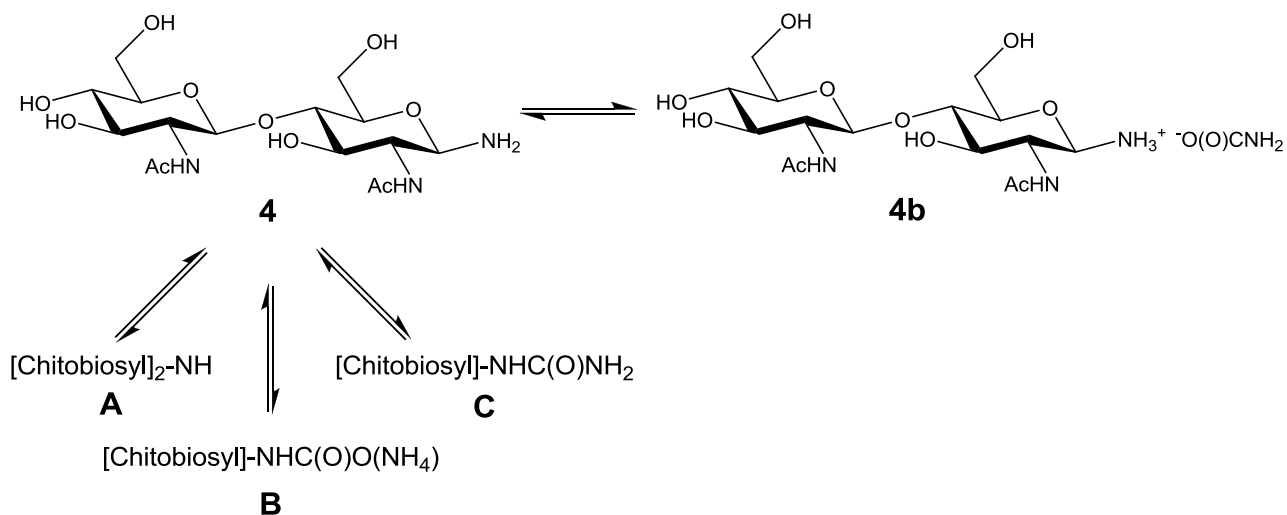


Abbildung 20: Mögliche Produkte der Umsetzung von Chitbiose (3) mit Ammoniumcarbammat zum Chitobiosylamin (4).

Bei der Umsetzung von Chitbiose (3) mit Ammoniumcarbammat kann es zur Bildung folgender Nebenprodukte kommen: ein diglycosyliertes Amin (A), ein Glycosylcarbammat (B) sowie ein Harnstoffderivat (C). Das gewünschte Produkt ist neben dem Chitobiosylamin (4) ein lagerstabiles Carbamidsäuresalz (4b).

Es wird ebenfalls die Bildung eines diglycosylierten Amins (A) vorgeschlagen. Die Differenz der chemischen Verschiebungen der anomeren Protonen zwischen einfach und zweifach alkylierten Aminen beträgt etwa 10 ppm. Aufgrund dieser Tatsache und des mit der Literatur sehr gut übereinstimmenden R_f -Wertes für das Chitobiosylamin (4) wurde nicht angenommen, dass es sich bei dem Produkt um das zweifach glycosylierte Amin (A) handelte.

Als weitere Nebenreaktion ist die Bildung eines Harnstoffderivates (C) denkbar. Allerdings ist auch hier im Vergleich zum Amin lediglich mit einer chemischen Verschiebung von etwa 3 ppm gegenüber dem entsprechenden Ammoniumsalz zu rechnen. Die Bildung eines Harnstoffderivates kommt daher vermutlich ebenfalls nicht in Betracht.

Es kann keine klare Aussage getroffen werden, welches Produkt bei der oben beschriebenen Reaktion entstanden war. Eine Optimierung der Darstellung des Chitobiosylamins (4) nach Hackenberger *et al.* bzw. Likosherstov *et al.* wurde nicht erreicht. Ein Nachweis des lagerstabilen Carbamidsäureaddukts (4b) konnte nicht erbracht werden. Es ist daher anzuzweifeln, ob der vorgeschlagene Syntheseweg für die Umsetzung von Chitbiose (3) zum entsprechenden Amin (4) geeignet ist. Aus diesem Grund wurde für die Darstellung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chitobiosylasparagin-Bausteins (5) ausschließlich das Amin (4) verwendet, das durch die Umsetzung mit NH_4HCO_3 erhalten wurde (Kapitel 4.1).

4.2 Synthese der Peptide und Glycopeptide

4.2.1 Übersicht der synthetisierten V3-Peptide und -Glycopeptide

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die V3-Peptide und Glycopeptide, die für die Charakterisierung der Interaktion zwischen dem HIV-1 GP120 und dem humanen Chemokinrezeptor CCR5 mittels SPR- und STD-NMR-Experimenten dargestellt wurden.

Die Konsensussequenz basiert auf einer Genbankanalyse von V3-Sequenzen des HIV-1 Subtyps B von J. Dojahn.^[129] In offenkettigen Sequenzen wurden Cysteine jeweils mit Serin mutiert, um Redoxreaktionen der Thiolgruppen zu vermeiden. Die *N*-Glycosylierung des komplexen Typs am Asparagin 301 wurde auf das Minimalmotiv Chitobiose (β -D-GlcNAc- β 1,4-D-GlcNAc) reduziert.

Tabelle 3: Sequenzen der dargestellten Peptide und Glycopeptide.

Peptid	Sequenz
v3con	STRPNNNTRKSIHI
v3cong	STRPNN <u>N</u> NTRKSIHI
v3ct15	YATGDIIGDIRQAHS
v3ct21	GPGRAFYATGDIIGDIRQAHS
v3o	STRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHS
v3og	STRPNN <u>N</u> NTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHS
v3c	cyclo(CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC)
v3cg	cyclo(CTRPNN <u>N</u> NTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC)
v3c37	cyclo(CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC) -NI

mit N: Asn-(β -D-GlcNAc- β 1,4-D-GlcNAc)

Das Peptid **v3con** und das entsprechende Glycopeptid **v3cong** stammen aus dem N-terminalen Bereich des V3-Loops. Die Peptide **v3ct15** und **v3ct21** entstammen dem C-terminalen Bereich. Die Zahlen in den Bezeichnungen geben die Sequenzlänge wieder. Peptide, die die gesamte Sequenz des V3-Loops von 35 Aminosäuren umfassen, wurden offenkettig (**v3o**) oder cyclisiert (**v3c**) dargestellt. Die entsprechenden Glycopeptide werden mit **v3og** und **v3cg** bezeichnet. Die Sequenz des cyclischen Peptids **v3c37** wurde C-terminal um zwei Aminosäuren verlängert und besitzt eine Länge von 37 Aminosäuren.

4.2.2 Synthese der offenkettigen Peptide und Glycopeptide

Die Festphasensynthese der Peptide erfolgte automatisiert nach der Fmoc-Strategie mit einem mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizer. Der Einbau des Chitobiosylbausteins (**6**) in die Glycopeptide erfolgte ebenfalls automatisiert. Als polymere Träger wurden Fmoc-Rink-Amid-Harze mit unterschiedlich hohen Belegungen gewählt. Die Polystyrolharze waren mit einem Linker funktionalisiert, der die Abspaltung der Peptide unter sauren Bedingungen C-terminal als Carbonsäureamid ermöglichte. Der N-Terminus lag als Amin vor.

Die verwendeten Fmoc-Aminosäuren wurden seitenkettengeschützt eingesetzt. Die Seitenkettenschutzgruppen wurden so gewählt, dass sie entweder gleichzeitig mit der Peptidabspaltung vom Harz entschützt wurden oder selektiv für eine Cyclisierung am Harz abgespalten werden konnten.

Die Durchführung der Synthesen erfolgten gemäß AAV1. Der verwendete Peptidsynthesizer unterstützt keine Verfolgung der Kupplungsausbeuten der einzelnen Schritte mittels Methylenfluoren-*monitoring*. Daher wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe jeweils nachträglich manuell nach AAV2 abgespalten, um eine Abschätzung der Kupplungsausbeute über die gesamte Synthese vornehmen zu können. Dadurch ist es jedoch nicht möglich, schwierig zu kuppelnde Sequenzabschnitte zuzuordnen und die Synthesebedingungen entsprechend anzupassen. Erfahrungen aus früheren Arbeiten zeigten jedoch, dass es im Bereich des ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Motivs, welches ein *turn*-Motiv bildet, zu Schwierigkeiten bei der Kupplung kommen kann.^[293] Auch brach die Kupplungsausbeute nach der Bausteinkupplung in der Regel stark ein.^[130]

Bei der Verwendung eines mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers sollten Probleme durch eine Aggregation der wachsenden Peptidkette am Harz nicht auftreten. Die Ausrichtung des Peptidrückgrats entlang der Mikrowellen führt zu einer Deaggregation der wachsenden Kette und zu einer besseren Zugänglichkeit des N-Terminus. Das Fmoc-*monitoring* ergab Ausbeuten von durchschnittlich 95 % bis zu einer quantitativen Umsetzung je Kupplungsschritt. Eine Ausnahme bildete das Peptid **v3con** mit einer Kupplungsausbeute von 90 % je Kupplungsschritt. Die Bestimmung des Fmoc-Werts ist allerdings mit einem Fehler von etwa 20 % behaftet. Dieser wird durch die Instabilität des Methylenfluorens in Lösung und dessen Zersetzung durch Lichteinwirkung verursacht. Da im Rahmen des Methylenfluoren-*monitorings* kein Zusammenhang einer verringerten Kupplungsausbeute durch den Einbau des Glycosylbausteins beobachtet werden konnte, wurde auf eine Optimierung der Synthesebedingungen verzichtet.

Die Aminosäurekupplungen erfolgten alle jeweils doppelt bei 75 °C unter Verwendung einer 0.2 M Lösung der jeweiligen Aminosäuren in DMF. Die Kupplung von Asparagin wurde aufgrund der sterisch anspruchsvollen Pbf-Schutzgruppe über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Die Kupplungsdauer der übrigen Aminosäuren betrug fünf Minuten. Da die Aminosäuren Prolin und Histidin zur Racemisierung neigen, wurden diese bei einer Temperatur von 50 °C gekuppelt. Auch bei der Kupplung des Glycosylbausteins kann es zu einer unerwünschten Nebenreaktion kommen, weshalb dieser Schritt ebenfalls bei 50 °C durchgeführt wurde.^[130,292] Eine Aspartimidbildung des Saccharids, bei der intramolekular ein thermodynamisch stabiler Succinimidring gebildet wird, kann auch bei zu starker Aktivierung des Bausteins auftreten, weshalb auf den Einsatz des hochreaktiven Aktivators HATU verzichtet wurde.^[305] Aufgrund der aufwändigen Synthese des Chitobiosylbausteins (Kapitel 4.1) wurde dieser lediglich in 1.2-fachem Überschuss in Bezug auf die eingesetzten Harzäquivalente verwendet.

Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgte mit 0.5 M TBTU in Anwesenheit von 2 M DIPEA. Um die Bildung schwierig abzutrennender Deletionspeptide zu verhindern, wurden nach jedem Kupplungszyklus die nichtumgesetzten Aminofunktionen acetyliert.

Mit dem Einsatz eines mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers können sehr hohe Kupplungsausbeuten, selbst bei schwierig zu kuppelnden Peptidsequenzen, erreicht werden. Wird eine weitere Verbesserung der Kupplungsausbeuten gewünscht, kann dies durch den Einsatz des Lösungsmittels *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) anstelle von DMF erreicht werden, da NMP ebenfalls eine Deaggregation der wachsenden Peptidkette unterstützt.^[129,306]

Zusätzlich bietet der Einsatz von Mikrowellen bei der automatisierten SPPS eine erhebliche Zeitersparnis. Bei Synthesen ohne Mikrowellenunterstützung wurden Kupplungszeiten von bis zu 120 Minuten pro Schritt benötigt, um eine hohe Effizienz zu erreichen. Die Synthese eines Peptids mit einer Länge von 35 Aminosäuren dauerte bis zu einer Woche. Die mikrowellenunterstützte Synthese ermöglichte dies in maximal 36 Stunden. Alle im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Peptide (Tabelle 3, Kapitel 4.2.1) wurden auf diesem Weg synthetisiert.

Nach dem *Fmoc-monitoring* gemäß AAV2 wurden die Acetylschutzgruppen der saccharidischen Hydroxylfunktionen der Glycopeptide **v3cong**, **v3og**, und **v3cg** nach AAV3 an der festen Phase entfernt. Dazu wurde das Harz mit Hydrazinhydrat (20 % in abs. Methanol) versetzt und für sechs Stunden geschüttelt. Die spätere NMR-spektroskopische Analyse der Glycopeptide zeigte, dass dieser Zeitraum für eine vollständige Deacetylierung der

Hydroxylgruppen ausreichend war. Die Methode der Deacetylierung an der festen Phase bietet den Vorteil der einfachen Entfernung überschüssiger Reagenzien durch Waschen. Eine Entschützung der Glycopeptide in Lösung erfordert u. U. eine Reinigung per HPLC vor und nach der Deacetylierung.

Die Abspaltung der Peptide unter gleichzeitiger Entschützung der Aminosäureseitenkettenfunktionen wurde gemäß AAV4 (offenkettige Peptide) bzw. AAV5 (**v3c**, **v3cg**) durchgeführt. Auf die cyclischen Peptide wird im folgenden Abschnitt (4.2.3) näher eingegangen.

Zur Abtrennung hydrophober Verunreinigungen, wie z. B. der abgespaltenen Seitenkettenschutzgruppen, wurden die Peptide vor der HPLC-Reinigung einer Etherextraktion (AAV7) unterzogen. Die Anwesenheit der offenkettigen Peptide in den Rohprodukten konnte jeweils eindeutig per MALDI-TOF-MS (AAV9) nachgewiesen werden.

Eine anschließende Reinigung per *RP*-HPLC nach AAV8 führte zu den in Tabelle 4 aufgeführten Ausbeuten der offenkettigen Peptide.

Tabelle 4 : Ausbeuten und per HPLC ermittelte Reinheit der offenkettigen Peptide und Glycopeptide.

Peptid	Ausbeute		Reinheit	
v3con	23.3 mg	14.3 μ mol	14 %	71 %
v3cong	15.3 mg	7.5 μ mol	15 %	87 %
v3ct15	19.9 mg	12.3 μ mol	12 %	97 %
v3ct21	17.4 mg	7.9 μ mol	8 %	86 %
v3o	12.2 mg	3.2 μ mol	3 %	91 %
v3og	4.8 mg	1.1 μ mol	1 %	94 %

Die zunehmende Kettenlänge der Peptide führte erwartungsgemäß zu schlechteren Ausbeuten. Dies ist auf intramolekulare Wechselwirkungen der Peptidketten während der Synthese sowie hydrophobe Interaktionen mit dem Harz zurückzuführen. In vorangegangenen Arbeiten konnte durch photometrische Reaktionsverfolgung gezeigt werden, dass die größten Ausbeuteeinbrüche während der Kupplung des 310 GPGRAF 315 -Motivs auftreten, das eine *turn*-Struktur ausbildet. Dieses Phänomen war bei den hier durchgeführten Synthesen ebenfalls zu beobachten (**v3ct15**, **v3ct21**). Die Reinheit der Peptide, die im präparativen Maßstab getrennt wurden (**v3con**, **v3cong**), war geringer als die der übrigen Peptide, deren Trennung im semipräparativen Maßstab erfolgte. Eine Ausnahme bildete das Peptid **v3ct21**, dessen Sequenz das hydrophobe 310 GPGRAF 315 -Motiv beinhaltet und das generell problema-

tisch zu reinigen war. Eine bessere Reinheit des Peptids **v3con** hätte durch nochmalige Reinigung per HPLC mit einem geänderten Gradienten erreicht werden können. Da dieses Peptid jedoch lediglich der Untersuchung mittels CD-Spektroskopie diene, wurde auf diesen zusätzlichen Zeit- und Ressourcenaufwand verzichtet. Die Reinheit der übrigen Peptide war gut bis sehr gut.

In vorangegangenen Arbeiten wurde beschrieben, dass der automatisierte Einbau des Glycosylbausteins zu einem drastischen Einbruch der Ausbeute gegenüber dem manuellen Einbau führte.^[130,293] Dies konnte bei der Synthese mit dem hier verwendeten mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizer nicht beobachtet werden, so dass der Baustein ausschließlich automatisiert gekuppelt wurde.

Alle sechs offenkettigen Peptide konnten eindeutig NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Die 2D-NMR-spektroskopische Charakterisierung per TOCSY-NMR wurde in H₂O/D₂O bei einem pH-Wert von 3.0 durchgeführt, um die amidischen Protonen sichtbar zu machen. Exemplarisch ist in Abbildung 21 der NH-Bereich eines TOCSY-Spektrums des Glycopeptids **v3og** gezeigt.

Von jedem Peptid wurde ebenfalls eine Charakterisierung in D₂O bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt, da diese Bedingungen denen der STD-NMR-Experimente entsprachen und auf diesem Weg eine Zuordnung der Signale in den STD-NMR-Spektren erleichtert wurde.

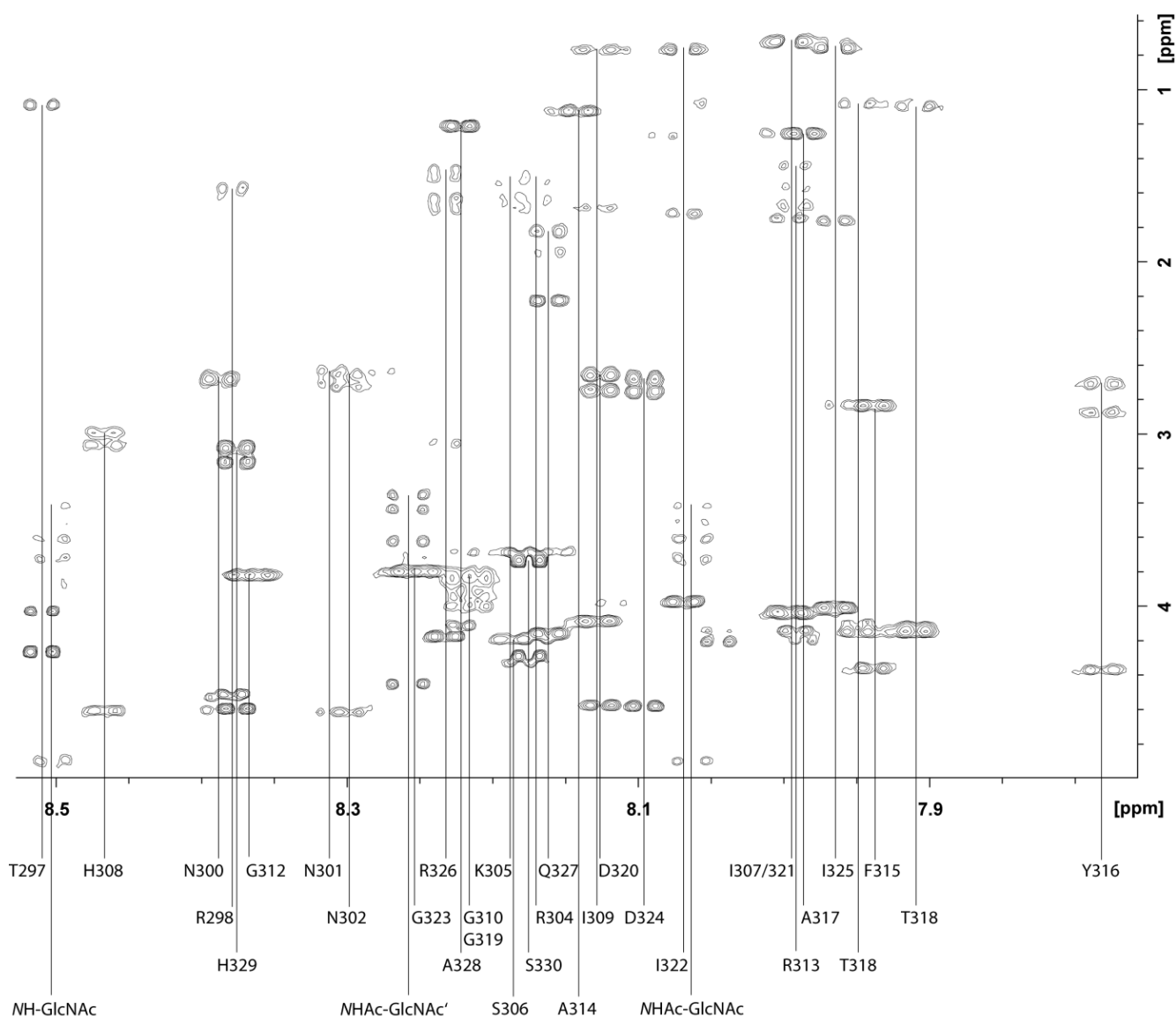


Abbildung 21: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des glycosylierten offenkettigen Peptids v30g.

Die Aufnahme des TOCSY-NMR-Spektrums erfolgte bei 285 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3.0. In der NH-Region des TOCSY-Spektrums konnten 32 NH-Spuren der amidischen Protonen der Peptidkette im Bereich von 8.511 bis 7.783 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Die H_α -Spuren der beiden in der Sequenz enthaltenen Proline liegen bei 4.233 und 4.196 ppm, die H_α -Spur der N-terminalen Serins liegt bei 4.024 ppm. Darüber hinaus sind in der NH-Region des TOCSY-Spektrums drei NH-Spuren zu finden, die zu den saccharidischen Protonen gehören. Für das *N*-glycosidisch direkt an das Peptid gebundene *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), das zwei amidische NH-Protonen besitzt, sind zwei ähnliche H-Spuren zu beobachten. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum.

Die N-terminalen Aminosäuren der jeweiligen Peptide sowie die in den Sequenzen vorliegenden Proline konnten über die H_α -Spuren im Bereich von etwa 4.3 – 4.0 ppm identifiziert werden. Die Sequenzierung der Peptide wurde durch die Analyse der sequenziellen NOE-Signale anhand eines NOESY-Spektrums durchgeführt (Kapitel 4.4).

4.2.3 Cyclisierung der Peptide und Glycopeptide

Die Cyclisierung der Peptide und Glycopeptide über eine Disulfidbrücke wurde auf chemischem Weg sowohl in Lösung durch Oxidation mit Luftsauerstoff (Kapitel 4.2.3.1) als auch am polymeren Träger (Kapitel 4.2.3.2) durchgeführt.^[222,223]

4.2.3.1 Cyclisierung in Lösung durch Oxidation mit Luftsauerstoff (v3c, v3cg)

Die Durchführung der Synthesen erfolgte analog zu den offenkettigen Peptiden gemäß AAV1. Danach wurde eine photometrische Bestimmung der Rohausbeute nach AAV2 sowie die Entschützung des Saccharidteils des Glycopeptids **v3cg** nach AAV3 am polymeren Träger durchgeführt. Die Rohausbeuten lagen hierbei etwas unter denen der analogen offenkettigen Peptide **v3o** (40 %) und **v3og** (42 %) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ausbeuten der Fmoc-Bestimmung und der Rohprodukte der Peptide v3c und v3cg.

	Fmoc-monitoring	Rohprodukt
v3c	20.2 μmol	57.8 mg (15.0 μmol)
	20 %	15 %
v3cg	14.1 μmol	57.5 mg (13.5 μmol)
	14 %	14 %

Im Anschluss wurden die Peptide unter sauerstofffreien Bedingungen mit einer entgasten Abspaltlösung (TFA/TIPS/H₂O) nach AAV5 unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Der Ausschluss von Sauerstoff war notwendig, um unerwünschte intermolekulare Reaktionen zu vermeiden.

Der Vorteil der Cyclisierung in Lösung besteht darin, dass die eingesetzten Chemikalien sehr preiswert sind und der Reaktionserfolg massenspektrometrisch verfolgt werden kann. Von Nachteil hingegen sind das Arbeiten unter strengem Sauerstoffausschluss in großen Lösungsmittelvolumina und der damit verbundene apparative Aufwand.

In einer entgasten 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung wurden die jeweiligen Rohprodukte stark verdünnt (50 mL/ μmol Harzäquivalent) und unter Einwirkung von Ultraschall homogenisiert.^[307] Durch Zufuhr von Luftsauerstoff mit einer Gasfritte unter starkem Rühren erfolgte die oxidative Cyclisierung. Dabei konnte teilweise nach einem Tag eine Polymerbildung in Form eines gummiartigen Randes am Kolben beobachtet werden.

Die Kontrolle des Syntheserfolgs erfolgte direkt aus der Cyclisierungslösung. Hierfür wurde eine Probe entnommen und per MALDI-TOF-MS analysiert (AAV9). Da der Nachweis auf diesem Weg nicht zufriedenstellend möglich war, wurden die Proben unter dem Einsatz von *ZipTip*_{C18}-Pipettenspitzen entsalzt und direkt auf den MALDI-Probenträger aufgebracht. Auf diesem Weg konnte zunächst die Anwesenheit des Glycopeptids **v3cg** nachgewiesen werden. Der Nachweis des analogen Peptids **v3c** konnte nicht erbracht werden.

Nach dem Entsalzen und Einengen mittels Ultrafiltration (AAV6) gelang weder der Nachweis der Verbindung **v3c** noch der erneute Nachweis der Verbindung **v3cg**. Es wurden sowohl das Filtrat als auch der Überstand nach der Ultrafiltration gefriergetrocknet und anschließend massenspektrometrisch überprüft, um auszuschließen, dass die Ausschlussgröße der Filtrationsmembran zu groß gewählt wurde. Es kann keine definitive Aussage getroffen werden, ob die Cyclisierungsreaktion erfolglos war, oder ob sich die gewünschten Produkte lediglich massenspektrometrisch nicht nachweisen ließen.

Das jeweilige Rohproduktgemisch der Peptide **v3c** und **v3cg** wurde über eine semipräparative *RP*-analoge Säule getrennt und die einzelnen Fraktionen per MALDI-TOF-MS analysiert. Ein Nachweis des Peptids **v3c** sowie ein erneuter Nachweis des Glycopeptids **v3cg** waren auf diesem Weg nicht möglich.

Daher erfolgte nach AAV10 die Analyse der Rohprodukte mittels ESI-MS. Dazu wurde zunächst eine säulenchromatografische Trennung des Rohgemischs durchgeführt und die einzelnen Fraktionen direkt im ESI-MS-Analysator vermessen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden im Positiv- und im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt. Auch auf diesem Weg gelang der Nachweis der Produkte nicht.

Da der Nachweis des Glycopeptids **v3cg** zu Beginn der Cyclisierungsreaktion gelang, ein erneuter Nachweis zu einem späteren Zeitpunkt jedoch nicht mehr erbracht werden konnte, kann vermutet werden, dass bereits gebildete Disulfidbrücken wieder gespalten wurden und eine anschließende Polymerisation begünstigt wurde. In der basischen NH_4HCO_3 -Lösung kann es zu einer Deprotonierung der schwach sauren Thiolgruppen kommen, die wiederum die disulfidverbrückten Peptide nucleophil angreifen und die Cystinbindung spalten können. Abhilfe könnte hier das Arbeiten in einer schwach basischen bis neutralen Lösung mit dem anschließenden Abbruch der Reaktion durch Ansäuern auf einen schwach sauren pH-Wert (~ 6.8) schaffen. Ebenfalls sinnvoll könnte der Einsatz von Iodacetamid sein, um nichtumgesetzte SH-Gruppen zu cappen.

Fraglich bleibt allerdings, weshalb der Nachweis der nichtcyclisierten Peptide misslang. Eventuell gehen offenkettige Moleküle sofort und irreversibel die beobachtete Polymerisationsreaktion ein und werden somit nach und nach aus der Lösung entfernt. Auch kann eine schlechte Ionisierbarkeit der eventuell nicht vollständig salzfreien Proben zur ungenügenden Detektierbarkeit mittels massenspektrometrischer Methoden führen.

4.2.3.2 *Cyclisierung an der festen Phase (v3c37)*

Die Cyclisierung der V3-Peptide in Lösung (Kapitel 4.2.3.1) brachte auch nach mehrfacher Durchführung nicht den gewünschten Erfolg. Es kam dabei immer wieder zu unerwünschten Polymerisationsreaktionen.

Daher wurde eine Variante getestet, bei der das Peptid während der Cyclisierungsreaktion am polymeren Träger gebunden blieb.^[226] Hierfür wurde ein Harz mit einer niedrigen Belegung eingesetzt (0.17 mmol/g) und Ansatzgrößen von 25 µmol gewählt. Dadurch sollte zum einen die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken verhindert, zum anderen eine Aggregation der Peptidketten am Harz vermieden werden, die die Tendenz zur Cyclisierung verschlechtert. Um die Wechselwirkungen mit dem polymeren Träger zu reduzieren, wurde das Peptid C-terminal um zwei Aminosäuren der GP120-Sequenz verlängert.

Das Peptid **v3c37** wurde unter Standardbedingungen am Harz synthetisiert (AAV1). Die beiden Cysteine, die im Anschluss disulfidverbrückt werden sollten, wurden mit unterschiedlichen Schutzgruppen der Thiole eingesetzt. Ein Cystein trug eine 4-Methoxytrityl (Mmt)-Schutzgruppe, das andere eine *S-tert*-Butyl-Schutzgruppe. Beide Schutzgruppen konnten somit jeweils selektiv abgespalten werden (Abbildung 22).

Der apparative Aufwand ist deutlich geringer und es entfällt die Notwendigkeit, unter sorgfältigem Sauerstoffausschluss arbeiten zu müssen. Zudem kann der Fortschritt der Cyclisierungsreaktion photometrisch verfolgt werden. Einen Nachteil stellt der kostenintensive Einsatz von z. T. giftigen Chemikalien, wie z. B. 2-Mercaptoethanol, dar.

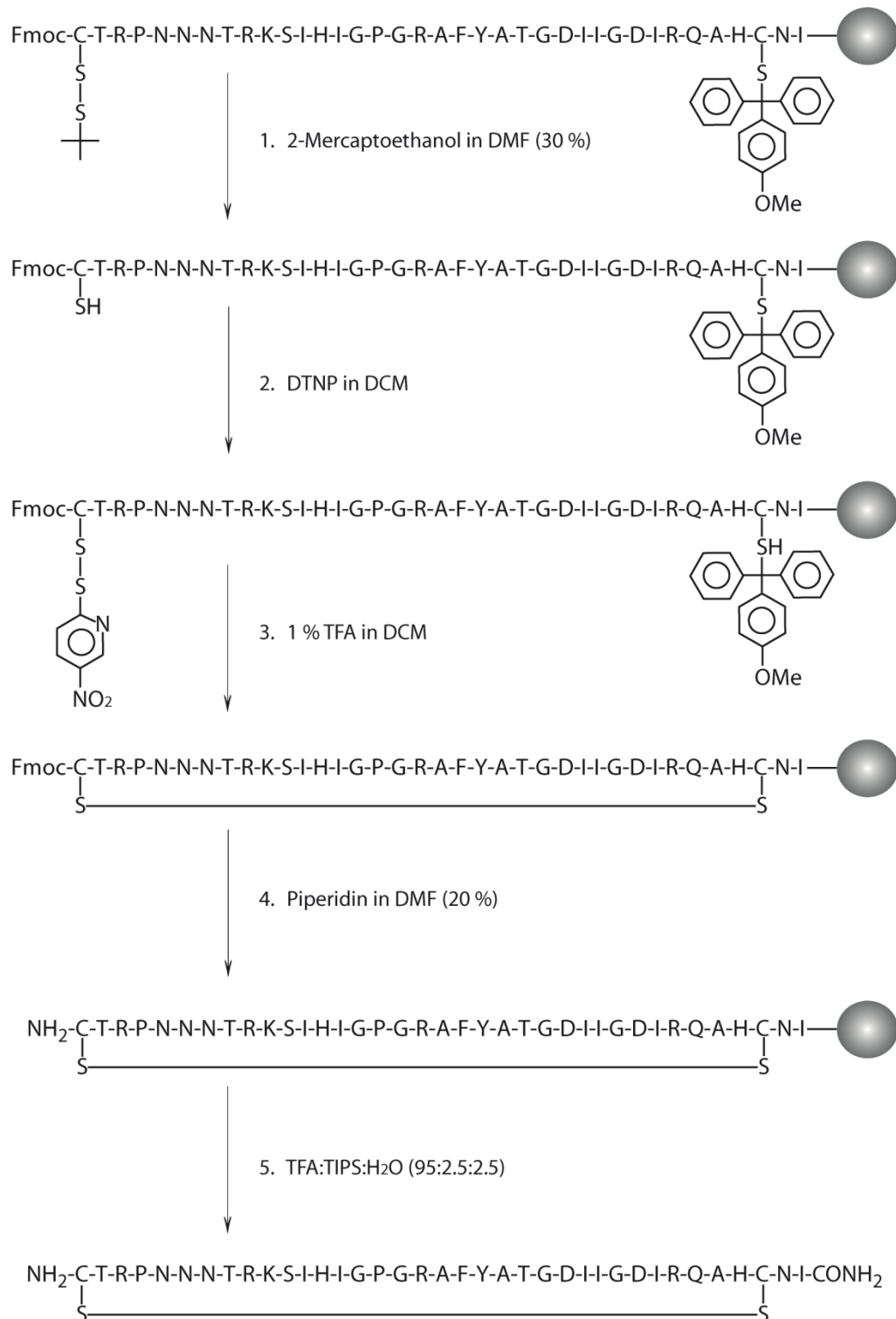


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Knüpfung einer Disulfidbrücke eines Peptids am polymeren Träger.

Das *S-tert*-Butyl-geschützte Cystein wird mit 2-Mercaptoethanol (30 % in DMF) entschützt (1) und anschließend mit 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) (DTNP) aktiviert (2). Die 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe wird mit TFA (1 % in DCM) entschützt und greift nucleophil den aktivierten Schwefel unter Bildung einer Disulfidbrücke an (3). Im Anschluss folgen die N-terminale Fmoc-Entschützung (4) sowie die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Entschützung der übrigen Seitenkettenschutzgruppen unter Standardbedingungen (5).

Bei der ersten Durchführung der Synthese wurde das Harz zur Entschützung des *S-tert*-Butyl-geschützten Cysteins in einer Glasfritte für drei Stunden mit 2-Mercaptoethanol (30 % in DMF) bedeckt und geschüttelt. Nach einem Waschschrift mit DCM wurde 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) (DTNP) in Dichlormethan für 80 Minuten auf das Harz gegeben. Dadurch wird die Elektrophilie des Schwefels dieses Cysteins erhöht. Die 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe wurde unter schwach sauren Bedingungen (1 % TFA in DCM) entfernt. Die freie Thiolgruppe konnte im nächsten Schritt nucleophil den aktivierten Schwefel des zweiten Cysteins unter Bildung einer Disulfidbrücke angreifen. Die Abspaltung des Nitropyridinderivates ermöglichte eine photometrische Reaktionsverfolgung bei einer Wellenlänge von 386 nm. Die Cyclisierungsreaktion wurde solange durchgeführt, bis der gemessene Wert der Absorption konstant blieb. In diesem Fall erfolgte die Cyclisierungsreaktion über einen Zeitraum von 95 Minuten.

Im Anschluss folgten die N-terminale Fmoc-Entschützung (AAV2) zur Abschätzung der Kupplungsausbeute sowie die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Entschützung der übrigen Seitenkettenschutzgruppen (AAV4) unter Standardbedingungen.

Nach einer Reinigung mittels Etherfällung (AAV7) wurde eine Rohausbeute von 12 % (12.1 mg, 3.0 μ mol) erhalten.

Die Anwesenheit des Produkts mittels massenspektrometrischem Nachweis (AAV9) konnte an diesem Punkt nicht bestätigt werden. In manchen Fällen kann eine chromatografische Trennung der Rohprodukte mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der erhaltenen Fraktionen (AAV10) zum Erfolg führen. Dies war hier nicht der Fall.

Da die Cyclisierungsreaktion auf manuellem Weg keinen Erfolg brachte, wurde diese mikrowellenunterstützt durchgeführt.^[308] Dazu wurde der für die Peptidsynthese verwendete Synthesizer eingesetzt und die entsprechenden Syntheseschritte für die Disulfidbrückenbildung programmiert. Alle Schritte der Cyclisierung wurden mit einer Leistung von 25 W bei 60 °C durchgeführt. Die Entschützung der *S-tert*-Butyl-Schutzgruppe erfolgte über einen Zeitraum von 20 Minuten. Die Aktivierung der freien Thiolgruppe mit DTNP sowie die anschließende Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe wurden über einen Zeitraum von jeweils sieben Minuten durchgeführt. Die Bildung der Disulfidbrücke erfolgte über einen Zeitraum von sechsmal fünf Minuten.

Die mikrowellenunterstützte Variante dieser Reaktion bietet mehrere Vorteile. Zum einen sank der Zeitaufwand gegenüber der manuellen Durchführung von ungefähr sechs Stunden auf weniger als eineinhalb Stunden. Zum anderen war die Durchführung der Cyclisierung auf

diesem Weg vollautomatisiert möglich. Ein Nachteil besteht darin, dass der Reaktionsfortschritt in diesem Fall nicht photometrisch verfolgt werden konnte.

Die N-terminale Fmoc-Entschützung (AAV2) zur Abschätzung der Kupplungsausbeute sowie die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Entschützung der übrigen Seitenkettenschutzgruppen (AAV4) erfolgten manuell unter Standardbedingungen.

Nach einer Reinigung mittels Etherfällung (AAV7) wurde das Peptid **v3c37** mit einer Rohausbeute von 24 % (24.5 mg, 6.0 μmol) erhalten. Diese war damit doppelt so hoch wie die Rohausbeute, die mit der manuellen Cyclisierung erzielt wurde.

Die Anwesenheit des Produkts mittels massenspektrometrischem Nachweis (AAV9) konnte nicht bestätigt werden. Auch eine chromatografische Trennung der Rohprodukte mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der erhaltenen Fraktionen (AAV10) führte nicht zum gewünschten Erfolg. Es konnten lediglich Abbruchpeptide nachgewiesen werden.

Da die Bestimmung des Methylenfluorens Rohausbeuten zwischen 12 und 24 % ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass die Synthese der kompletten Peptidsequenz zumindest zum Teil erfolgreich war und beide Cysteine für die Disulfidbrückenbildung vorlagen. Photometrisch konnte das Spaltprodukt des Nitropyridinderivates bei 386 nm nachgewiesen werden, was die Annahme unterstützt, dass das N-terminale Cystein gekuppelt worden war.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, weshalb die Knüpfung einer Disulfidbrücke am polymeren Träger nach Galande *et al.* bzw. Galanis *et al.* nicht erfolgreich verlief.^[226,308]

4.3 CD-spektroskopische Analyse der V3-Peptide

Um eine Aussage über die Sekundärstruktur der einzelnen Peptide machen zu können, wurden diese einer Analyse mittels CD-Spektroskopie unterzogen. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 0.33 μM in Wasser für die CD-Messungen eingesetzt. Es wurde je Messung jeweils ein Scan über einen Wellenlängenbereich von 190 nm bis 270 nm durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden im Programm *Origin 8.5* mit einem Polynom-Fit nach *Savitzky-Golay* geglättet und anschließend mit dem Programm *CDtool* ausgewertet. Dabei wurden die geglätteten CD-Spektren mit den Spektren einer in *CDtool* implementierten Referenzdatenbank verglichen, um die Anteile unterschiedlicher Sekundärstrukturelemente zu errechnen. Abbildung 23 zeigt die CD-Spektren der sechs untersuchten V3-Peptide.

Die Spektren der untersuchten Substanzen weisen eine sehr große Ähnlichkeit auf und zeigen alle ein Minimum bei ungefähr 205 nm. Lediglich das Spektrum des Peptids **v3ct15** ist durch ein stärker ausgeprägtes Minimum bei etwa 200 nm charakterisiert.

Die Verschiebung des Minimums des Peptids **v3ct15** zu niedrigeren Wellenlängen kann durch eine höhere Flexibilität der aromatischen Seitenkette des N-terminalen Tyrosins 316 erklärt werden. Diese scheint bei dem Peptid **v3ct21**, welches N-terminal um das $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ -Motiv verlängert ist, deutlich eingeschränkter zu sein. Ausgeprägtere Minima in CD-Spektren geben einen Hinweis auf eine stärker geordnete Struktur. Konformative Untersuchungen der Peptide mittels NOESY-NMR (Kapitel 4.4) zeigten, dass beide V3-Peptide aus dem C-terminalen Bereich (**v3ct15** und **v3ct21**) in einer α -helicalen Konformation vorliegen. Diese scheint bei dem Peptid **v3ct21** schwächer ausgeprägt zu sein. Ein Zusammenhang mit dem Vorhandensein des $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ -Motivs und einer Verringerung der strukturellen Ordnung kann jedoch nicht hergestellt werden, da die beobachteten *long range*-NOE-Kontakte keinen Einfluss auf die Ausbildung der α -helicalen Konformation des Peptids **v3ct21** zeigten.

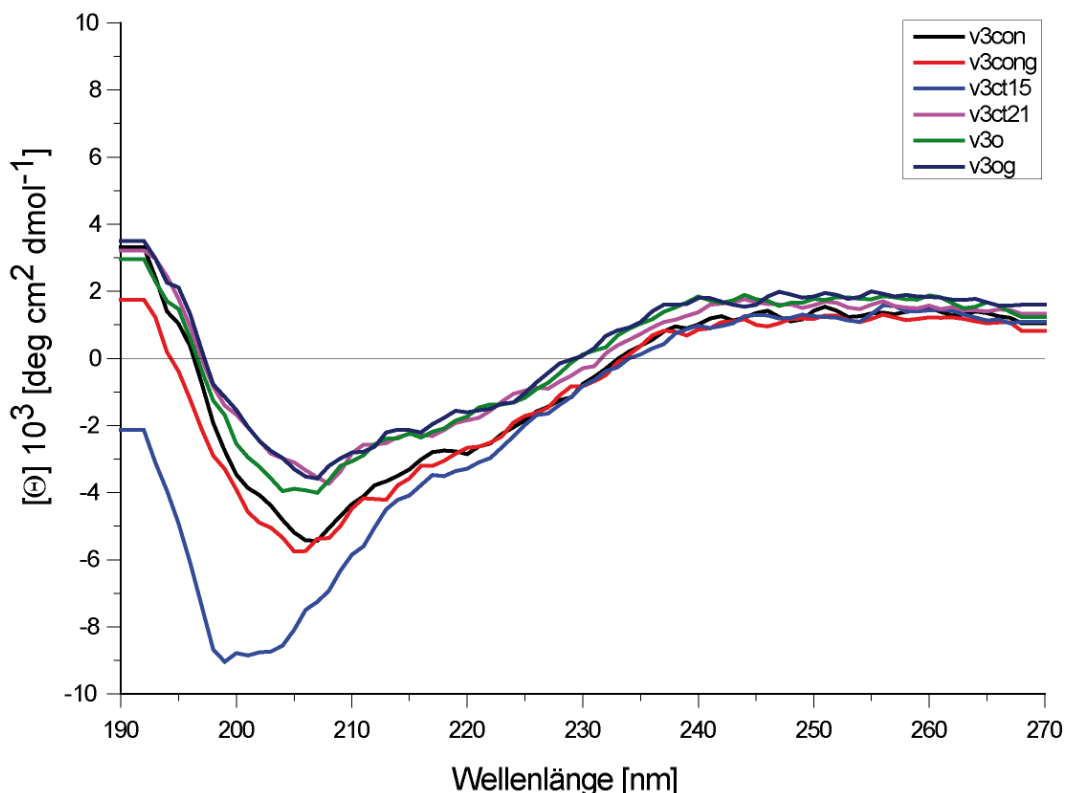


Abbildung 23: CD-Spektren der untersuchten Peptide und Glycopeptide.

Die Spektren der Peptide zeigen ein Minimum bei 205 nm. Generell gibt es fast keine signifikanten Unterschiede der Spektrenform und -intensität. Das Minimum des Peptids **v3ct15** ist etwas ausgeprägter und zu kürzeren Wellenlängen verschoben.

In Tabelle 6 sind die ermittelten Anteile an Sekundärstrukturelementen der untersuchten Peptide und Glycopeptide aufgeführt.

Tabelle 6: Mit dem Programm *CDtool* ermittelte Anteile von Sekundärstrukturelementen der untersuchten Peptide und Glycopeptide.

Substanz	α -Helix	β -Faltblatt	β -turn	ungeordnete Struktur (<i>random</i>)
v3con	27 %	19 %	21 %	32 %
v3cong	27 %	27 %	23 %	24 %
v3ct15	23 %	18 %	16 %	46 %
v3ct21	27 %	20 %	21 %	33 %
v3o	21 %	24 %	21 %	33 %
v3og	26 %	22 %	23 %	34 %

Die prozentualen Anteile, die auf die Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Faltblatt und β -turn entfallen, liegen bei allen Peptiden in ungefähr der gleichen Größenordnung. Auffallend ist der geringe Anteil an ungeordneter Struktur von 24 % des Glycopeptids **v3cong**. Die Glycosylierung an Asn301 übt in diesem Fall anscheinend einen gewissen Einfluss auf die Flexibilität der Struktur aus und begünstigt eine geordnetere Konformation des Glycopeptids. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten, die zeigen, dass glycosylierte Peptide gegenüber den analogen unglycosylierten Peptiden eine definiertere, stabilisierte Struktur aufweisen.^[293]

Bislang gibt es nur wenige literaturbekannte Untersuchungen zum Einfluss von Saccharidstrukturen auf die CD-Spektren von Glycopeptiden. Watanabe *et al.* zeigten, dass die CD-Banden von Kohlenhydraten und Peptiden additiv das CD-Spektrum eines *N*-Typ-Glycopeptids bilden.^[309] Mit dieser Annahme wurden Experimente von Schuster *et al.* eines mit GlcNAc-Einheiten hexaglycosylierten Decapeptids durchgeführt.^[310] Diese Studie deutet wiederum darauf hin, dass die Veränderung im Glycopeptid-CD-Spektrum im Vergleich zum Peptid-CD-Spektrum nicht allein durch das Vorhandensein der Kohlenhydrate begründet werden kann. Es liegt die Vermutung nahe, dass die charakteristischen Banden des Glycopeptid-CD-Spektrums durch Konformationsänderung des Peptidrückgrats, bedingt durch die Saccharide, hervorgerufen werden.

Das Peptid **v3ct15** weist von allen untersuchten Verbindungen den größten Anteil an ungeordneter Struktur auf (46 %). Der Vergleich dieses Wertes mit dem des Peptids **v3ct21**

(33 %) scheint darauf hin zu deuten, dass das $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ -Motiv einen begünstigenden Einfluss auf die Ordnung innerhalb der Sekundärstruktur hat.

Bei den Peptiden, die die gesamte Sequenz des V3-Loops umfassen (**v3o**, **v3og**), konnte keine Auswirkung der Glycosylierung auf die Sekundärstruktur beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit des C-terminalen Bereichs vermutlich den stabilisierenden Einfluss der Glycosylstruktur kompensieren kann.

4.4 Konformative Untersuchungen der Peptide und Glycopeptide mittels NMR

Die Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie (Kapitel 4.3) gaben einen ersten Hinweis auf die Konformation der Peptide und Glycopeptide. Um genauere Aussagen über die Sekundärstruktur machen zu können, wurden NOESY-NMR-Spektren akquiriert und analysiert. Die Kreuzsignale dieser Spektren werden durch den Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen verursacht, die sich in räumlicher Nähe in einem Abstand von 2 - 5 Å zueinander befinden.^[311,312] Diese Signale können dabei sowohl von Kernen hervorgerufen werden, die über skalare Kopplung miteinander in Verbindung stehen, als auch von solchen Kernen, die ihr Relaxationsverhalten gegenseitig durch den Raum beeinflussen.^[313] Die Intensität der Signale im NOESY-NMR-Spektrum korreliert dabei über $1/r^6$ mit dem Abstand r der beiden koppelnden Spins.

Die aufgenommenen Spektren dienen zum einen der sequenziellen Zuordnung bei der Charakterisierung der Liganden. Zum anderen konnten durch die beobachteten Kontakte Rückschlüsse auf die räumliche Struktur gezogen werden.

Sowohl das offenkettige N-terminale V3-Peptid **v3con** als auch das entsprechende Glycopeptid **v3cong** zeigten jeweils ausschließlich $\text{NH}_i\text{-NH}_{i\pm 1}$ -NOE-Kontakte. Die korrekte Sequenz der beiden Peptide konnte dadurch eindeutig bestätigt werden. Da jeweils keine *long range*-Kontakte beobachtet werden konnten, deutet dies auf eine hohe Flexibilität und eine wenig geordnete Struktur dieser beiden Peptide hin.

Neben den sequenziellen NOE-Kontakten ergab die Analyse des Peptids **v3ct15** zusätzlich das Vorliegen von vier *long range*-Kontakten (Tabelle 7). Diese werden durch $\text{NH}_i\text{-H}_{i\pm 3}$ - sowie $\text{NH}_i\text{-NH}_{i\pm 4}$ -NOE-Kontakte hervorgerufen. Dieses Muster ist typisch für Verbindungen, die eine α -Helix als Sekundärstruktur ausbilden.

Tabelle 7: Sequenzielle sowie strukturelevante NOE-Kontakte des Peptids *v3ct15*.

Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte	Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte
Tyr316	-		Asp324	Gly323	
Ala317	Tyr316		Ile325	Asp324	
Thr318	Ala317		Arg326	Ile325	Ile322
Gly319	Thr318		Gln327	Arg326	
Asp320	Gly319		Ala328	Gln327	Ile325
Ile321	Asp320	Ile325	His329	Ala328	
Ile322	Ile321		Ser330	His329	Arg326
Gly323	Ile322				

Abbildung 24 zeigt eine grafische Darstellung der beobachteten *long range*-Kontakte des Peptids **v3ct15**. Die NOE-Kontakte befinden sich im C-terminalen Bereich des Peptids.



Abbildung 24: Grafische Darstellung der strukturelevanten *long range*-NOE-Kontakte des Peptids **v3ct15**.

Das NOESY-NMR-Spektrum des Peptids **v3ct21**, welches gegenüber dem Peptid **v3ct15** N-terminal um das ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-turn-Motiv verlängert ist, zeigte neben den sequenziellen Kontakten ebenfalls Signale für das Vorliegen von vier *long range*-Kontakten (Tabelle 8).

Tabelle 8: Sequenzielle sowie strukturelevante NOE-Kontakte des Peptids *v3ct21*.

Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte	Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte
Gly310	-		Ile321	Asp320	
Pro311	Gly310		Ile322	Ile321	Gly319
Gly312	Pro311		Gly323	Ile322	
Arg313	Gly312		Asp324	Gly323	
Ala314	Arg313		Ile325	Asp324	Ala328, Ile322
Phe315	Ala314		Arg326	Ile325	
Tyr316	Phe315		Gln327	Arg326	
Ala317	Tyr316	Asp320	Ala328	Gln327	
Thr318	Ala317		His329	Ala328	
Gly319	Thr318		Ser330	His329	
Asp320	Gly319				

Diese werden, wie im Falle des Peptids **v3ct15**, ebenfalls durch $\text{NH}_i\text{-NH}_{i\pm 3}$ - sowie $\text{NH}_i\text{-NH}_{i\pm 4}$ -NOE-Kontakte hervorgerufen, die für das Vorliegen einer α -helicalen Konformation des Peptids sprechen (Abbildung 25). Das $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ -Motiv hat anscheinend keinen Einfluss auf das Ausbilden einer α -Helix-Struktur, bildet aber durch das vorliegende Prolin selbst keinen Teil der Helix.



Abbildung 25: Grafische Darstellung der strukturelevanten *long range*-NOE-Kontakte des Peptids **v3ct21**.

Die Kreuzsignale im NOESY-NMR-Spektrum des Peptids **v3o**, welches die gesamte Sequenz des V3-Loops beinhaltet, werden von sequenziellen Kontakten sowie von fünf *long range*-Kontakten (Tabelle 9) hervorgerufen.

Tabelle 9: Sequenzielle sowie strukturelevante NOE-Kontakte des Peptids **v3o**.

Aminosäure	$\text{NH}_i\text{-NH}_{i\pm 1}$ -Kontakt	weitere Kontakte	Aminosäure	$\text{NH}_i\text{-NH}_{i\pm 1}$ -Kontakt	weitere Kontakte
Ser296	-		Ala314	Arg313	
Thr297	Ser296		Phe315	Ala314, Tyr316	Asp320
Arg298	Thr297	Ala328	Tyr316	Phe315	
Pro299	Arg298		Ala317	Tyr316	Pro311
Asn300	Pro299		Thr318	Ala317	
Asn301	Asn300		Gly319	Thr318	
Asn302	Asn301		Asp320	Gly319	
Thr303	Asn302		Ile321	Asp320	
Arg304	Thr303		Ile322	Ile321	
Lys305	Arg304		Gly323	Ile322	
Ser306	Lys305		Asp324	Gly323	
Ile307	Ser306		Ile325	Asp324	
His308	Ile307, Ile309		Arg326	Ile325	
Ile309	His308	Gly312	Gln327	Arg326	
Gly310	Ile309		Ala328	Gln327	
Pro311	Gly310		His329	Ala328, Ser330	Thr297
Gly312	Pro311		Ser330	His329	

Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte	Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte
Arg313	Gly312				

Drei dieser Kontakte liegen im Bereich des ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-*turn*-Motivs (Abbildung 26). Die Struktur des Peptids wird entscheidend durch das Vorhandensein des Prolins an Position 311 geprägt, welches eine räumliche Annäherung der beiden Flanken zur Folge hat. Dies wird durch die beiden Kontakte zwischen den beiden Aminosäuren Thr297 und Arg298 aus dem N-terminalen Bereich mit den Aminosäuren Ala328 und His329 aus dem C-terminalen Bereich bestätigt. Zudem konnten keine *long range*-NOE-Kontakte, die auf eine α -helicale Konformation des C-terminalen Bereichs des V3-Loops hindeuten, beobachtet werden. Die Ausbildung einer α -Helix wird anscheinend durch die räumliche Annäherung der Aminosäuren aus den beiden *stem*-Bereichen (Positionen 297 bis 305 und Positionen 321 bis 329) des Loops gehindert.

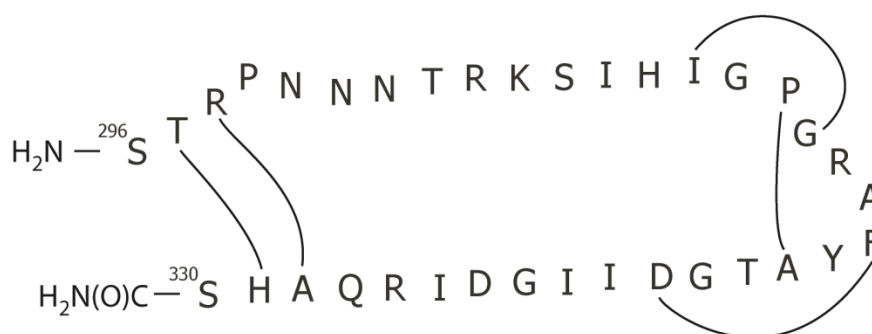


Abbildung 26: Grafische Darstellung der strukturelevanten *long range*-NOE-Kontakte des Peptids *v3o*.

Die Sequenz des Peptids *v3og*, welches an Asn301 eine Chitobiosyleinheit trägt, konnte durch das NOESY-NMR-Spektrum eindeutig bestätigt werden. Auch die NH-Acetylgruppen der Chitobiose lassen sich auf diesem Weg eindeutig den Saccharideinheiten zuordnen. Weiterhin lagen im Spektrum Kreuzsignale vor, die auf das Vorhandensein von fünf *long range*-Kontakten (Tabelle 10) zurückzuführen sind.

Tabelle 10: Sequenzielle sowie strukturelevante NOE-Kontakte des Glycopeptids *v3og*.

Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte	Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte
Ser296	-		Phe315	Ala314	
Thr297	Ser296	Ala328	Tyr316	Phe315	
Arg298	Thr297		Ala317	Tyr316	Pro311
Pro299	Arg298		Thr318	Ala317	

Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte	Aminosäure	NH _i -NH _{i±1} - Kontakt	weitere Kontakte
Asn300	Pro299		Gly319	Thr318	
Asn301	Asn300		Asp320	Gly319	
Asn302	Asn301		Ile321	Asp320	
Thr303	Asn302		Ile322	Ile321	
Arg304	Thr303		Gly323	Ile322	
Lys305	Arg304		Asp324	Gly323	
Ser306	Lys305		Ile325	Asp324	
Ile307	Ser306		Arg326	Ile325	
His308	Ile307, Ile309		Gln327	Arg326	
Ile309	His308		Ala328	Gln327, His329	
Gly310	Ile309, Pro311		His329	Ala328	
Pro311	Gly310		Ser330	His329	
Gly312	Pro311		GlcNAc	Asn300	Asn301, Asn302, Ile322
Arg313	Gly312		GlcNAc'		
Ala314	Arg313				

Auch in diesem Fall bedingt das Prolin 311 eine räumliche Nähe der Peptidflanken zueinander. Dies wird durch den Kontakt zwischen Pro311 und Ala317 deutlich (Abbildung 27). Der Kontakt zwischen Thr297 und Ala328 scheint analog zur entsprechenden unglycosylierten Verbindung **v3o** auf eine gehinderte Ausbildung einer α -helicalen Konformation des C-terminalen Bereichs durch die räumliche Annäherung der Aminosäuren aus den *stem*-Bereichen des Loops hinzudeuten. Die übrige Sequenz des Peptids **v3og** liegt in einer eher zufälligen Konformation vor.

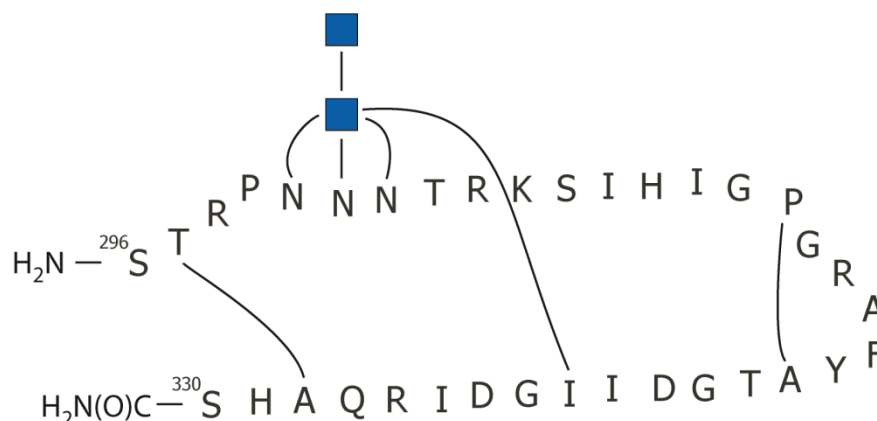


Abbildung 27: Grafische Darstellung der strukturelevanten *long range*-NOE-Kontakte des Glycopeptids *v3og*.

Die Glycosylstruktur zeigte ebenfalls einen NOE-Kontakt zur gegenüberliegenden Seite des Peptids (Ile322). Dies bestätigt Erkenntnisse aus vorangegangenen Untersuchungen, die zeigten, dass die Nonasaccharideinheit eines offenkettigen V3-Peptids NOE-Kontakte zum gegenüberliegenden Ile325 ausbildete.^[293] Analog zu diesen Ergebnissen kann im Fall des Peptids **v3og** von einer gewissen Stabilisierung der Peptidstruktur durch die räumliche Nähe der Glycosyleinheit zur gegenüberliegenden Flanke ausgegangen werden.

Da die mittels CD-spektroskopischer Analyse (Kapitel 4.3) ermittelten Anteile an Sekundärstrukturelementen für alle untersuchten Peptide in der gleichen Größenordnung liegen und somit keine signifikanten Strukturunterschiede aus dieser Untersuchung hervorgingen, lassen sich die Ergebnisse nicht mit den detaillierteren Informationen der NOESY-NMR-Experimente vergleichen.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der NOE-NMR-Analyse festgehalten werden, dass die Verbindungen **v3ct15** und **v3ct21** eine ähnliche Struktur untereinander aufweisen und bevorzugt eine α -helicale Konformation einzunehmen scheinen. Die Verbindungen **v3o** und **v3og** liegen ebenfalls in einer jeweils ähnlichen Konformation vor. Diese ist geprägt durch einen *turn*, der von Pro311 verursacht wird, sowie von Kontakten zwischen Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich mit Aminosäuren aus dem C-terminalen Bereich.

4.5 Liposomenpräparation

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Osteosarcoma (HOS)-Zellen überexprimieren den membranständigen CCR5-Corezeptor und wurden für SPR-Bindungsstudien mit Peptiden aus der V3-Region des viralen Glycoproteins 120 verwendet.

Da diese Zellen eine relativ hohe Masse aufweisen und es somit zu einer schnellen Sedimentierung in wässrigen Lösungen kommt, sind die Zellen in dieser Form für NMR-Messungen ungeeignet. Um dennoch Bindungsstudien mit dem membranimplementierten Rezeptor durchführen zu können, wurden Liposomen aus den HOS-Zellen hergestellt, die einen Durchmesser von ungefähr 200 nm aufweisen. Diese Vesikel enthalten weder Zellkerne noch Mitochondrien und sedimentieren aufgrund der ähnlichen Dichte zum umgebenden wässrigen, gepufferten Milieu nur sehr langsam. Die Präparation erfolgte nach der Vorschrift von B. Hünnefeld (AAV14).^[274] Der CCR5-Rezeptor verbleibt während der gesamten Liposomenherstellung in der Membran verankert.

Die nach AAV13 kultivierten HOS-Zellen wurden mehrfach mit deuteriertem LUV-NMR-Puffer gewaschen, um das Medium sowie Proteine im Überstand abzutrennen. Im letzten Schritt wurden die Zellen in deuteriertem LUV-EDTA-NMR-Puffer aufgenommen und nach AAV13 gezählt, um die Rezeptoranzahl bestimmen zu können. Da in der vorliegenden Arbeit die gleiche Zelllinie verwendet wurde, die bereits in vorangegangenen Arbeiten eingesetzt wurde, wurde von einer Rezeptordichte von 10^7 Rezeptoren/Zelle ausgegangen, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Der Einsatz von 1 mM deuteriertem EDTA diente der Inhibition von Proteasen. Weiterhin wurde den Pufferlösungen 6 mM Natriumazid zugesetzt, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

Danach wurde die Zellsuspension zur Inaktivierung zellulärer Proteasen mit einem Proteaseinhibitorenmix versetzt und bei 50 bar in einen Stickstoffhomogenisator gegeben. Dadurch wurde ein gleichmäßiger Druckaufbau in den Zellen und dem umgebenden Medium erreicht. Das spontane Ablassen des Drucks führte zum Zerplatzen der Zellen. Durch mehrfache Zentrifugation wurden selektiv die gewünschten Membranfragmente von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Fragmente wurden in LUV-EDTA-NMR-Puffer aufgenommen und nach AAV14 mittels Extrusion durch eine Filtermembran mit einer Porengröße von 100 nm in Liposomen mit einer homogenen Größenverteilung überführt. Hierfür wurde die Suspension der Membranfragmente elf Mal mit konstantem Druck durch den Filter gepresst.

Die Bestimmung des mittleren Liposomendurchmessers erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und wurde mit einem *Zetasizer Nano* (Modell: *ZEN 3600*) der Firma Malvern Instruments Ltd. durchgeführt. Die Messungen ergaben im Mittel einen Durchmesser der Vesikel von etwa 247 nm bei einem Polydispersitätsindex PI_{DLS} von ~ 0.45 , was einer relativ breiten Verteilung der Vesikelgröße entspricht.^[314]

Die Liposomenlösung wurde nach der Extrusion in das benötigte Volumen LUV-EDTA-NMR-Puffer aufgenommen und sofort für die NMR-Experimente verwendet. Bei einer Lagertemperatur von 4 °C waren die Liposomen etwa eine Woche stabil. Danach bildeten sich schmierige Rückstände in der Suspension, die dann nicht mehr verwendet werden konnte.

Für die STD-NMR-Messungen wurden Rezeptorkonzentrationen von 0.5 bis 1.5 μM verwendet. Jede NMR-Messung wurde bei 285 K durchgeführt und dauerte etwa sechs Stunden. Innerhalb dieses Zeitraums konnte keine Sedimentation der Liposomen beobachtet werden.

Die oben beschriebene Methode eignet sich ideal, um kleinere Partikel mit membranständigen Rezeptoren in ihrer nativen Umgebung zu erhalten. Die Darstellung auf anderen Wegen, wie z. B. mittels Rekonstitution, kann einen Verlust der Funktionalität der Rezeptoren durch nichtkorrekten Einbau in die Zellmembran zur Folge haben. Ein weiterer Nachteil der Rekonstitution ist der hohe Zeitaufwand der Methode. Während der Liposomenherstellung durch Extrusion ist es möglich, die Vesikel in einen geeigneten Puffer für die folgenden Experimente aufzunehmen, so dass dieser zeitaufwändige Schritt ebenfalls entfällt. Die Wölbung der Zellmembran führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer korrekten Orientierung der Rezeptormoleküle auf der Liposomenoberfläche.

Trotz mehrfacher Zentrifugationsschritte kann es allerdings zu einer nur unvollständigen Abtrennung nichtbenötigter Bestandteile der HOS-Zellen kommen. Schon bevor die Membranfragmente von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt sind, können sich bei der Stickstoffhomogenisation Liposomen bilden, die zelluläre Proteine, Enzyme u. ä. beinhalten. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten NMR-Experimente mit Liposomen wurden jedoch durch die Anwesenheit unerwünschter Zellinhalte nicht beeinträchtigt, da deren Signale durch die Anwendung eines Doppeldifferenzfilters effektiv eliminiert wurden.

Die Negativkontrolle der NMR-Messungen wurde mit Parentalliposomen durchgeführt. Diese wurden aus HOS-Zellen gewonnen, die den CCR5-Corezeptor nicht in ihrer Membran tragen. Somit kann untersucht werden, ob es zu unspezifischen Wechselwirkungen der V3-Peptide mit der Zellmembran kommt. Die Präparation der Parentalliposomen erfolgte nach dem oben beschriebenen Extrusionsverfahren.

4.6 NMR-Experimente

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Peptiden und Proteinen ist mit dem STD-NMR-Verfahren möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden STD-NMR-Messungen der synthetisierten V3-Peptide mit CCR5-Corezeptor-tragenden Liposomen durchgeführt. Bei STD-NMR-Experimenten befinden sich beide Interaktionspartner in Lösung, was einer guten Annäherung an die physiologischen Bedingungen des Systems entspricht. Es kann sowohl die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D bestimmt als auch ein detailliertes Epitop der Liganden auf atomarer Ebene erstellt werden.

4.6.1 Optimierung der Wasserunterdrückung für die STD-NMR-Experimente

Die NMR-Experimente erfolgten in einem wässrigen, deuterierten LUV-EDTA-Puffer. Hierfür ist eine effektive Unterdrückung des Restwassersignals von entscheidender Bedeutung. Das vorhandene Wasser führt nicht nur zu einem intensiven Signal, das Peptidsignale überlagern kann, auch wurde in vorangegangenen Untersuchungen festgestellt, dass Wassermoleküle an der Liposomenmembran assoziiert vorliegen können und so zu einer stark verbreiterten Hüllkurve der Liposomen führen können. Diese kann ebenfalls durch eine selektive Wasserunterdrückung verringert werden. Mit Standardpulssequenzen wie der WATERGATE- oder der *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung, die in das STD-NMR-Pulsprogramm implementiert sind, kann eine effektive Reduktion des Wassersignals erreicht werden (Kapitel 4.6).

Analog zu B. Hünnefeld wurden zunächst STD-NMR-Experimente mit einer WATERGATE-Wasserunterdrückung (*std.t4_w52.bc*) aufgenommen. Die Messungen wurden bei 285 K durchgeführt. Es wurde eine Rezeptorkonzentration von 1.36 μM und eine Peptidkonzentration (**v3ct15**) von 658 μM eingesetzt. Eine ungewöhnlich starke Reduktion der Methylsignale im Bereich von 0.8 – 0.6 ppm des STD-Spektrums ließ vermuten, dass die Parameter der WATERGATE-Wasserunterdrückung nicht optimal gewählt wurden (nicht abgebildet).

Um zu untersuchen, ob lediglich Einstellungen des WATERGATE-NMR-Experiments verändert werden mussten oder eine andere Art der Wasserunterdrückung notwendig war, wurden ^1H -NMR-Spektren des Peptids **v3ct15** akquiriert, die entweder eine Pulssequenz für

die WATERGATE- (*zggpw5*) oder die *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung (*zgesgp*) beinhalten.

Bei den WATERGATE-Sequenzen erfolgte eine Variation der Dauer des Delays *d19*, der die Form des Anregungsprofils der Wasserunterdrückung bestimmt. Es wurden Delaylängen von 70, 90 und 110 μs gewählt. Bei den *excitation sculpting*-Sequenzen wurde die Länge des selektiven 180° -Pulses *p12* variiert. Es wurden Pulslängen von 2, 4 und 8 ms gewählt.

Abbildung 28 zeigt einen Vergleich von NMR-Spektren des Peptids **v3ct15**, die mit den beiden unterschiedlichen Pulssequenzen zur Wasserunterdrückung aufgenommen wurden.

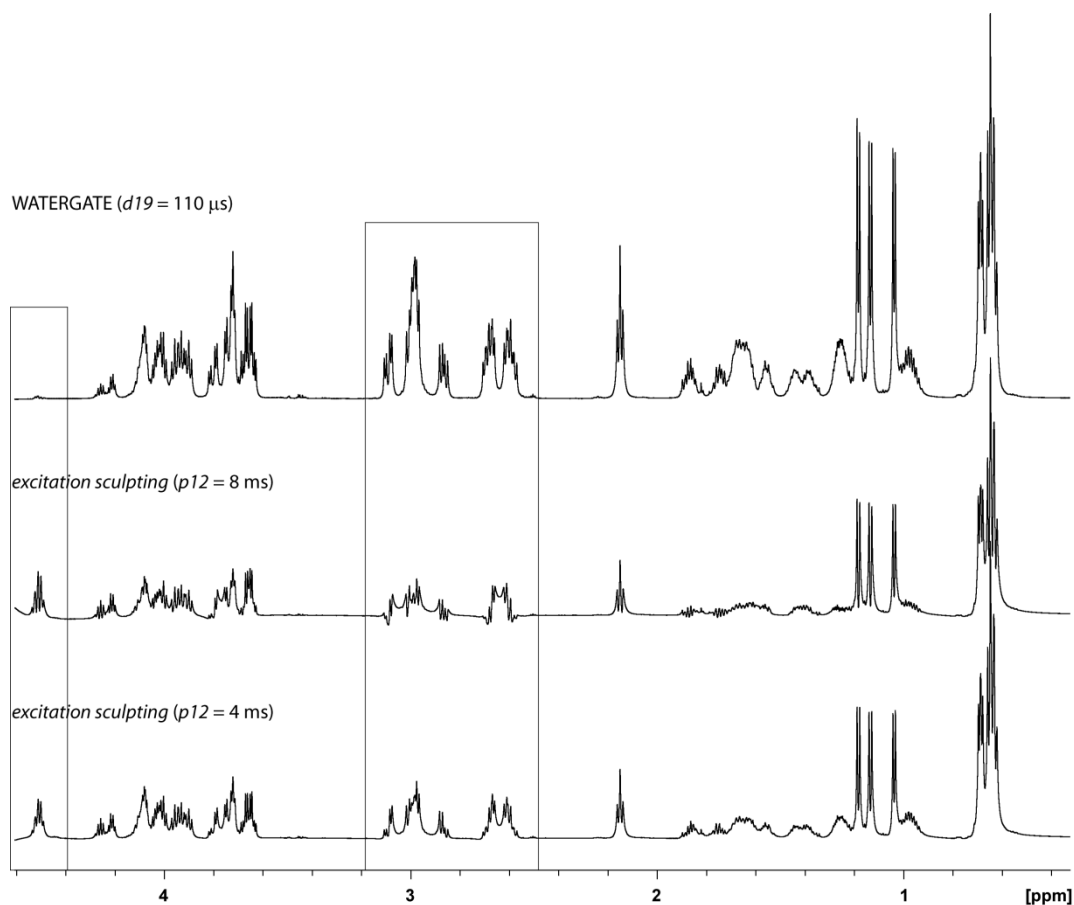


Abbildung 28: Optimierung der Wasserunterdrückung für STD-NMR-Messung.

Die abgebildeten Spektren des Peptids **v3ct15** (4.2 mM) wurden bei 285 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 akquiriert. Oben: ^1H -NMR-Spektrum mit WATERGATE-Wasserunterdrückung (*zggpw5*); die Delaylänge *d19* betrug 110 μs . Die Signale in der Nähe des Wassersignals (4.69 ppm) sind fast vollständig eliminiert. Mitte: ^1H -NMR-Spektrum mit *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung (*zgesgp*); die Pulslänge *p12* betrug 8 ms. Es ist ein deutliches Durchschwingen der Basislinie im Bereich von 3.1 – 2.5 ppm zu erkennen. Unten: ^1H -NMR-Spektrum mit *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung (*zgesgp*); die Pulslänge *p12* betrug 4 ms. Die Intensität der Signale in der Nähe des Wassersignals sowie der Methylprotonen bei 0.6 ppm ist kaum reduziert.

Es wurde beobachtet, dass die Intensität der α -Protonen der Aminosäuren bei der längsten Delayzeit *d19* der WATERGATE-NMR-Spektren am geringsten war. Dieser Bereich

(4.3 - 3.8 ppm) liegt dem unterdrückten Wassersignal am nächsten. Bei den Methylprotonen am Rand des Spektrums war dieser Effekt nicht zu beobachten. Durch eine abnehmende Dauer des Delays $d19$ wurde die Intensität der Signale kaum reduziert.

Die *excitation sculpting*-NMR-Spektren, die mit einer Pulslänge $p12$ von 8 ms akquiriert wurden, zeigten zwar die intensivsten Signale in der Nähe der Wasserresonanz und nur eine geringe Reduktion der Intensität der Methylsignale, allerdings war auch ein starkes Durchschwingen der Basislinie im Bereich von 3.1 – 2.5 ppm zu beobachten. Wurde die Pulslänge auf 2 ms gesetzt, war die Intensität der Methylsignale, die am weitesten vom Wassersignal entfernt liegen, am größten. Allerdings zeigten diese Spektren eine deutliche Reduktion der Intensität der α -Protonen der Aminosäuren.

Für die STD-NMR-Experimente wurde daher zur Wasserunterdrückung eine *excitation sculpting*-Pulssequenz mit einer Pulslänge $p12$ von 4 ms gewählt, bei der die Methylsignale ungefähr die gleiche Intensität wie bei einer Pulslänge von 2 ms aufweisen. Um eine optimale Wasserunterdrückung zu erreichen, musste für jedes Experiment zusätzlich individuell die Pulsleistung $sp1$ bestimmt werden. Dies verhinderte eine Übersteuerung und damit eine stark verrauschte Basislinie der NMR-Spektren in der Nähe des Wassersignals.

4.6.2 STDD-NMR-Experimente

Für die Interaktionsstudien mittels STD-NMR-Spektroskopie wurde das Pulsprogramm *stdiffesgp2d.th* verwendet, welches eine *excitation sculpting*-Sequenz für die Wasserunterdrückung enthält. Alle STD-NMR-Messungen wurden bei 285 K in 200 μ L deuteriertem LUV-EDTA-NMR-Puffer (pH 7.4) durchgeführt. Die Sättigung des Rezeptors wurde durch eine Kaskade von Gaußpulsen über einen Zeitraum von 3 s mit einer Abschwächung der Pulsleistung von 45 dB erreicht. Die Anzahl der Scans betrug jeweils 2048, was zu einer Messzeit von ungefähr sechs Stunden je Probe führte.

Auf die Anwendung eines $T_{1\rho}$ -Filters wurde verzichtet, da dies zu einer Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führen kann.^[248] Die Unterdrückung von Proteinsignalen mit einem Spinlock-Filter ist bei der STDD-NMR-Technik in der Regel nicht notwendig, da alle unerwünschten Signale des makromolekularen Bindungspartners durch die Doppeldifferenzbildung eliminiert werden.

Um eine Degradation von zellulären Proteinen, also u. a. des CCR5-Corezeptors, weitestgehend zu verhindern, wurde die von B. Hünnefeld verwendete Menge an Proteaseinhibitorenmix verdoppelt.^[274]

Die Einstrahlpunkte von -0.7 ppm (*on resonance*) und $+40$ ppm (*off resonance*) wurden von B. Hünnefeld übernommen. Diese waren durch Experimente mit veränderten *on resonance*-Einstrahlpunkten für die STD-NMR-Messungen mit Liposomen und Peptiden optimiert worden. Bei einer *on resonance*-Einstrahlfrequenz von -0.7 ppm war die Proteinsättigung noch zufriedenstellend (67 %) und die direkte Sättigung der Liganden möglichst gering.^[274]

Untersuchungen von C. Rademacher *et al.* zeigten, dass es zu einer Sättigung von virenähnlichen Partikeln noch in einem Bereich bis 100 ppm kommen kann.^[315] Der *off resonance*-Einstrahlpunkt kann also deutlich tieffeldverschobener gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings auf eine Optimierung der Einstrahlfrequenzen verzichtet.

4.6.2.1 **Bestimmung der Bindungsepitope und der Dissoziationskonstanten der Peptide mit CCR5-Liposomen**

Mittels STD-NMR-Experimenten ist zum einen die Bestimmung eines Bindungsepitops möglich. Zum anderen kann über die Durchführung einer Titrationsreihe mit unterschiedlichen Ligandüberschüssen, bezogen auf die Rezeptorkonzentration, die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D ermittelt werden.

Die NMR-Messungen mit dem Peptid **v3ct15** und den CCR5-tragenden Liposomen wurden mit einer Rezeptorkonzentration von $1.5 \mu\text{M}$ und einer maximalen Ligandkonzentration von $667 \mu\text{M}$ durchgeführt. Der höchste Ligandüberschuss war 445-fach. Zunächst wurde eine STD-NMR-Messung mit einer ligandfreien Liposomenprobe durchgeführt, um die Parameter des Pulsprogramms für den selektiven 90° -Puls und den *receiver gain* sowie Pulslänge und Pulsleistung für die Wasserunterdrückung zu bestimmen. Diese Werte wurden für die gesamte Titrationsreihe beibehalten. Die STD-NMR-Spektren der ligandfreien Liposomenprobe zeigten STD-Signale, die auf zelleigene Prozesse zurückzuführen sind. Das Liposomen-STD-NMR-Spektrum wurde jeweils von den STD-NMR-Spektren einer ligandhaltigen Liposomenprobe abgezogen. Die aus dieser Doppeldifferenzbildung erhaltenen STDD-NMR-Spektren zeigten ausschließlich Ligandsignale, die aus einer Interaktion mit dem CCR5-Rezeptor resultieren.

Um auszuschließen, dass STD-Signale des Peptids ohne Interaktion mit dem Rezeptor die eigentliche Messung verfälschen, wurde im Anschluss eine Artefakt-Messung mit einer liposomenfreien Peptidprobe durchgeführt. Durch die Analyse des erhaltenen STD-NMR-Spektrums kann der Beitrag von STD-Signalen, die z. B. durch eine Aggregation des Peptids verursacht werden, ermittelt werden.

Die Titrationsreihe zur Ermittlung der K_D -Werte wurde als Kreuztitration durchgeführt. D. h., es wurde der ligandhaltigen und der ligandfreien Liposomenprobe je ein identisches Volumen entnommen und der jeweils anderen Probe zugeführt. Auf diese Weise wurden Proben des Peptids **v3ct15** mit einem 445-, 346-, 197-, 148-, 98.7-, 49.4-, 24.7-, 9.9-, 4.7- und einem 2.4-fachen Ligandüberschuss erhalten. Die Rezeptorkonzentration war in jeder Probe einer Messreihe konstant. Dies hat den Vorteil, dass das STD-NMR-Spektrum der ligandfreien Liposomenlösung für die Doppeldifferenzbildung von jedem ligandhaltigen STD-NMR-Spektrum abgezogen werden konnte.

Nach der Messung wurden die FIDs der *on-* und *off resonance*-Spektren durch den Befehl *splitser* getrennt erhalten. Die Phasen- und Basislinienkorrektur wurden identisch für das *on-* und *off resonance*-Spektrum automatisiert durchgeführt. Durch Subtraktion der beiden separierten und prozessierten Spektren wurde das STD-Spektrum generiert. Protonen, die sich während der Interaktion näher am Rezeptor befinden, erfahren eine größere Sättigung als weiter entfernte. Ihr Signal ist im *on resonance*-Spektrum stärker reduziert. Durch die Differenzbildung der *on-* und *off resonance*-Spektren korrelieren intensivere Signale im STD-NMR-Spektrum mit einer größeren räumlichen Nähe zum Rezeptormolekül.

Von jedem STD-NMR-Spektrum einer ligandhaltigen Probe wurde das STD-NMR-Spektrum der reinen Liposomenlösung abgezogen, um das STDD-Spektrum zu generieren. Dieses ist somit um die Liposomenartefakte korrigiert und enthält ausschließlich Signale, die vom Liganden hervorgerufen werden (Abbildung 29).

Besonders im Bereich der Aromatensignale (7.0 – 6.5 ppm) ist deutlich zu erkennen, dass die Signale nicht von den Liposomen stammten, da diese im Artefaktspektrum (Abbildung 29, Mitte) nicht auftraten. Auch im Bereich der α -Protonen in der Nähe des Wassersignals (\sim 4.5 ppm) war der Ursprung der Signale eindeutig dem Liganden zuzuordnen.

Das NMR-Signal bei etwa 3.5 ppm stammt von den verwendeten Puffersubstanzen TRIS und EDTA.

Die Integration der *off resonance*- und der STDD-NMR-Spektren wurde seriell für alle NMR-Spektren einer Titrationsreihe durchgeführt. Das Verhältnis der Integrale des

off resonance- und des STDD-Spektrum gibt den absoluten STD-Effekt jedes einzelnen Protons in Prozent wieder.

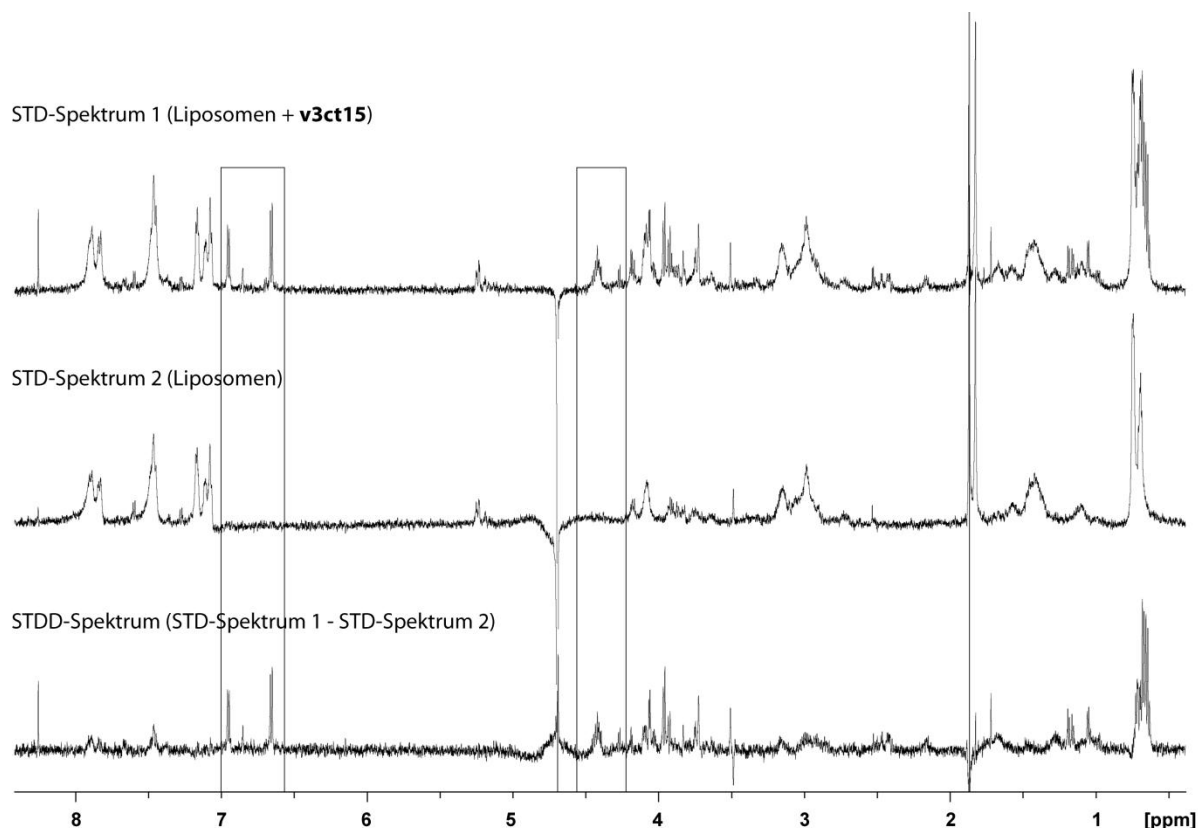


Abbildung 29: STD-NMR-Spektren und STDD-NMR-Spektrum des Peptids v3ct15.

Oben: STD-Spektrum des Peptids **v3ct15** (667 μM , 450-facher Überschuss) in der CCR5-Liposomenlösung (1.5 μM). Mitte: STD-Spektrum der ligandfreien CCR5-Liposomenlösung (1.5 μM). Unten: STDD-Spektrum des Peptids **v3ct15** in der CCR5-Liposomenlösung, ermittelt aus der Differenz der beiden STD-Spektren. (LUV-EDTA-Puffer, 285 K, 700 MHz). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Tyrosinsignale im STDD-Spektrum durch die Interaktion der Aminosäure mit dem Corezeptor hervorgerufen werden und nicht von den Liposomen stammen.

Die Ligandartefakte (Abbildung 30) wurden anschließend manuell von den absoluten STD-Prozentwerten abgezogen. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur ein geringer STD-Effekt des Peptids **v3ct15** in Abwesenheit der CCR5-tragenden Liposomen hervorgerufen wird. Am auffälligsten sind die Signale bei etwa 0.6 ppm der Methylgruppen der drei Isoleucine an den Positionen 321, 322 und 325. Diese Resonanzen liegen in der Nähe der *on resonance*-Einstrahlungsfrequenz und können somit einen schwachen Sättigungseffekt erfahren, ohne dass dieser auf ein Bindungsereignis mit dem Rezeptor zurückzuführen ist. Ein geringer STD-Effekt des Liganden ist ebenfalls im Bereich der α -Protonen (4.5 – 3.5 ppm) sowie der aromatischen Protonen (7.0 – 6.5 ppm) zu erkennen.

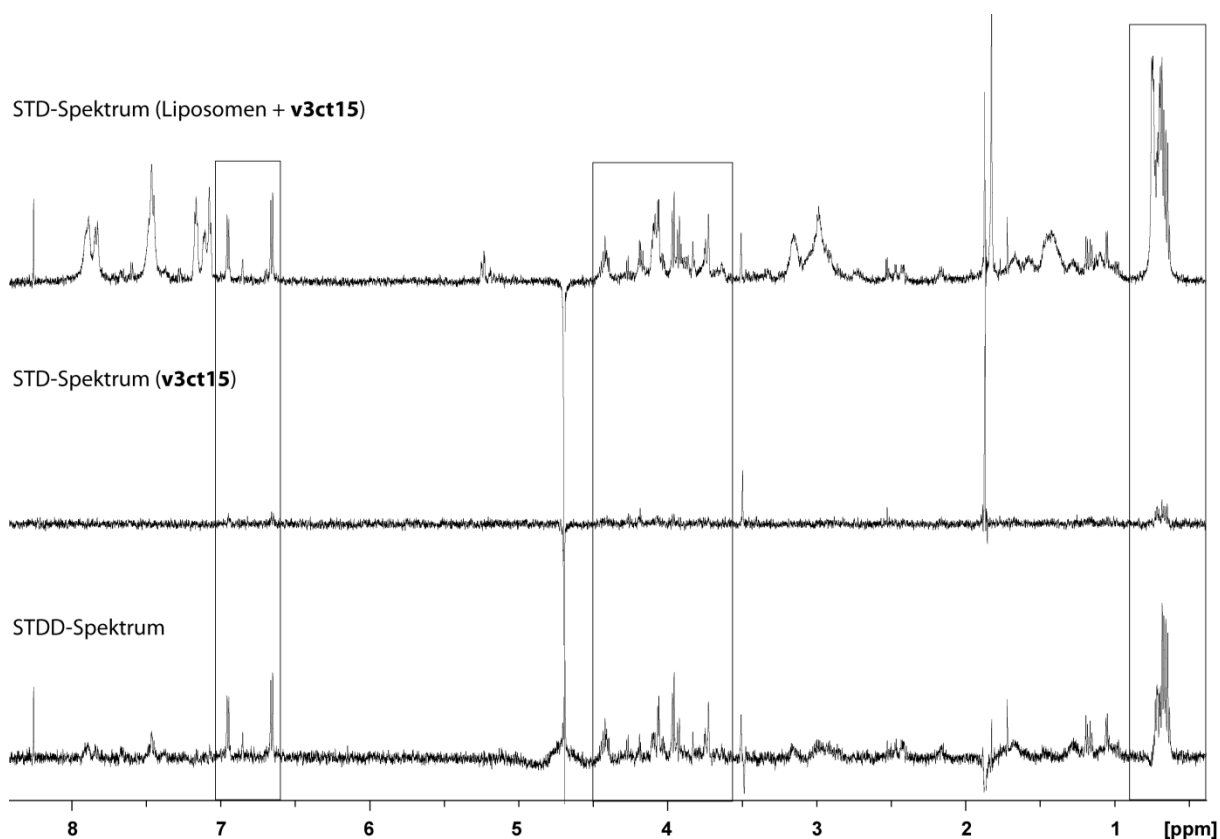


Abbildung 30: STD-NMR-Spektren des Peptids *v3ct15* zur Bestimmung der Ligandartefakte.

Oben: STD-Spektrum des Peptids **v3ct15** (667 μM , 450-facher Überschuss) in der CCR5-Liposomenlösung (1.5 μM). Mitte: STD-Spektrum des Peptids **v3ct15** (667 μM). Unten: STDD-Spektrum des Peptids **v3ct15** in der CCR5-Liposomenlösung, ermittelt wie in Abbildung 29: beschrieben. (LUV-EDTA-Puffer, 285 K, 700 MHz). Es ist deutlich zu erkennen, dass das Peptid nur wenig Artefaktsignale zeigt. Die STD-Prozente der Artefaktsignale wurden manuell von den absoluten STD-Prozentwerten abgezogen.

Das Bindungsepitop der Peptid-CCR5-Interaktion wurde aus der Messung mit einem 200-fachen Ligandüberschuss (296 μM , **v3ct15**) erstellt. Dazu wurde der höchste Wert der absoluten STD-Prozente auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte normiert, um die relativen STD-Prozente zu erhalten (Tabelle 11). Die vollständigen Daten der Messungen befinden sich im Anhang.

Es konnte ein STD-Effekt beobachtet werden, der sich über das ganze Peptid **v3ct15** erstreckt. Nichtangegebene STD-Prozentwerte bedeuten also nicht, dass diese Protonen nicht an der Interaktion beteiligt sind. Einige STD-NMR-Signale sind mehreren Protonen zuzuordnen. Eine genaue Differenzierung konnte nicht vorgenommen werden. Daher sind in Tabelle 11 nur die Protonen angegeben, für die eine präzise Zuordnung gemacht werden konnte. Ausnahmen bilden hier die α -Protonen von Asp320 und Asp324. Der ermittelte STD-Effekt resultiert wahrscheinlich aus einer Beteiligung von beiden Aminosäuren an der Interaktion. Das Gleiche gilt für die Protonen der Methylgruppen von Ile325. Es tragen

vermutlich beide Gruppen zu der Bindung an den Rezeptor bei. Die ermittelten STD-Prozentwerte sind in diesen Fällen nicht als absolut zu betrachten, sondern dienen hier zu einer Abschätzung über einen Beitrag dieser Protonen zu der Wechselwirkung mit CCR5. Die Problematik, die bei der Akquisition zweidimensionaler STD-NMR-Spektren, welche eine Differenzierung überlagerter Signale ermöglichen, auftrat, wird weiter unten für die Untersuchungen des Peptids **v3ct21** diskutiert.

Die höchsten STD-Prozentwerte wurden für die ϵ -Protonen des aromatischen Tyr316 erhalten. Aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sollten absolute STD-Prozentwerte, die kleiner als 0.5 % sind, mit Vorsicht betrachtet werden.

Für die δ -Protonen von Tyr316 sowie die γ' -Protonen von Ile325 konnten K_D -Werte ermittelt werden, die in der gleichen Größenordnung lagen, wie die Werte von Tyr316 ($H\epsilon$) und Gln327 ($H\gamma$), die höhere STD-Prozentwerte aufweisen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der beobachtete, wenn auch sehr geringe, STD-Effekt auf eine spezifische Wechselwirkung dieser Protonen mit dem CCR5-Rezeptor zurückzuführen ist.

Tabelle 11: Absolute und relative STD-Prozente ($c_{v3ct15} = 296 \mu\text{M}$) sowie K_D -Werte des Peptids *v3ct15*.

Proton	absolute STD-%	relative STD-%	K_D -Wert
$H\epsilon$, Tyr316	1.6 %	100.0 %	194.3 μM
$H\gamma$, Gln327	1.3 %	79.6 %	813.7 μM
$H\alpha$, Ala317	0.9 %	54.2 %	
$H\alpha$, Ile322	0.8 %	48.6 %	
$H\delta$, Tyr316	0.4 %	24.4 %	492.1 μM
$H\gamma'$, Ile325	0.3 %	20.3 %	200.8 μM
$H\alpha$, Asp320/Asp324	0.3 %	15.7 %	
$H\gamma/\delta$, Ile325	0.1 %	5.6 %	
$H\beta$, Ala317	0.05 %	1.5 %	

Abbildung 31 zeigt eine grafische Darstellung des Bindungsepitops des Peptids **v3ct15** in Interaktion mit dem CCR5-Corezeptor.

Wie bereits erwähnt, ist das Epitop der Interaktion von **v3ct15** mit CCR5 nicht in einem bestimmten Bereich des Liganden lokalisiert, auch wenn höhere STD-Prozentwerte tendenziell im N-terminalen Bereich zu finden sind. Da aber z. B. Gln327 ebenfalls einen hohen STD-Prozentwert aufweist, scheint die Bindung an CCR5 ebenfalls durch einen Beitrag des C-terminalen Bereichs der Peptidsequenz verursacht zu werden. Für eine genauere Aussage durch die Zuordnung der nichtseparierten Signale ist die Akquisition von

2D-STD HSQC-NMR-Spektren notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit gelang dies allerdings nicht (s. u.).

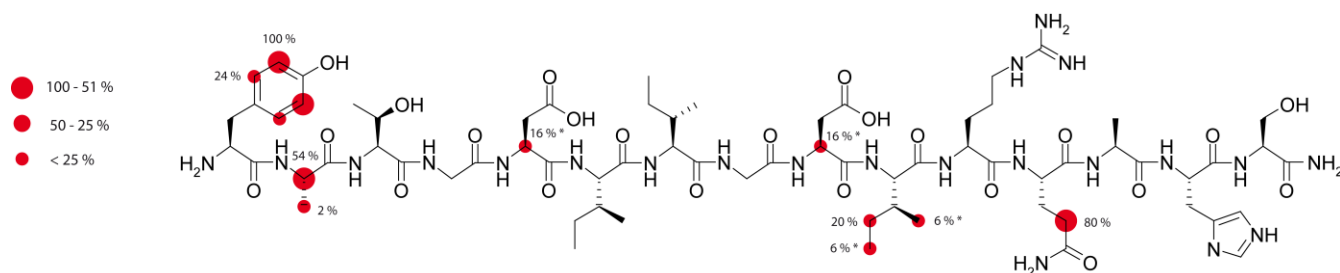


Abbildung 31: Grafische Darstellung des STD-NMR-Epitops des Peptids *v3ct15*.

Dargestellt sind die relativen STD-Prozente der jeweiligen Protonen des Peptids **v3ct15** (296 μM , 200-facher Überschuss). Es sind nur die Protonen dargestellt, die mittels 1D-STD-NMR zugeordnet werden konnten. Die mit einem (*) gekennzeichneten Positionen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Es konnte keine Differenzierung zwischen $\text{H}\delta$ und $\text{H}\gamma$ der Isoleucine gemacht werden.

Zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D der einzelnen Protonen des Peptids **v3ct15** wurden die absoluten STD-Prozente in STD-Amplifikationsfaktoren umgerechnet, indem die STD-Prozentwerte mit den entsprechenden Ligandüberschüssen multipliziert wurden. Hierbei bleiben einige Effekte, wie z. B. die Kinetik der Austauschreaktion, die Zeitkonstanten für die Sättigung sowie die T_1 -Relaxationszeiten für die betrachteten Protonen, unberücksichtigt. Da diese Parameter nicht bekannt sind, fließen sie nicht in die Kurvenverläufe mit ein.

Die K_D -Werte der einzelnen Ligandprotonen wurden durch Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentrationen (Abbildung 32) und einer Anpassung der Sättigungskurve an das *one site binding*-Modell (Gleichung 3) ermittelt.

In der Regel liegen die ermittelten K_D -Werte der einzelnen Resonanzen eines Liganden innerhalb derselben Größenordnung. Der niedrigste Wert für K_D mit dem größten STD-Prozentwert kann dabei als beste Näherung für die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D des gesamten Liganden gesehen werden.^[316]

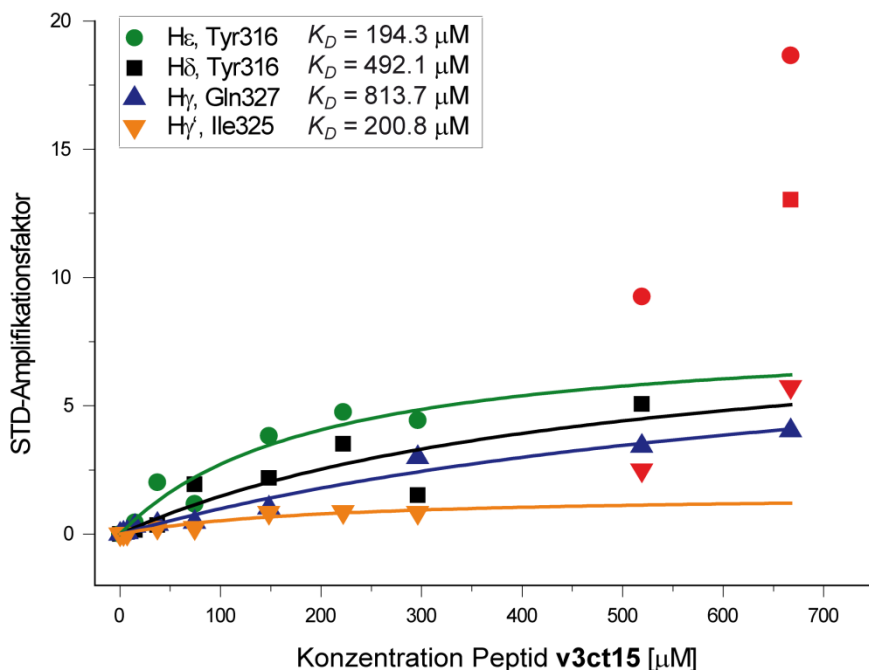


Abbildung 32: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration des Peptids *v3ct15*.

Rot markierte Datenpunkte lagen im Bereich für unspezifische Wechselwirkungen des Peptids mit dem Rezeptor und wurden bei der K_D -Wert-Bestimmung nicht berücksichtigt.

Die Kurvenverläufe belegen jeweils eine spezifische Interaktion des Peptids *v3ct15* mit dem CCR5-Rezeptor.

Abbildung 33 zeigt eine grafische Übersicht der ermittelten K_D -Werte des Peptids *v3ct15*. Der niedrigste K_D -Wert (194.3 μM) wurde für die ϵ -Protonen des Tyr316, der höchste (813.7 μM) für die γ -Protonen von Gln327 erhalten.

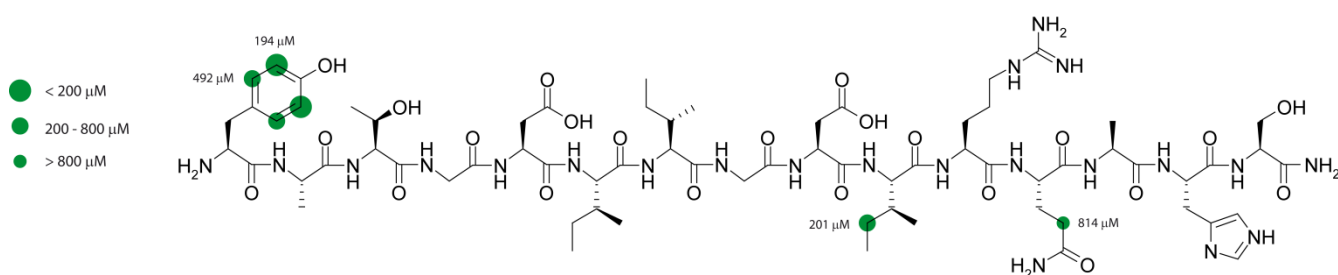


Abbildung 33: Grafische Darstellung der K_D -Werte des Peptids *v3ct15*.

Die berechneten K_D -Werte liegen zwischen 194 und 814 μM . Das Peptid *v3ct15* bindet mit einer Dissoziationskonstante von etwa 200 μM an den CCR5-Rezeptor.

Die NMR-Messungen mit dem Peptid *v3ct21* und CCR5-tragenden Liposomen wurden mit einer Rezeptorkonzentration von 0.5 μM und einer maximalen Ligandkonzentration von 400 μM durchgeführt. Der höchste Ligandüberschuss war 800-fach. Die NMR-spektros-

kopischen Parameter wurden anhand einer ligandfreien Liposomenprobe bestimmt und während der gesamten Titrationsreihe beibehalten. Artefakt-Signale des Peptids wurden im Anschluss durch eine Messung mit einer liposomenfreien Peptidprobe bestimmt.

Mittels Kreuztitration wurden Proben mit einem 800-, 704-, 608-, 464-, 336-, 240-, 192-, 144-, 96.0-, 48.2-, 9.5- und einem 4.8-fachen Ligandüberschuss erhalten. Die Prozessierung der Spektren erfolgte wie für das Peptid **v3ct15** beschrieben.

Die relativen STD-Prozentwerte für das Bindungsepitop der Interaktion von **v3ct21** mit CCR5 wurden aus der Messung mit einem 608-fachen Ligandüberschuss (304 μM) ermittelt (Tabelle 12). Die vollständigen Daten der Messungen befinden sich im Anhang.

Tabelle 12: Absolute und relative STD-Prozente ($c_{\text{v3ct21}} = 304 \mu\text{M}$) sowie K_D -Werte des Peptids *v3ct21*.

Proton	absolute STD-%	relative STD-%	K_D -Wert
H ϵ , Tyr316	6.0%	100.0 %	191.8 μM
H α , Ala317	2.6%	43.5 %	574.7 μM
H β , Gln327	2.5%	41.2 %	
H β , Asp320	2.3%	37.6 %	
H β , Ile325	1.8%	30.2 %	235.6 μM
H δ , His329	1.5%	25.8 %	551.7 μM
H ξ , Phe315	1.4%	23.8 %	
H β , Tyr316/H β , Phe315	1.4%	23.4 %	55.5 μM
H γ/δ , Ile321	1.3%	21.5 %	
H β , His329	1.1%	18.8 %	
H γ' , Ile321/Ile322	1.1%	17.7 %	245.8 μM
H δ , Arg326	1.0%	16.3 %	470.4 μM
H α , Tyr316	1.0%	16.1 %	
H α , Thr318	0.9%	14.3 %	
H δ , Arg313	0.6%	10.6 %	
H γ' , Ile325	0.4%	7.3 %	
H α , Asp320/Asp324	0.3%	5.8 %	583.7 μM
H α , Gly312	0.3%	4.7 %	173.1 μM
H δ , Tyr316	0.1%	1.4 %	33.4 μM
H α , Ile322			881.8 μM
H β , Asp324			877.3 μM
H β , Ala314/H γ , Thr318			82.3 μM

Wie für das Peptid **v3ct15** konnten STD-aktive Protonen beobachtet werden, die über die gesamte Sequenz des Peptids **v3ct21** verteilt vorlagen. In Tabelle 12 sind nur die Protonen angegeben, für die eine Zuordnung gemacht werden konnte. Ausnahmen bilden hier die

β -Protonen von Phe315 und Tyr316, die γ' -Protonen von Ile321 und Ile322 sowie die α -Protonen von Asp320 und Asp324. Auch war eine Differenzierung zwischen $H\beta$ von Ala314 und $H\gamma$ von Thr318 nicht möglich. Der ermittelte STD-Effekt resultiert wahrscheinlich aus einer Beteiligung aller aufgelisteten Protonen an der Interaktion. Das Gleiche gilt für die Protonen der beiden Methylgruppen von Ile321. Es tragen vermutlich beide Gruppen zu der Bindung an den Rezeptor bei. Wie bereits oben erwähnt, dienen die angegebenen STD-Prozentwerte einer Abschätzung über einen Beitrag dieser Protonen zu der Wechselwirkung mit CCR5.

Aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sollten absolute STD-Prozentwerte, die kleiner als 0.5 % sind, mit Vorsicht betrachtet werden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der STD-NMR-Spektren des Peptids **v3ct21** war geringer als bei den Messungen mit dem Peptid **v3ct15**. Für die STD-NMR-Messungen mit dem Peptid **v3ct21** konnte lediglich ein Drittel der Rezeptorkonzentration im Vergleich zu den Messungen mit Peptid **v3ct15** verwendet werden, da eine höhere Vesikelkonzentration zu einem Ausfallen der Liposomen aus der Lösung führte.

Für die Protonen mit STD-Prozenten unter 0.5 % konnten zum Teil Werte für K_D ermittelt werden, die im gleichen Bereich lagen wie die Werte der übrigen Protonen mit höheren STD-Prozenten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der beobachtete STD-Effekt auf eine spezifische Wechselwirkung dieser Protonen mit dem CCR5-Rezeptor zurückzuführen ist. Für das α -Proton von Ile322, die β -Protonen von Asp324 sowie für ein Signal, das von Ala314 ($H\beta$) und von Thr318 ($H\gamma$) stammt, konnten keine absoluten STD-Prozentwerte bei der Ligandkonzentration von 304 μ M ermittelt werden. Daher erfolgt in Tabelle 12 hierzu keine Angabe.

Abbildung 34 zeigt eine grafische Darstellung des Bindungsepitops der Wechselwirkung des Peptids **v3ct21** mit dem CCR5-Corezeptor.

Das Epitop des Peptids **v3ct21** zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem Epitop von **v3ct15**. Der stärkste STD-Effekt wird durch die ϵ -Protonen von Tyr316 verursacht. Auch im Fall von **v3ct21** ist die Interaktion mit CCR5 nicht auf einen bestimmten Bereich der Peptidsequenz beschränkt.

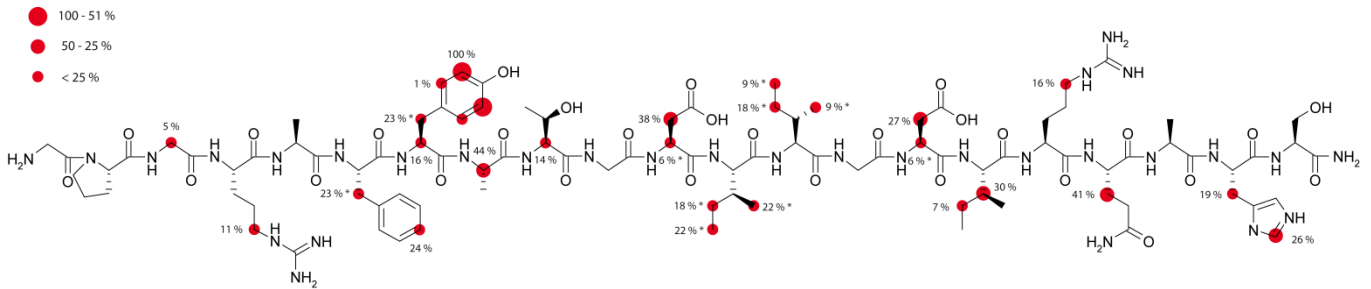


Abbildung 34: Grafische Darstellung des STD-NMR-Epitops des Peptids v3ct21.

Dargestellt sind die relativen STD-Prozente der jeweiligen Protonen des Peptids **v3ct21** (304 μM , 608-facher Überschuss). Es sind nur die Protonen dargestellt, die mittels 1D-STD-NMR zugeordnet werden konnten. Die mit einem (*) gekennzeichneten Positionen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Es konnte keine Differenzierung zwischen H_δ und H_γ der Isoleucine gemacht werden.

Anhand des Epitops lässt sich keine klare Aussage zum Einfluss des $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ -Motivs auf die Corezeptorbindung machen. Dieses Motiv scheint jedoch aufgrund der geringen STD-Prozentwerte bei der CCR5-Bindung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die ermittelten Werte der thermodynamischen Dissoziationskonstante K_D lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: K_D -Werte größer (Abbildung 35) und K_D -Werte kleiner als 500 μM (Abbildung 36).

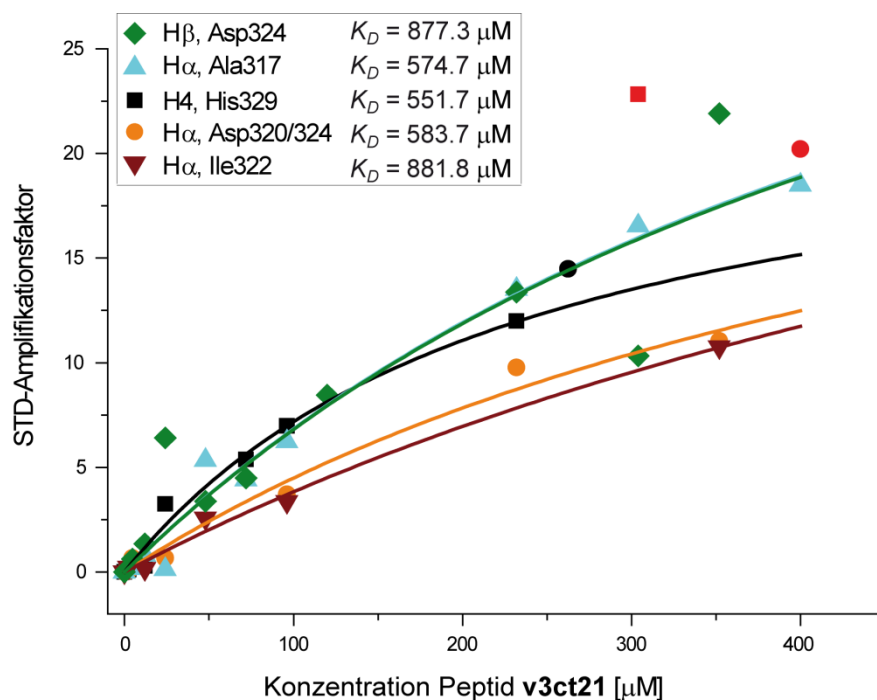


Abbildung 35: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration des Peptids v3ct21.

Abgebildet sind die Kurven für die Protonen, die einen K_D -Wert größer als 500 μM aufweisen. Rot markierte Datenpunkte liegen im Bereich für unspezifische Wechselwirkungen des Peptids mit dem Rezeptor und wurden bei der K_D -Wert-Bestimmung nicht berücksichtigt. Es konnte keine Unterscheidung zwischen den α -Protonen von Asp320 und Asp324 gemacht werden.

Die Kurvenverläufe belegen jeweils eine spezifische Interaktion des Peptids **v3ct21** mit dem CCR5-Rezeptor.

Protonen mit K_D -Werten, die größer als $500 \mu\text{M}$ sind, befinden sich überwiegend im C-terminalen Bereich des Peptids **v3ct21** (Asp320 bis His328). Eine Ausnahme bilden hier die α -Protonen von Ala317, die einen K_D -Wert von $574.7 \mu\text{M}$ aufweisen. Diese Aminosäure befindet sich ungefähr in der Mitte der Sequenz.

Protonen mit K_D -Werten, die kleiner als $500 \mu\text{M}$ sind, befinden sich überwiegend im N-terminalen Bereich des Peptids (Gly312 bis Ile322). Ausnahmen bilden hier die β -Protonen von Ile325 ($235.6 \mu\text{M}$) und δ -Protonen von Arg326 ($470.4 \mu\text{M}$) aus dem C-terminalen Bereich.

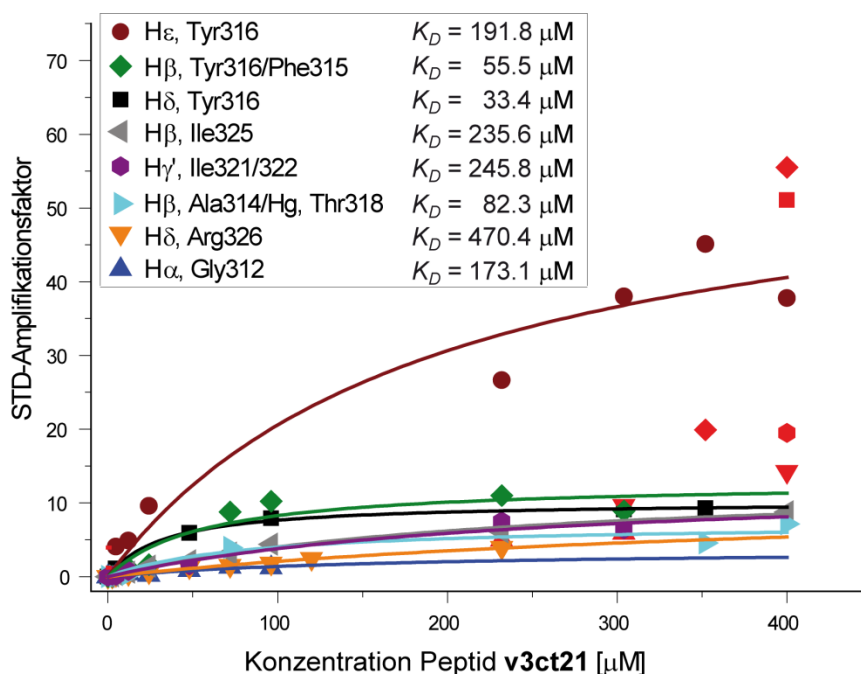


Abbildung 36: Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration des Peptids v3ct21.

Abgebildet sind die Kurven für die Protonen, die einen K_D -Wert kleiner als $500 \mu\text{M}$ aufweisen. Rot markierte Datenpunkte lagen im Bereich für unspezifische Wechselwirkungen des Peptids mit dem Rezeptor und wurden bei der K_D -Wert-Bestimmung nicht berücksichtigt. Es konnte keine Unterscheidung zwischen den β -Protonen von Phe315 und Tyr316 sowie von Ala314 und Thr318 bzw. den γ' -Protonen von Ile321 und Ile322 gemacht werden.

Die grafische Übersicht der ermittelten K_D -Werte des Peptids **v3ct21** (Abbildung 37) verdeutlicht die Verteilung dieser beiden Gruppen von Protonen auf unterschiedliche Bereiche des Peptids **v3ct21**.

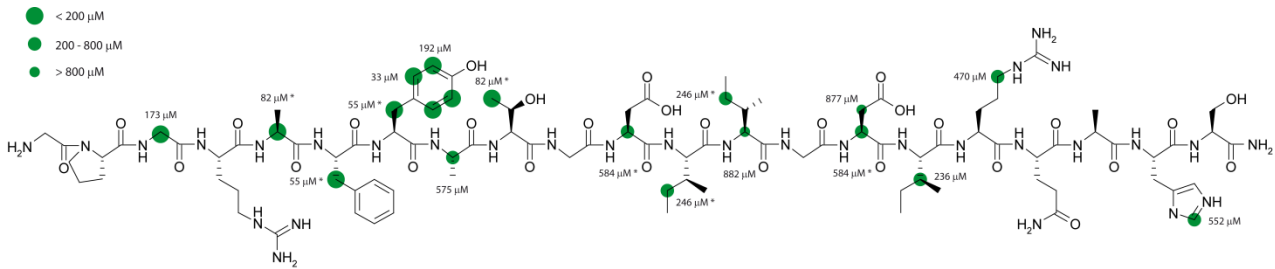


Abbildung 37: Grafische Darstellung der K_D -Werte des Peptids v3ct21.

Die berechneten K_D -Werte liegen zwischen 33 und 882 μM . Die mit einem (*) gekennzeichneten Positionen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Das Peptid v3ct21 bindet mit einer ähnlichen Dissoziationskonstante wie das Peptid v3ct15 an den CCR5-Rezeptor ($\sim 200 \mu\text{M}$). Die ermittelten K_D -Werte lassen sich in Werte größer und in Werte kleiner als 500 μM unterteilen. Protonen mit K_D -Werten größer als 500 μM befinden sich überwiegend im C-terminalen, Protonen mit K_D -Werten kleiner als 500 μM überwiegend im N-terminalen Bereich des Peptids v3ct21.

Widersprüche zwischen hohen STD-Prozentwerten, die für eine signifikante Beteiligung dieser Protonen an der Bindung sprechen, und dazu ermittelten relativ hohen K_D -Werten wie im Fall von Ala317 ergeben sich daraus, dass für die Epitop-Erstellung eine Konzentrationsabhängigkeit der beteiligten Protonen unberücksichtigt blieb. Für einen detaillierteren Einblick wären die Erstellung und ein Vergleich von Bindungsepitopen bei unterschiedlichen Ligandkonzentrationen notwendig. Es wurde bei der Erstellung der Epitope der beiden Peptide darauf geachtet, dass eine Ligandkonzentration gewählt wurde, die unterhalb des Konzentrationsbereichs unspezifischer Bindungsereignisse liegt. Dieser Bereich konnte anhand der mathematischen Anpassung bei der K_D -Wert-Berechnung ermittelt werden. Es sollten daher immer parallel das Bindungsepitop und eine Kartierung der K_D -Werte betrachtet werden.

Die Differenzierung in Protonengruppen mit unterschiedlichen K_D -Werten innerhalb unterschiedlicher Bereiche des Peptids deutet auf einen Bindungsmodus hin, der nicht einem 1:1-Bindungsmodell entspricht. Trotz dieser Vermutung konnte eine mathematische Anpassung an das *one site binding*-Modell durchgeführt werden. Die Untersuchung anderer Bindungsmodelle brachte keine besseren Ergebnisse. Es ist zu vermuten, dass es sich um einen Bindungsmodus handelt, der sich mit bekannten Modellen nicht hinreichend beschreiben lässt.

Durch einen Vergleich der Bindungsepitope sowie der Dissoziationskonstanten der Peptide v3ct15 und v3ct21 ist generell zu sagen, dass das Tyr316 jeweils die höchsten STD-Prozentwerte sowie niedrige K_D -Werte im Bereich von 200 μM aufweist. Dies deutet auf einen entscheidenden Beitrag dieser Aminosäure an der Peptid-CCR5-Interaktion hin. Des Weiteren

zeigten sowohl Ala317 als auch Gln327 hohe STD-Prozentwerte. Die K_D -Werte beider Aminosäuren sind jedoch deutlich größer (574.7 μM bzw. 813.7 μM) als die von Tyr316. K_D -Werte des Peptids **v3ct21**, die unterhalb von 200 μM liegen, stammen von Aminosäuren mit sehr niedrigen STD-Prozentwerten bzw. von Protonen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Daher kann festgehalten werden, dass beide Peptide mit dem CCR5-Corezeptor mit einem K_D -Wert von etwa 200 μM interagieren. Der Bindungsmodus scheint ähnlich zu sein, da sich die K_D -Werte der beiden Verbindungen in Werte kleiner und Werte größer 500 μM einteilen lassen. Für das Peptid **v3ct15** konnten allerdings deutlich weniger K_D -Werte ermittelt werden.

Um die Protonen, die aufgrund von Überlagerungen im 1D-STD-NMR-Spektrum nicht differenziert werden konnten, zuordnen zu können, wurden 2D-STD HSQC-NMR-Spektren akquiriert. Zunächst wurde ein 1D-HSQC-NMR-Spektrum (*hsqcedetgpsisp.2*) des Peptids **v3ct21** aufgenommen, um eine geeignete Ligandkonzentration für die weniger sensitiven 2D-NMR-Messungen zu ermitteln.

Es zeigte sich, dass eine Konzentration des Peptids **v3ct21** von 304 μM , wie sie für die Erstellung des Epitops verwendet wurde, nicht ausreichend war. Die Konzentration wurde daher verdoppelt. Auch mit dieser Konzentration gelang die Akquisition eines HSQC-NMR-Spektrums nicht. Ein weiteres Problem war, dass bei einer Peptidkonzentration von 608 μM und einer Rezeptorkonzentration von 1.0 μM eine sofortige Aggregatbildung der Liposomen zu beobachten war. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die höher gewählte Rezeptorkonzentration bei gleichbleibendem Ligandüberschuss (608-fach) sowie gleichbleibendem Probenvolumen eine stärkere Interaktion der Vesikel untereinander begünstigte.

Die Aufnahme eines zweidimensionalen STD-NMR-Experimentes zur Ergänzung des obigen Bindungsepitops des Peptids **v3ct21** gelang auf diesem Weg nicht. Es bleibt zu klären, ob eine höhere Peptidkonzentration als 608 μM eingesetzt werden kann, wobei ein geringerer Ligandüberschuss gewählt werden sollte, um die Wechselwirkungen der Vesikel untereinander zu minimieren.

4.6.2.2 **Negativkontrolle des Peptids v3ct21 mit Parentalliposomen**

Zum Nachweis der spezifischen Interaktion von V3-Peptiden mit CCR5-tragenden Liposomen wurde eine Negativkontrolle mit Parentalliposomen durchgeführt. Die Parentalliposomen tragen keinen CCR5-Rezeptor auf ihrer Oberfläche.

Die NMR-Messungen mit dem Peptid **v3ct21** und Parentalliposomen wurden mit einer Liposomenkonzentration durchgeführt, die bei Anwesenheit des Rezeptors einer CCR5-Konzentration von 0.5 μM entsprechen würde. Die maximale Ligandkonzentration betrug 333 μM . Die NMR-spektroskopischen Parameter wurden anhand einer ligandfreien Parentalliposomenprobe bestimmt und während der gesamten Titrationsreihe beibehalten. Artefakt-Signale des Peptids wurden im Anschluss durch eine Messung mit einer liposomenfreien Peptidprobe bestimmt.

Mittels Kreuztitration wurden Proben mit Ligandkonzentrationen durchgeführt, die einem 666-, 522-, 424-, 338-, 242-, 193-, 145-, 96.8-, 48.2-, 24.2-, 9.7- und einem 4.9-fachen Ligandüberschuss entsprechen würden.

Im STDD-NMR-Spektrum (Abbildung 38) sind sowohl negative Signale als auch schwache positive Signale zu erkennen.

STD-Spektrum 1 (Parentalliposomen + **v3ct21**)

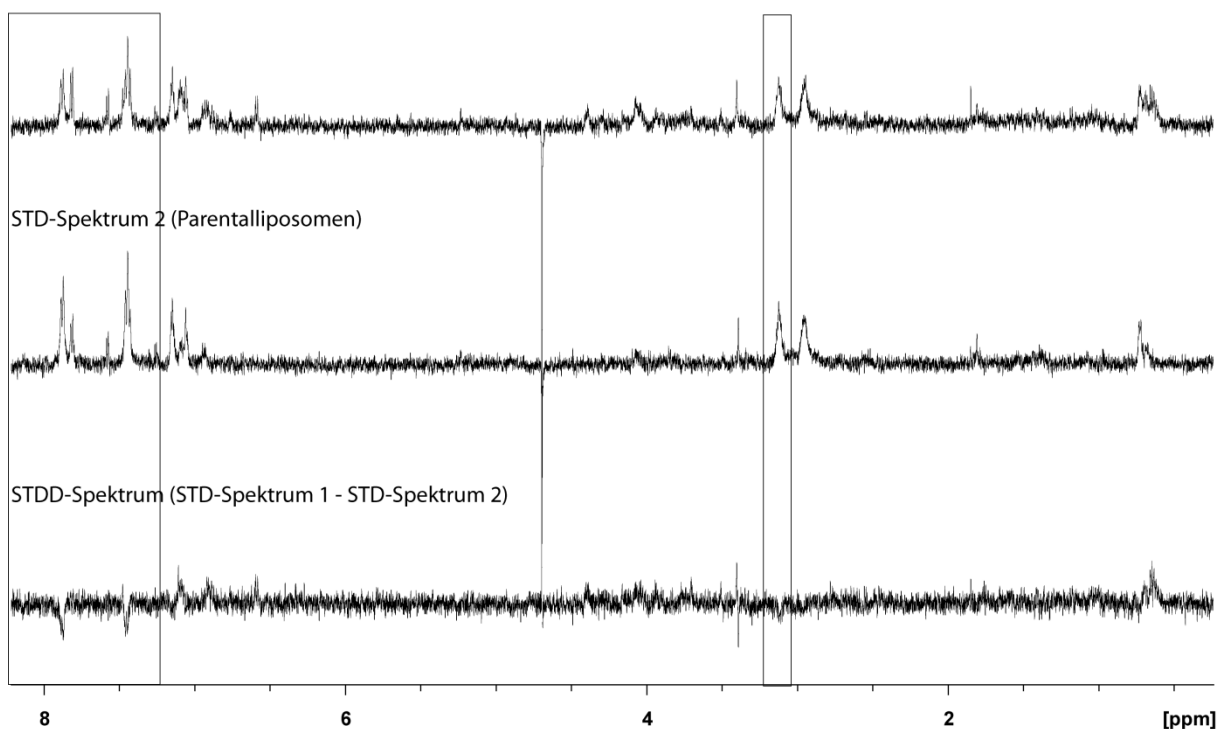


Abbildung 38: STD-NMR-Spektren des Peptids *v3ct21*.

Oben: STD-Spektrum des Peptids **v3ct21** (333 μM) in der Parentalliposomenlösung. Mitte: STD-Spektrum der ligandfreien Parentalliposomenlösung. Unten: STDD-Spektrum des Peptids **v3ct21** in der Parentalliposomenlösung, ermittelt aus der Differenz der beiden STD-Spektren. (LUV-EDTA-Puffer, 285 K, 700 MHz). Es sind negative Signale sowie schwache positive Signale im STDD-Spektrum zu erkennen. Die negativen Signale deuten auf eine unspezifische Wechselwirkung des Peptids **v3ct21** mit den Parentalliposomen hin.

Die negativen Signale befinden sich im Bereich der α -Protonen bei etwa 3.1 ppm sowie im Bereich der aromatischen Protonen (8.0 – 7.2 ppm). Ein Vergleich mit einem ^1H -NMR-

Spektrum des Peptids **v3ct21** zeigte, dass sich die negativen Signale ausnahmslos Resonanzen der Parentalliposomen zuordnen lassen.

Die Intensität der negativen Signale nimmt mit steigender Ligandkonzentration ab (Abbildung 39).

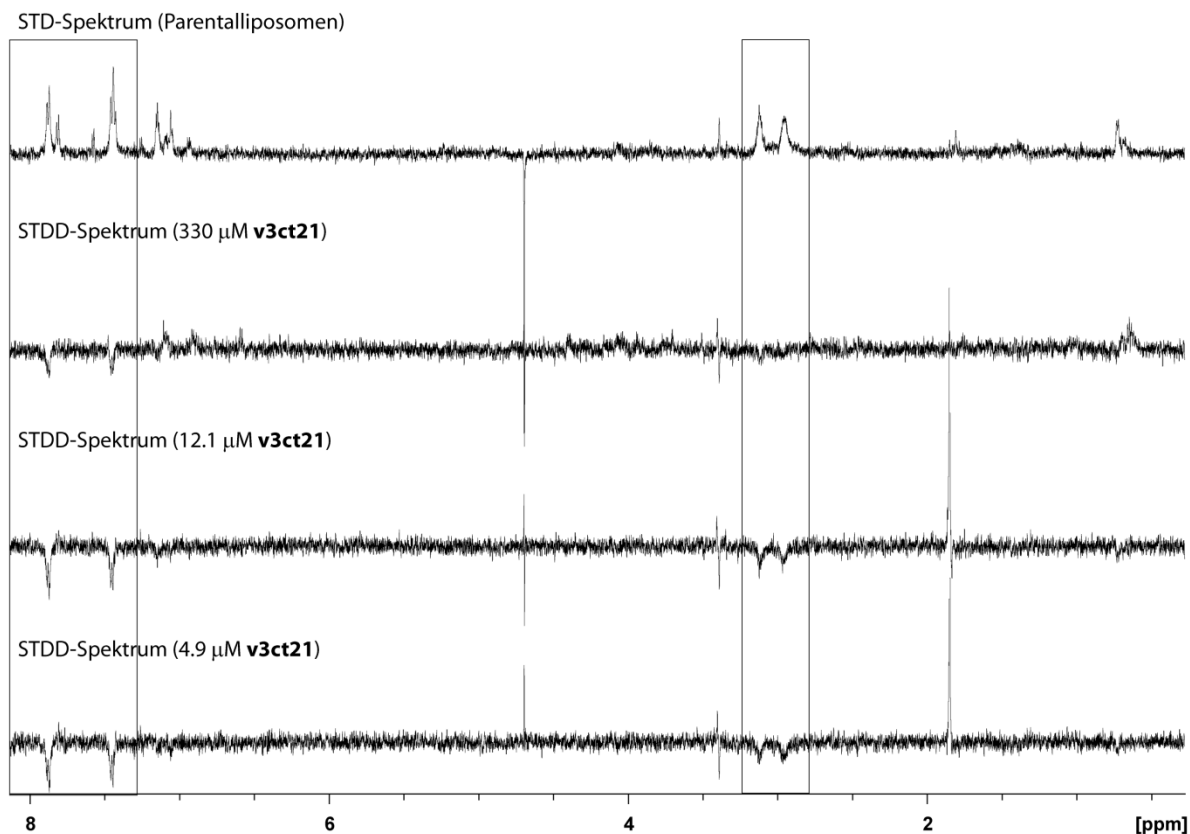


Abbildung 39: STD-NMR-Spektren des Peptids *v3ct21*.

Oben: STD-Spektrum der ligandfreien Parentalliposomenlösung. Darunter: STDD-Spektren mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids **v3ct21** in der Parentalliposomenlösung (LUV-EDTA-Puffer, 285 K, 700 MHz). Mit zunehmender Peptidkonzentration werden intensivere STD-NMR-Signale des Peptids erhalten, die auf eine unspezifische Wechselwirkung mit den Parentalliposomen zurückzuführen sind. Die negativen Signale, deren Intensität mit steigender Ligandkonzentration abnimmt, werden durch die Interaktion von Membranfragmenten mit den Parentalliposomen hervorgerufen. Diese Interaktion konkurriert mit der Peptid-Liposomen-Wechselwirkung. Es wurden keine Hinweise auf eine spezifische Interaktion des Peptids **v3ct21** mit den Parentalliposomen erhalten.

Dies lässt sich durch das Vorliegen von Membranfragmenten in der Liposomensuspension erklären. Die vorhandenen Membranfragmente wechselwirken unspezifisch mit den Parentalliposomen und verhindern somit eine Interaktion der Vesikel mit dem Peptid. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter je weniger Peptid vorhanden ist. Es können dann weniger Ligandmoleküle mit den Membranfragmenten um die Interaktion mit dem Liposomen konkurrieren. Ein höherer Ligandüberschuss verringert den Effekt der Fragment-Liposomen-Wechselwirkung.

Die positiven Signale im Bereich der α -Protonen (4.5 – 3.5 ppm) sowie der aromatischen Protonen (7.0 – 6.5 ppm) sind erst bei höheren Ligandüberschüssen zu beobachten und lassen sich mathematisch an kein Bindungsmodell anpassen. Dies deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung der Parentalliposomen mit dem Peptid **v3ct21** hin.

Die STD-NMR Signale des Peptids **v3ct21** in Interaktion mit CCR5-tragenden Liposomen (Kapitel 4.6.2.1) werden somit von einer spezifischen Interaktion hervorgerufen.

4.6.2.3 *STD-NMR-Experimente der Peptide v3o und v3og mit CCR5-Liposomen*

Die NMR-Messungen mit dem Peptid **v3o** und CCR5-tragenden Liposomen wurden mit einer Rezeptorkonzentration von 0.15 μ M und einer maximalen Ligandkonzentration von 133 μ M durchgeführt. Der höchste Ligandüberschuss war 864-fach. Die Rezeptorkonzentration war zunächst höher gewählt (0.5 μ M) worden. Allerdings wurde bei Zugabe eines 864-fachen Ligandüberschusses eine sofortige Aggregation der Liposomen beobachtet. Um dennoch NMR-Experimente mit hohen Ligandüberschüssen durchführen zu können, wurde die Rezeptorkonzentration reduziert. Die NMR-spektroskopischen Parameter wurden anhand einer ligandfreien Liposomenprobe bestimmt und während der gesamten Titrationsreihe beibehalten. Artefakt-Signale des Peptids wurden im Anschluss durch eine Messung mit einer liposomenfreien Peptidprobe bestimmt.

Mittels Kreuztitration wurden Proben mit einem 864-, 721-, 525-, 341-, 244-, 146-, 97.4-, 48.7-, 24.4-, 9.7- und einem 4.8-fachen Ligandüberschuss erhalten.

Es sind lediglich sehr schwache STD-NMR-Signale des Peptids **v3o** zu beobachten (Abbildung 40). Dies kann zum einen durch die sehr niedrige Konzentration der Bindungspartner verursacht werden. Zum anderen ist zu vermuten, dass eine stark reduzierte Bindungskinetik vorliegt, welche ungünstig für STD-NMR-Messungen ist.

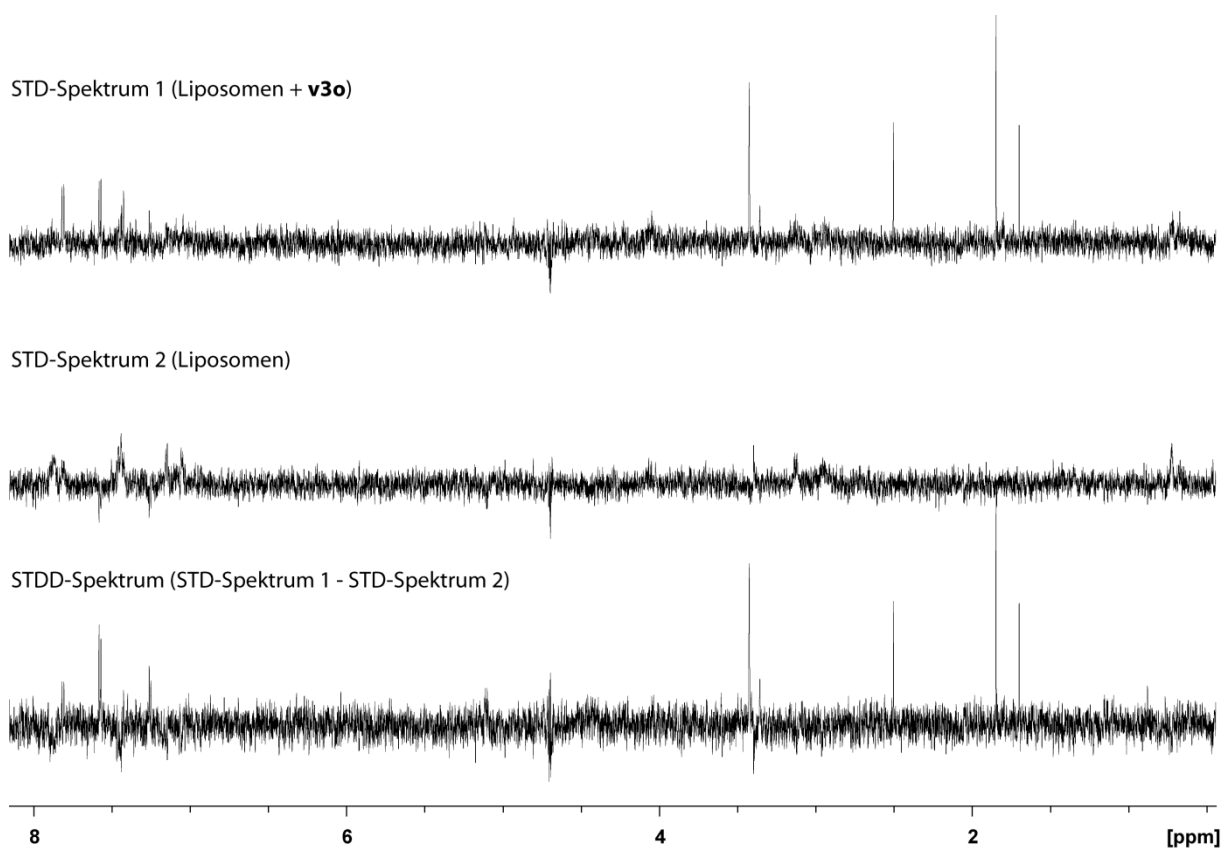


Abbildung 40: STD-NMR-Spektren des Peptids v30.

Oben: STD-Spektrum des Peptids **v30** (111 μM , 721-facher Überschuss) in der Liposomenlösung (0.15 μM). Mitte: STD-Spektrum der ligandfreien Liposomenlösung (0.15 μM). Unten: STDD-Spektrum des Peptids **v30** in der Liposomenlösung, ermittelt aus der Differenz der beiden STD-Spektren. (LUV-EDTA-Puffer, 285 K, 700 MHz). Das Signal-Rausch-Verhältnis war aufgrund der niedrigen Konzentrationen zu gering, um eine Aussage bezüglich der vom Peptid **v30** stammenden STD-NMR-Signalen machen zu können.

Evtl. liegt im Fall von **v30** eine zu langsame *on rate* des Liganden vor, die eine ausreichende Übertragung des STD-Effekts auf das lineare Peptid **v30** verhindert. Mittels SPR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass cyclische V3-Peptide eine deutlich gesteigerte Assoziationsrate im Vergleich zu linearen Peptiden aufweisen.^[130] Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die cyclischen Peptide eine für die CCR5-Bindung besonders günstige Konformation einnehmen.

Es konnte zudem das Auftreten negativer Signale der Liposomen beobachtet werden, deren Intensität mit zunehmender Ligandkonzentration zunächst ansteigt und ab einer Ligandkonzentration von etwa 22.5 μM (146-facher Überschuss) stagniert (Abbildung 41). Dieser Effekt kann ähnlich wie bei dem Peptid **v3ct21** in Interaktion mit den Parentalliposomen durch eine Wechselwirkung der Vesikel mit Membranfragmenten erklärt werden.

In diesem Fall scheint eine zunehmende Peptidkonzentration allerdings dazu zu führen, dass die Liposomen durch gebundene Peptidmoleküle von einer unspezifischen Wechselwirkung

mit Membranfragmenten abgeschirmt werden. Die Interaktion des Peptids mit den CCR5-Liposomen bildet somit eine Barriere, die die Bindung von Membranfragmenten verhindert.

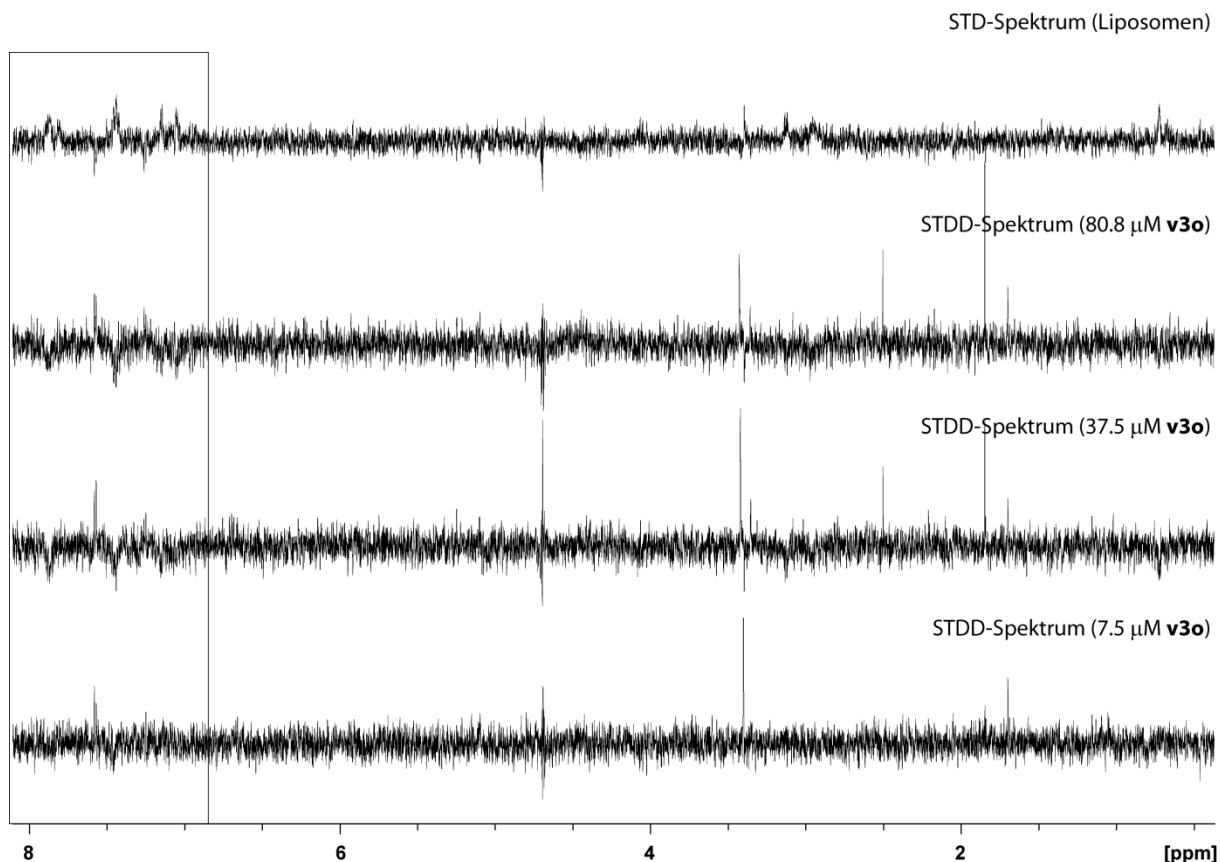


Abbildung 41: STD-NMR-Spektren des Peptids $v3o$.

Oben: STD-Spektrum der ligandfreien Liposomenlösung ($0.15 \mu\text{M}$). Darunter: STDD-Spektren mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids $v3o$ in der Liposomenlösung (LUV-EDTA-Puffer, 285 K , 700 MHz). Es konnte das Auftreten negativer Signale beobachtet werden, deren Intensität zunächst zunimmt und ab einer Ligandkonzentration von etwa $22.5 \mu\text{M}$ stagniert. Dies deutet darauf hin, dass das Peptid $v3o$ die CCR5-Liposomen von einer Interaktion mit Membranfragmenten abschirmt.

Es konnten weder ein Bindungsepitop noch K_D -Werte der Interaktion des Peptids $v3o$ mit dem Corezeptor CCR5 bestimmt werden.

Die NMR-Messungen mit dem Peptid $v3og$ und CCR5-tragenden Liposomen wurden mit einer Rezeptorkonzentration von $0.1 \mu\text{M}$ und einer maximalen Ligandkonzentration von $75 \mu\text{M}$ durchgeführt. Der höchste Ligandüberschuss war 750-fach. Die Rezeptorkonzentration war zunächst höher gewählt ($0.5 \mu\text{M}$) worden. Allerdings wurde bei Zugabe eines 750-fachen Ligandüberschusses eine sofortige Aggregation der Liposomen beobachtet. Um dennoch NMR-Experimente mit hohen Ligandüberschüssen durchführen zu können, wurde die Rezeptorkonzentration reduziert. Die NMR-spektroskopischen Parameter wurden anhand

einer ligandfreien Liposomenprobe bestimmt und während der gesamten Titrationsreihe beibehalten. Artefakt-Signale des Peptids wurden im Anschluss durch eine Messung mit einer liposomenfreien Peptidprobe bestimmt.

Mittels Kreuztitration wurden Proben mit einem 750-, 704-, 92.4-, 46.3-, 23.2-, 9.3- und einem 4.7-fachen Ligandüberschuss erhalten. Da in den STDD-NMR-Spektren bei hohen Ligandüberschüssen keine STD-NMR-Signale des Liganden zu beobachten waren, wurde die Kreuztitration abgebrochen und somit keine Messungen mit mittleren Ligandüberschüssen durchgeführt.

Im Fall des Peptids **v3og** kann ebenfalls eine sehr langsame Bindungskinetik zu einer erschwerten Detektion von STD-NMR-Signalen des Liganden führen. Auch das Glycopeptid **v3og** weist evtl. eine zu langsame *on rate* des Liganden auf, die keine ausreichende Übertragung des STD-Effekts auf den Liganden ermöglicht.

Es konnte erneut das Auftreten negativer Signale der Liposomen beobachtet werden. Die Intensität dieser Signale steigt zunächst mit zunehmender Ligandkonzentration an und nimmt bei höheren Ligandüberschüssen (70.4 μM und 75 μM) wieder ab. Dieser Effekt ist ähnlich zu den beim Peptid **v3o** gemachten Beobachtungen. Auch im Fall des Glycopeptids **v3og** scheint eine steigende Peptidkonzentration dazu zu führen, dass die Liposomen von einer unspezifischen Wechselwirkung mit Membranfragmenten abgeschirmt werden. Die Interaktion von **v3og** mit den CCR5-Liposomen bildet somit eine Blockierung gegen die Bindung von Membranfragmenten.

Es konnten weder ein Bindungsepitop noch K_D -Werte der Interaktion des Glycopeptids **v3og** mit dem Corezeptor CCR5 bestimmt werden.

Um STD-NMR-Studien mit der gesamten V3-Sequenz durchführen zu können, sollten zukünftige Messungen mit einer höheren Rezeptorkonzentration in Kombination mit geringeren Ligandüberschüssen getestet werden. Dies kann eine höhere Empfindlichkeit unter Vermeidung der Ausbildung von Liposomenaggregaten gewährleisten.

Es ist zu vermuten, dass STD-NMR-Untersuchungen mit cyclisierten V3-Peptiden erfolgversprechend sind. Die cyclisierten Peptide sollten durch eine optimale Konformation eine gesteigerte *on rate* gegenüber den offenkettigen Verbindungen aufweisen und so eine Übertragung des STD-Effekts auf die Liganden in ausreichendem Maße ermöglichen.

Eine generelle Diskussion der Ergebnisse der STD-NMR-Untersuchungen befindet sich in Kapitel 4.8.

4.7 SPR-Bindungsstudien

Ergänzend zu den Bindungsstudien mittels STD-NMR wurden die dargestellten Peptide und Glycopeptide mittels SPR-Experimente auf ihre Bindungsaffinität zu CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen untersucht. Die peptidischen Verbindungen wurden jeweils auf einem *CMD 50*-Sensorchip immobilisiert. Diese tragen auf ihrer Goldoberfläche eine carboxymethylierte Dextranschicht mit einer Dicke von 50 nm, was den Zellen eine ausreichende Passierbarkeit innerhalb der Flusszellen (Höhe: 100 μm) gewährleisten sollte.

Die HOS-Zellen wurden in Form unterschiedlich konzentrierter Suspensionen an den Liganden vorbeigeleitet. Dies ermöglicht die Verfolgung des Bindungsereignisses unter annähernd physiologischen Bedingungen in Echtzeit. Alle SPR-Experimente wurden bei 25 °C mit PBS-Puffer als Laufmittel durchgeführt. Es wurden ausschließlich frisch geerntete Zellen für die SPR-Messungen verwendet, um Einflüsse von DMSO-Rückständen des Einfriermediums auf die Änderung des Brechungsindex des Laufmittels auszuschließen. Der Anteil vitaler Zellen betrug mindestens 95 %.

Die Peptide wurden unter Standardbedingungen über den N-Terminus mittels Amidkupplung auf den Sensorchips immobilisiert. Nichtumgesetzte aktivierte Carboxylgruppen der funktionalisierten Dextranschicht wurden blockiert, um unspezifische Interaktionen der Zellen zu minimieren. Die Referenzflusszelle wurde aktiviert und blockiert, so dass Bindungsereignisse, die auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen sind, von den eigentlichen Messkurven abgezogen werden konnten. Injektionen von reinem Laufpuffer ergaben eine zu vernachlässigende Signalantwort von weniger als 3 RU, so dass dieser Einfluss in den Differenzsensorgrammen nicht berücksichtigt wurde.

Alle Messungen wurden über einen Zeitraum von zwölf Minuten bei einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Es wurden Zellkonzentrationen von 36, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen/ μL untersucht, was Rezeptorkonzentrationen von 0.6 nM bis 59.8 nM entspricht. Hierfür wurde wiederum von einer Rezeptordichte von 10^7 Rezeptoren/Zelle ausgegangen, um eine Vergleichbarkeit mit früheren Studien zu ermöglichen. Vorangegangene SPR-Untersuchungen von V3-Peptiden mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen zeigten, dass es von Vorteil ist, die Messungen zunächst mit aufsteigenden Zellkonzentrationen durchzuführen und bei späteren Messungen die Konzentrationen zufällig zu wählen. Dies gewährleistet eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch nach häufigen Injektionen.^[317] Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurde durch eine Mehrfachbestimmung jeder

Konzentration der Zellsuspensionen gezeigt. Die Daten aller Messungen befinden sich im Anhang.

Die Sensorgramme des Glycopeptids **v3cong** sind in Abbildung 42 gezeigt. Bei einer Belegung von 185 fmol lagen die maximalen RU-Werte der Messungen etwa im Bereich zwischen 155 und 400 RU.

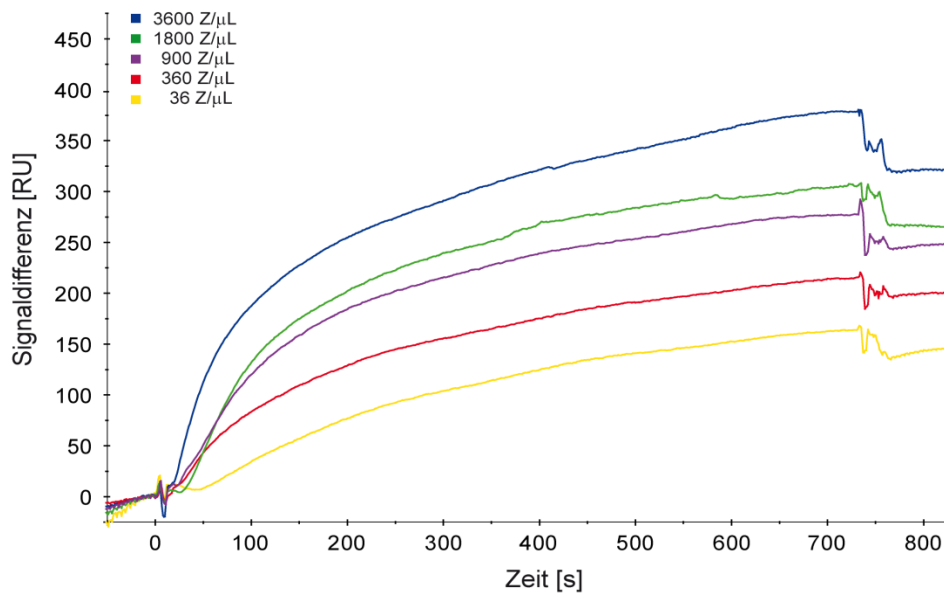


Abbildung 42: Differenzsensorgramme des offenkettigen V3-Glycopeptids *v3cong* in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

In vorangegangenen Studien wurden für ein analoges unglycosyliertes Peptid bei einer vergleichbaren Belegung (176 fmol) maximale RU-Antworten von etwa 180 RU erhalten. Ein verstärkender Einfluss der Glycosyleinheit auf die Wechselwirkung mit dem Corezeptor CCR5 ist daher zu vermuten.^[318]

Die Sensorgramme des Peptids **v3ct15** sind in Abbildung 43 gezeigt. Bei einer Belegung von 272 fmol lagen die maximalen RU-Werte der Messungen etwa im Bereich zwischen 40 und 420 RU.

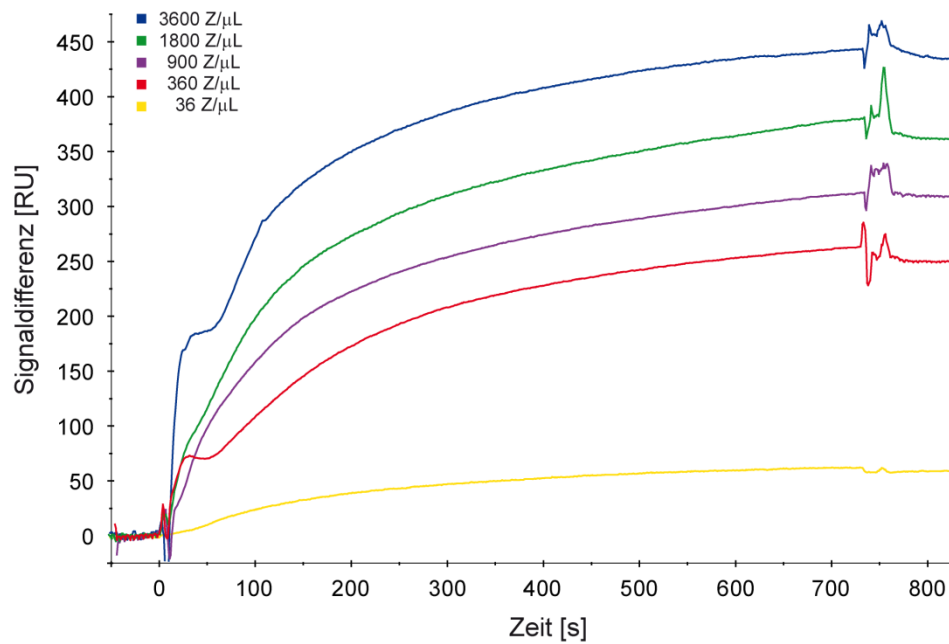


Abbildung 43: Differenzsensorgramme des offenkettigen V3-Peptids *v3ct15* in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Die Sensorgramme des Peptids **v3ct21** sind in Abbildung 44 gezeigt. Bei einer Belegung von 981 fmol lagen die maximalen RU-Werte der Messungen etwa im Bereich zwischen 70 und 380 RU.

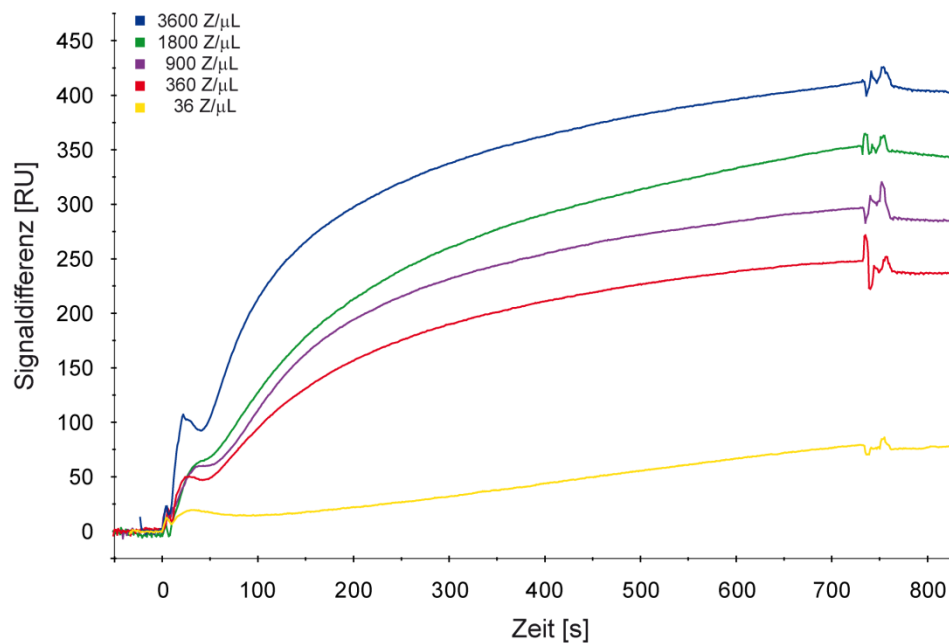


Abbildung 44: Differenzsensorgramme des offenkettigen V3-Peptids *v3ct21* in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Durch die sehr unterschiedliche Belegung der Messchips mit den Peptiden **v3ct15** und **v3ct21** ist ein Vergleich der erhaltenen Signalantworten an dieser Stelle nicht sinnvoll.

Die Sensorgramme des Peptids **v3o** sind in Abbildung 45 gezeigt. Bei einer Belegung von 128 fmol lagen die maximalen RU-Werte der Messungen im Bereich zwischen 40 und 130 RU.

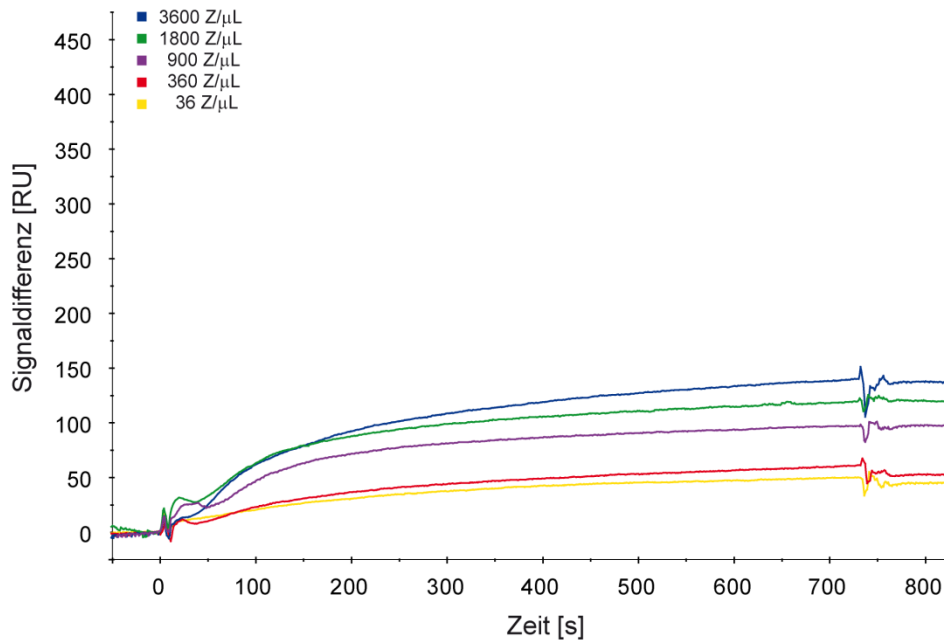


Abbildung 45: Differenzsensorgramme des offenkettigen V3-Peptids *v3o* in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Die Sensorgramme des Glycopeptids **v3og** sind in Abbildung 46 gezeigt. Bei einer Belegung von 115 fmol lagen die maximalen RU-Werte der Messungen im Bereich zwischen 80 und 325 RU.

Diese Sensorgramme des Glycopeptids **v3og** in Interaktion mit dem Corezeptor CCR5 lassen sich durch die ähnliche Belegung gut mit der Messung des entsprechenden unglycosylierten Peptids **v3o** vergleichen. Es wurden deutlich höhere Signalantworten bei der Untersuchung des Glycopeptids erhalten, was einen Hinweis auf eine signifikante Beteiligung der Glycosylstruktur an der Interaktion gibt.

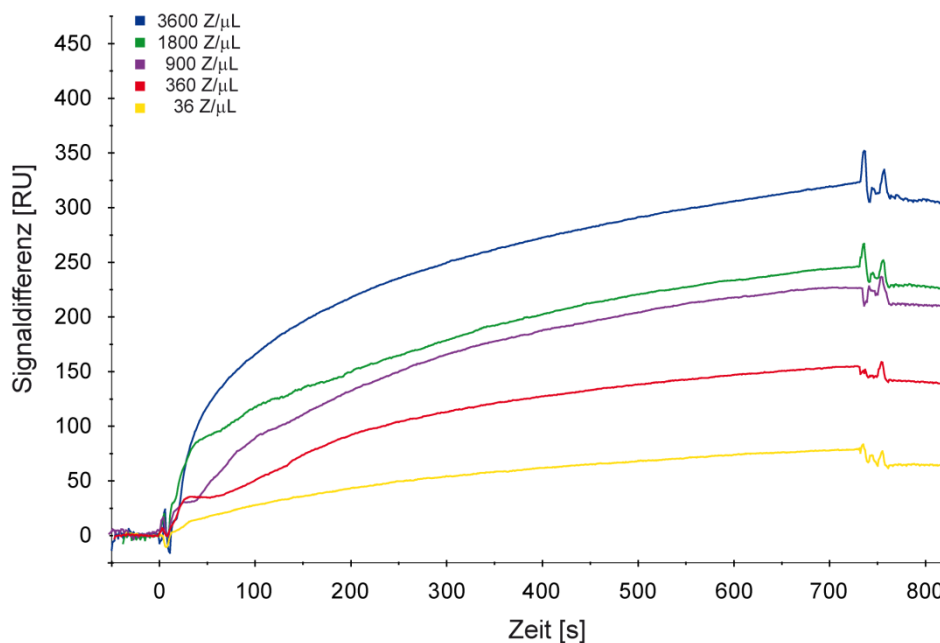


Abbildung 46: Differenzsensorgramme des offenkettigen V3-Glycopeptids *v3og* in Kontakt mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Alle Bindungskurven gehen nach einem anfänglichen Anstieg nach der Injektion in eine Sättigung über. Nach dem Ende der Injektionen wurde mindestens zwei Minuten gewartet, wobei jeweils nur eine geringe Dissoziation zu beobachten war. Danach wurde eine vollständige Dissoziation der Zellen von der Chipoberfläche in Abhängigkeit von der Zellkonzentration durch ein- bis vierminütige Regenerationspulse mit SDS (1.7 mM) herbeigeführt.

Um die Spezifität der Interaktion der Peptide an den CCR5-Rezeptor nachzuweisen, wurden repräsentativ für alle dargestellten Verbindungen SPR-Experimente des Glycopeptids **v3og** mit Parentalzellen durchgeführt, die keinen Rezeptor trugen. Es wurde hierfür derselbe Messchip verwendet wie bei der zuvor beschriebenen Messung mit CCR5-tragenden Zellen. Die Sensorgramme dieser Messungen sind in Abbildung 47 gezeigt. Die maximalen Signalantworten lagen alle unter 50 RU.

Vergleicht man die Sensorgramme mit den Sensorgrammen der Messungen des Glycopeptids **v3og** mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen (Abbildung 46), ist eindeutig die deutlich geringere Affinität der rezeptorfreien Parentalzellen zu erkennen. Es konnte keine Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion festgestellt werden. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich bei den Untersuchungen mit CCR5-tragenden Zellen um rezeptorspezifische Bindungsereignisse mit den V3-Peptiden handelt.

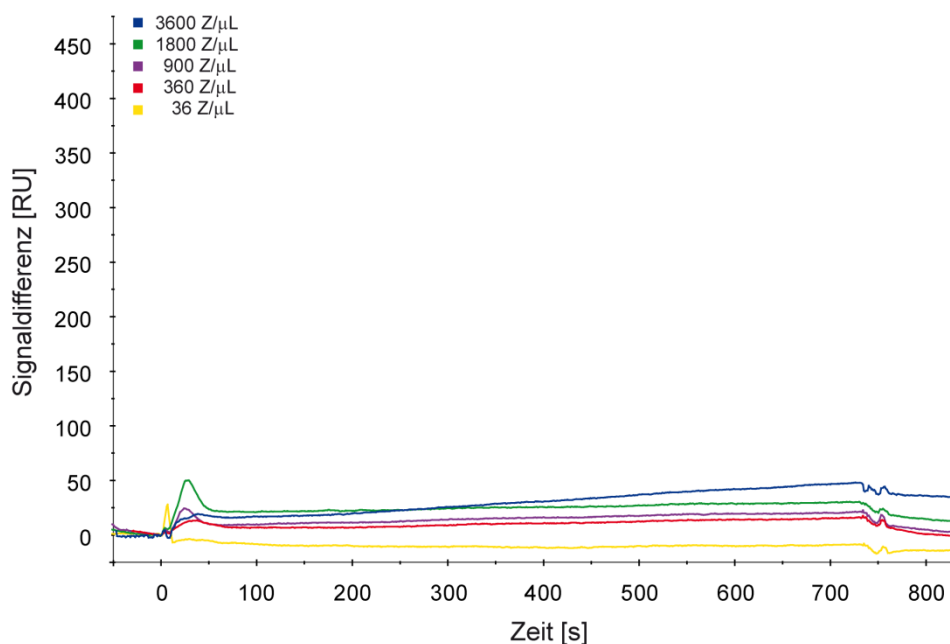


Abbildung 47: Differenzsensorgramme des offenkettigen V3-Glycopeptids v3og in Kontakt mit HOS-Parentalzellen.

Obwohl es sich bei den Zellen mit einem Durchmesser von etwa 15 - 20 μm um Bindungspartner mit einer großen Masse handelt, die hohe Signalantworten erwarten lassen, wurden lediglich maximale RU-Antworten von etwa 400 RU beobachtet. Hierbei spielen zwei Faktoren eine Rolle. Zum einen werden die Zellen aufgrund ihrer Größe vom evaneszierenden Feld nicht erreicht und können somit nicht zu einer Massenzunahme in der Nähe der Chipoberfläche beitragen. Zum anderen befindet sich der Großteil der immobilisierten Peptide innerhalb der Dextranmatrix und steht daher für ein Bindungsereignis mit den Zellen nicht zur Verfügung.

Die Immobilisierung der einzelnen Peptide gelang nicht gleichmäßig. Daher wurden die RU-Werte der Belegung auf 100 fmol normiert, um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu vereinfachen. Alle ermittelten RU-Werte kurz vor Ende der Zellinjektionen wurden ebenfalls entsprechend normiert.

Die Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche wurde nicht genau bestimmt und variiert zudem von Zelle zu Zelle.^[293] Daher war die genaue Bestimmung von K_D -Werten nicht möglich. Die ermittelten K_D -Werte basieren auf einer Rezeptorkonzentration von 10^7 Rezeptoren/Zelle und sind daher nicht als absolut zu betrachten, sondern dienen an dieser Stelle einer Abschätzung der Werte untereinander.

Alle Peptide zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion mit CCR5-tragenden HOS-Zellen. Daher wurde eine mathematischen Anpassung an das *one site binding*-Modell

(Gleichung 5, Kapitel 2.4) durchgeführt. Die Auftragung der normierten Gleichgewichtswerte der einzelnen Messkurven gegen die angenommene Rezeptorkonzentration ist in Abbildung 48 dargestellt.

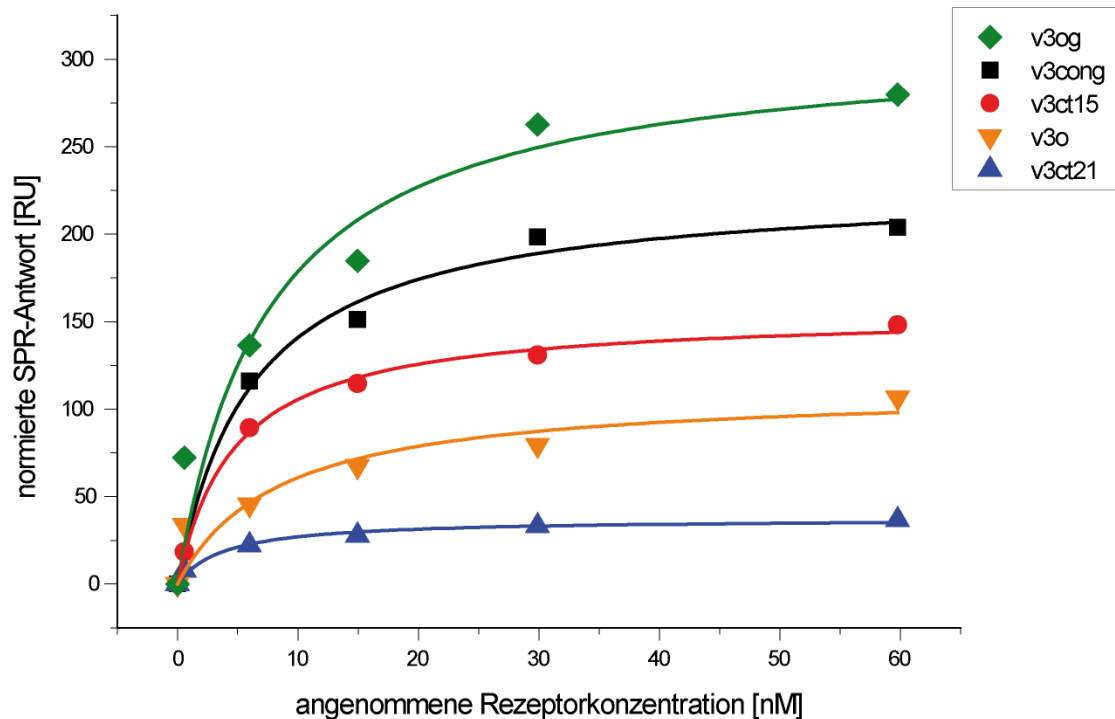


Abbildung 48: Übersicht über die Bindungsaffinitäten der Peptide in Interaktion mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen.

Es ist eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion der Peptide und Glycopeptide mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen zu erkennen. Den Anpassungskurven liegt das *one site binding*-Modell zugrunde ($RU = (RU_{\max} \cdot c_{\text{Zellen}})/(K + c_{\text{Zellen}})$). Die gemessenen RU-Werte wurden auf 100 fmol Belegung normiert, da die Belegung der Sensorchips mit den Peptiden ungleichmäßig gelang.

Die ermittelten K_D -Werte sowie die berechneten Werte für RU_{\max} bei unendlich hoher Rezeptorkonzentration sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Kurvenverläufe lassen sich für alle Peptide gut an das *one site binding*-Modell anpassen. Dennoch deuten die Messpunkte der glycosylierten Peptide **v3cong** und **v3og** darauf hin, dass die Bindung bei Konzentrationen größer als 15 nM evtl. mit einer anderen Kinetik verläuft als bei niedrigeren Konzentrationen. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht, da die berechneten K_D -Werte aufgrund der geringen Dissoziationsrate der Zellen nur eine grobe Näherung bieten.

Tabelle 13: Werte für RU_{\max} und K_D -Werte bei unendlich hoher Rezeptorkonzentration ermittelt per SPR-Analyse.

Peptid	RU_{\max}	K_D [nM]
v3og	311.7 ± 37.6	7.5 ± 3.3
v3cong	228.0 ± 10.6	6.2 ± 1.2
v3ct15	155.2 ± 3.8	4.7 ± 0.5
v3o	111.8 ± 20.8	8.4 ± 5.5
v3ct21	37.4 ± 1.9	3.9 ± 1.0

Die Affinität der Peptide konnte anhand der normierten RU_{\max} -Werte bestimmt werden. Die beiden glycosylierten Peptide zeigten die höchste Affinität gegenüber CCR5. Dabei wies das Glycopeptid **v3og**, welches die gesamte Sequenz des V3-Loops umfasst, eine nochmals gesteigerte Affinität gegenüber dem kürzeren Glycopeptid **v3cong** auf. Die beiden Peptide **v3ct15** und **v3ct21** aus dem C-terminalen Bereich des V3-Loops weisen die niedrigsten K_D -Werte auf.

Die K_D -Werte der SPR-Messungen liegen alle im niedrigen nM-Bereich und damit um etwa den Faktor 10^5 niedriger als die K_D -Werte der STD-NMR-Messungen (Kapitel 4.6.2). Aufgrund dieser Diskrepanz ist anzunehmen, dass es im Verlauf der SPR-Messungen zu Rückbindungseffekten auf der hochbelegten Chipoberfläche kommt und die eigentliche Dissoziationsrate deutlich höher liegt.^[289] Ein weiterer Faktor, der zu den berechneten niedrigen Bindungskonstanten führen kann, ist, dass die Interaktion der Zellen mit den Peptiden vermutlich nicht einem 1:1-Modell entspricht, sondern eine Zelle mit mehreren Rezeptoren an die immobilisierten Peptide bindet. Es ist also eher von einer multivalenten Bindung auszugehen. Aufgrund dieser Hypothese wurde eine mathematische Anpassung an unterschiedliche Bindungsmodelle realisiert, was jedoch keine eindeutigeren Ergebnisse erbrachte. Die Interaktion der V3-Peptide mit CCR5-überexprimierenden Zellen verläuft anscheinend über einen Bindungsmodus, der sich mit berechenbaren Modellen nicht hinreichend beschreiben lässt.

Aufgrund der sehr langsamen Dissoziationsrate (k_{off}) der Zellen ist eine Interpretation der Peptid-CCR5-Interaktion unter Betrachtung der K_D -Werte nicht sinnvoll. Es ist allerdings eine Charakterisierung der Assoziation (k_{on}) durch Anpassung der Sensorgramme an das Modell der Langmuirassoziation möglich. Hierfür wurden jeweils die Sensorgramme der Zellkonzentration 900 Zellen/ μ L verwendet und identische Abschnitte der Assoziation mathematisch an das Modell angepasst (Abbildung 49).

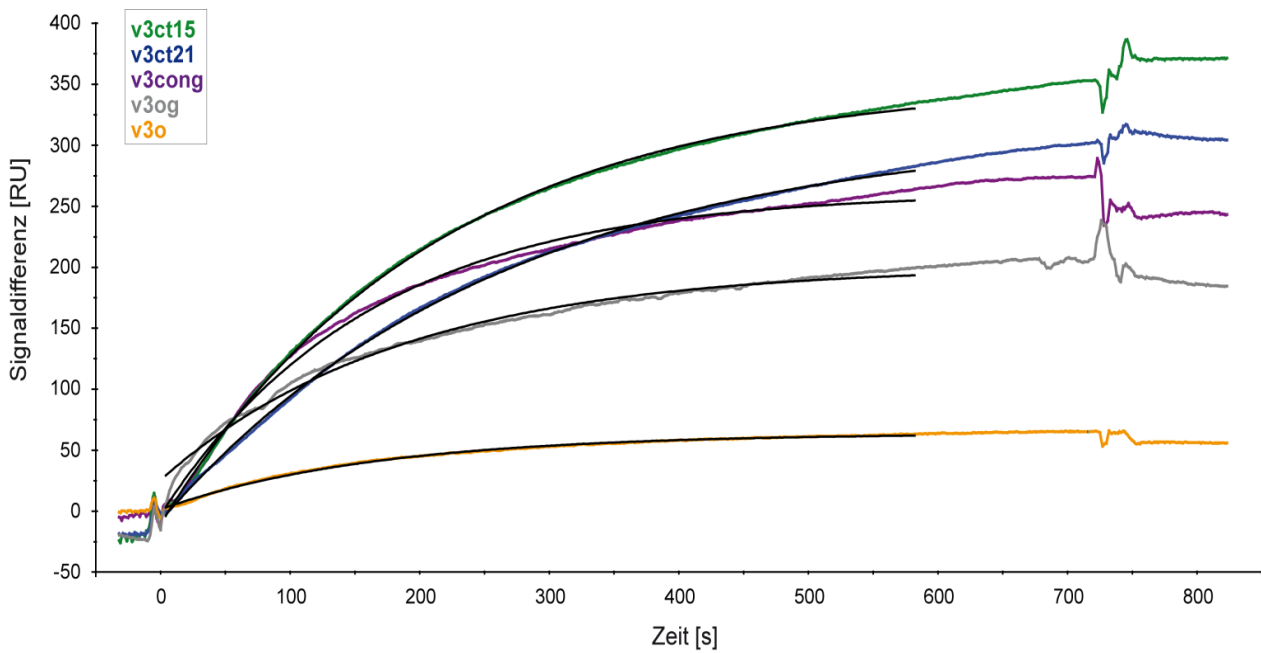


Abbildung 49: Anpassung der Sensorgramme der unterschiedlichen Peptide an das Modell der Langmuirassoziation zur Bestimmung von k_{on} bei einer Zellkonzentration von 900 Zellen/ μL .

In Tabelle 14 sind die berechneten Werte für k_{on} sowie die zugehörigen χ^2 -Werte, welche die Güte der Anpassungskurve angeben, aufgeführt. Hierbei können Anpassungen mit χ^2 -Werten kleiner als 10 als vernünftig angesehen werden.^[285]

Tabelle 14: Berechnete k_{on} -Werte nach dem Modell der Langmuirassoziation bei einer Zellkonzentration von 900 Zellen/ μL . Dies entspricht einer abgeschätzten Rezeptorkonzentration von 14.9 nM.

Peptid	k_{on} [1/(M·s)]	χ^2
v3cong	6.29×10^5	2.74
v3og	5.68×10^5	5.96
v3o	5.17×10^5	0.10
v3ct15	3.64×10^5	0.40
v3ct21	2.36×10^5	2.18

Ein Vergleich der k_{on} -Werte zeigt, dass die beiden glycosylierten Peptide **v3cong** und **v3og** die höchsten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation aufweisen. Der berechnete k_{on} -Wert des Peptids **v3o** ist etwas geringer, liegt aber in der gleichen Größenordnung wie der Wert der glycosylierten Peptide. Das frühere Erreichen der Sättigung der glycosylierten Verbindungen sowie des Peptids **v3o** lassen auf eine sehr effektive Bindung mit dem Rezeptor schließen. Die k_{on} -Werte der Peptide **v3ct15** und **v3ct21** aus dem C-terminalen Bereich des V3-Loops sind etwa um den Faktor 2 geringer.

Dies deutet darauf hin, dass Glycopeptide eine schnellere Kinetik als die entsprechenden Peptide aufweisen. Dieser Effekt ist vermutlich auf das Vorhandensein der Glycosylstruktur zurückzuführen. Dies steht in sehr gutem Einklang mit Ergebnissen aus vorangegangenen Arbeiten, die ebenfalls einen entscheidenden Einfluss der V3-Loop-Glycosylierung auf die Bindungskinetik zeigen konnten.^[130,293] Das Peptid **v3o**, das die gesamte Sequenz des V3-Loops umfasst, zeigt ebenfalls eine schnellere Assoziation als die kürzeren C-terminalen Peptide **v3ct15** und **v3ct21**. Das Peptid **v3cong** aus dem N-terminalen Bereich des V3-Loops weist eine um den Faktor 2 bis 3 höhere Assoziationsrate auf als die C-terminalen Peptide. Dies lässt darauf schließen, dass der C-terminale Bereich des V3-Loops eine untergeordnete, wenn auch nicht unbedeutende Rolle, für die Interaktion mit dem CCR5-Corezeptor spielt. Da die Aminosäuren ³¹⁰GPG³¹² hochkonserviert sind, ist zu vermuten, dass dieses *turn*-Motiv an der Spitze des V3-Loops eine Rolle bei der Corezeptor-Bindung spielt. Darauf lassen u. a. vorangegangene Studien schließen, in denen Peptide und Glycopeptide aus dem N-terminalen V3-Bereich, die um die ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Sequenz verlängert waren, mittels SPR untersucht wurden.^[318] Im Vergleich dazu wurden für analoge Verbindungen, in denen dieses Motiv nicht enthalten war, niedrigere SPR-Antworten erhalten.^[317]

Der Einfluss des ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Motivs lässt sich anhand der per SPR-Untersuchungen ermittelten Daten nur schwer einschätzen. Vergleicht man die beiden Peptide **v3ct15** und **v3ct21** miteinander, lässt sich feststellen, dass das Peptid **v3ct15** eine um den Faktor 5 höhere Affinität ($RU_{\max} = 155.2 \pm 3.8$) gegenüber dem Peptid **v3ct21** ($RU_{\max} = 37.4 \pm 1.9$) aufweist. Dies lässt sich mit der Ausbildung eines *turns* im Bereich des ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Motivs am aminoterminalen Ende des Peptids erklären. Das Peptid ist über den N-Terminus an der Dextranmatrix immobilisiert, was in diesem Fall dazu führen kann, dass das Peptid **v3ct21** trotz deutlich höherer Belegung schlechter an der Sensorchipoberfläche präsentiert wird. Die Werte für k_{on} sowie K_D sind für beide Verbindungen vergleichbar.

Die k_{on} -Werte basieren ebenso wie die berechneten K_D -Werte auf einer Rezeptorkonzentration von 10^7 Rezeptoren/Zelle. Die Werte werden durch die bereits erwähnten *rebinding*-Effekte und die variable Rezeptordichte auf den Zellen beeinflusst. Es können außerdem nur die Rezeptoren binden, die sich auf der dem Messchip zugewandten Zellseite befinden. Auch ist eine Aggregation der HOS-Zellen innerhalb der Flusszellen trotz sorgfältiger Suspendierung vor jeder Injektion, besonders bei hohen Zellkonzentrationen, nicht unwahrscheinlich. Die Scherkräfte innerhalb der Flusszellen können zu einer Zerstörung der Zellen führen, so dass einzelne Membranfragmente zu einem Bindungsereignis beitragen können.

Bei den ermittelten Zahlenwerten handelt es sich somit um relative Werte, die zur Abschätzung der Bindungseigenschaften der Peptide untereinander bzw. dem Vergleich mit vorangegangenen Studien dienen.

4.8 Generelle Diskussion der Ergebnisse der Bindungsstudien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Analysemethoden (SPR, STD-NMR) zur Charakterisierung der Interaktion von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 GP120 angewendet. Die Ergebnisse werden an dieser Stelle miteinander sowie mit Resultaten aus vorangegangenen Studien verglichen.

Die Analysen mittels SPR erlauben eine gute Abschätzung der Bindungsaffinitäten und der Assoziationskinetik der untersuchten Verbindungen untereinander. Es konnten Erkenntnisse aus vorangegangenen SPR-Studien von V3-Peptiden in Interaktion mit dem Corezeptor CCR5 unterstützt werden. Diese zeigten eine signifikante Steigerung sowohl der Affinität als auch der Geschwindigkeit der Assoziation bedingt durch die Glycosyleinheit an Asparagin 301.

Die entscheidende Rolle der Komplex-Typ-Glycosylierung an Asn301 ist bereits in der Literatur beschrieben worden.^[319,320] Dies konnte durch Untersuchungen des N-terminalen V3-Bereichs von B. Hünnefeld mittels STD-NMR mit dem Peptid ²⁹⁶STRPNNNTRKSIHI³⁰⁹ sowie dem entsprechenden Glycopeptid, das an Asn301 eine Chitobiosyleinheit trug, untermauert werden. Dieser signifikante Einfluss des Glycans wurde bei den SPR-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet. Dabei zeigte das glycosylierte Peptid **v3og**, das die gesamte V3-Sequenz beinhaltet, eine nochmals gesteigerte Affinität gegenüber dem verkürzten Glycopeptid **v3cong**. Eine nochmalige Steigerung der Affinität ließ sich in vorangegangenen Arbeiten durch einen synergetischen Effekt, verursacht durch eine Kombination aus Cyclisierung und Glycosylierung, erreichen.^[130] Die Cyclisierung unterstützt anscheinend die korrekte Präsentation der Glycosylstruktur für die Corezeptorbindung.

Die SPR-Untersuchung der C-terminalen Peptide **v3ct15** und **v3ct21** zeigten sowohl geringere Affinitäten als auch geringere Assoziationsraten im Vergleich mit den übrigen Peptiden. Dies deutet darauf hin, dass der C-terminale Bereich des V3-Loops eine untergeordnetere, wenn auch nicht unbedeutende, Rolle für die Interaktion mit dem CCR5-Corezeptor spielt. Studien von Nolan *et al.* geben ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung dieses Bereichs an der CCR5-Interaktion. Es wurden hierfür Deletions- und

Alaninsubstitutionsstudien des V3-Loops durchgeführt. Mittels Zell-Zell-Fusions-Assays konnte gezeigt werden, dass u. a. der Bereich von Position 321 bis 328 für die CCR5-Corezeptor-Bindung relevant ist.^[321]

Die Untersuchungen der C-terminalen Peptide **v3ct15** und **v3ct21** mittels STD-NMR zeigten, dass sich das Epitop der CCR5-Bindung jeweils über die gesamte Peptidsequenz erstreckt, wobei nicht alle Signale zugeordnet werden konnten. Abbildung 50 zeigt schematisch, welche Aminosäuren an der Interaktion mit dem Corezeptor beteiligt sind.

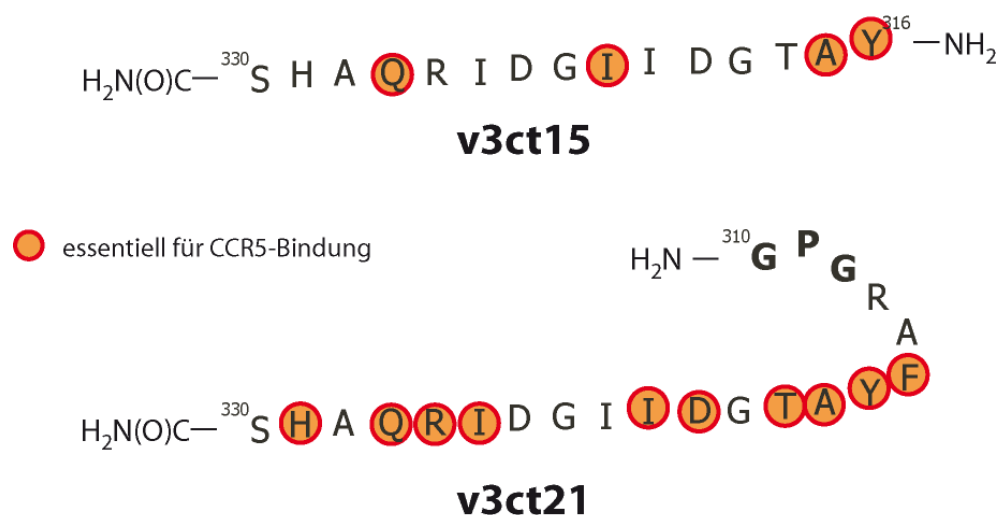


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Beteiligung einzelner Aminosäuren der Peptide **v3ct15** und **v3ct21** an der V3-CCR5-Interaktion, die per STD-NMR ermittelt wurde.

Die rot eingekreisten Aminosäuren zeigten per STD-NMR-Untersuchungen eine Beteiligung an der Interaktion mit CCR5. Es wurden nur die Aminosäuren berücksichtigt, für die ein absoluter STD-Effekt > 0.8 % ermittelt wurde.

Im Vergleich der beiden Epitope kann übereinstimmend für die beiden Peptide **v3ct15** und **v3ct21** festgehalten werden, dass die Aminosäuren Tyr316, Ala317 sowie Gln327 aus dem C-terminalen V3-Bereich an der Interaktion mit CCR5 beteiligt sind.

Die ermittelten K_D -Werte liegen jeweils in einer ähnlichen Größenordnung und lassen sich in Werte größer als 500 μ M und kleiner als 500 μ M einteilen. Die Anwesenheit des ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Motivs scheint dabei keinen signifikanten Einfluss auf den Bindungsmodus zu haben. Vorangegangene Mutationsstudien und Analysen mittels SPR ließen nicht auf einen essenziellen Einfluss der Aminosäuren Ala317 und Gln327 schließen. Diese Studien wurden jedoch mit cyclischen Peptiden und Glycopeptiden, die die gesamte Sequenz des V3-Loops umfassen, vorgenommen.^[129]

Suphaphiphat *et al.* führten eine systematische Mutationsanalyse des CCR5-Bindungsepitops im GP120 des HIV-1 Subtyps C durch.^[322] Im Rahmen dieser Studie wurden jeweils die Aminosäuren Thr297 bis His329 des V3-Loops sowie einige Aminosäuren aus dem C4-Bereich des GP120 durch Alanin ersetzt. Das Asparagin 301 lag unglycosyliert vor. Mit unterschiedlichen Assays wurden die Auswirkungen der Mutationen auf das Zell-Zell-Fusionsvermögen, die CCR5-Bindung und die virale Infektiosität untersucht. An zwei Positionen unterschieden sich die untersuchten Sequenzen von denen dieser Arbeit (Position 317 A↔T, Position 320 D↔E). Es konnte mit allen durchgeführten Assays übereinstimmend festgestellt werden, dass Mutationen im V3-stem-Bereich (Positionen 297 bis 305 und Positionen 321 bis 329) signifikantere Auswirkungen haben als Mutationen im crown-Bereich (Positionen 306 bis 320). Die Aminosäuren ³²¹IIGD³²⁴ und Arg326 wiesen in allen drei Assays einen großen Einfluss auf. Ile325 wiederum zeigte bei der CCR5-Bindung einen etwas schwächeren Effekt. Gln327 und Ala328 ließen hingegen nur bei der viralen Infektiosität und His329 nur bei der CCR5-Bindung einen signifikanten Effekt erkennen. Zusätzlich konnte für die Aminosäuren ³¹¹PGR³¹³ eine Auswirkung auf die CCR5-Bindung bzw. für Tyr316 auf die virale Infektiosität beobachtet werden.

Dies steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen der STD-NMR-Experimente der vorliegenden Arbeit. Hier konnte übereinstimmend für die beiden Peptide **v3ct15** und **v3ct21** ebenfalls gezeigt werden, dass die Aminosäuren Tyr316, Ala317 sowie Gln327 aus dem C-terminalen V3-Bereich an der Interaktion mit CCR5 beteiligt sind. Lediglich für die Position 317 konnte keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Suphaphiphat *et al.* gezeigt werden. Übereinstimmend konnte jedoch ein generell relevanter Einfluss des C-terminalen V3-Bereichs auf die Corezeptorbindung nachgewiesen werden.

4.9 *In silico* Untersuchungen der V3-CCR5-Wechselwirkung

Basierend auf der Röntgenkristallstruktur des HIV-1 GP120 von Huang *et al.* (Kapitel 1.5.2) wurde in der Arbeitsgruppe B. Meyer mittels *docking* eine dreidimensionale *in silico*-Struktur des CCR5-Rezeptors in Interaktion mit dem V3-Loop berechnet. Die 3D-Struktur des CCR5 wurde über ein Homologiemodell der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin, das zum Zeitpunkt der Erstellung des Modells als einzige Kristallstruktur eines GPCRs vorlag, erstellt.^[323,324] Die Homologie zwischen Rhodopsin und CCR5 beträgt allerdings lediglich 28 %. Das Modell beinhaltet die Darstellung einer T-Zellmembran mit dem membrangebun-

denen CD4-Rezeptor sowie dem transmembranständigen Corezeptor CCR5 in Interaktion mit dem GP120. Die Sequenz des V3-Loops des GP120 resultiert aus der Sequenzdatenbankanalyse von J. Dojahn (Kapitel 1.5.2.1).^[129] Ergebnisse vorangegangener Arbeiten deuteten auf eine Wechselwirkung von drei Aminosäurepositionen (Arg298, Arg304, Lys305) des V3-Loops mit drei sulfatierten Tyrosinen aus dem N-terminalen Bereich des CCR5 hin.^[323,325,326] Diese Interaktionen dienten u. a. als Grundlage für das *in silico*-Modell.

Abbildung 51 zeigt die *in silico*-Darstellung des viralen *entries*. Es ist die Wirtszellmembran dargestellt, in der der CD4-Rezeptor und der CCR5-Corezeptor verankert sind.

Der CD4-Rezeptor tritt mit dem GP120 des HIV-1 über ein diskontinuierliches Epitop in Kontakt. Die anschließende Konformationsänderung im GP120 ermöglicht die Wechselwirkung des Glycoproteins mit dem humanen Corezeptor CCR5.

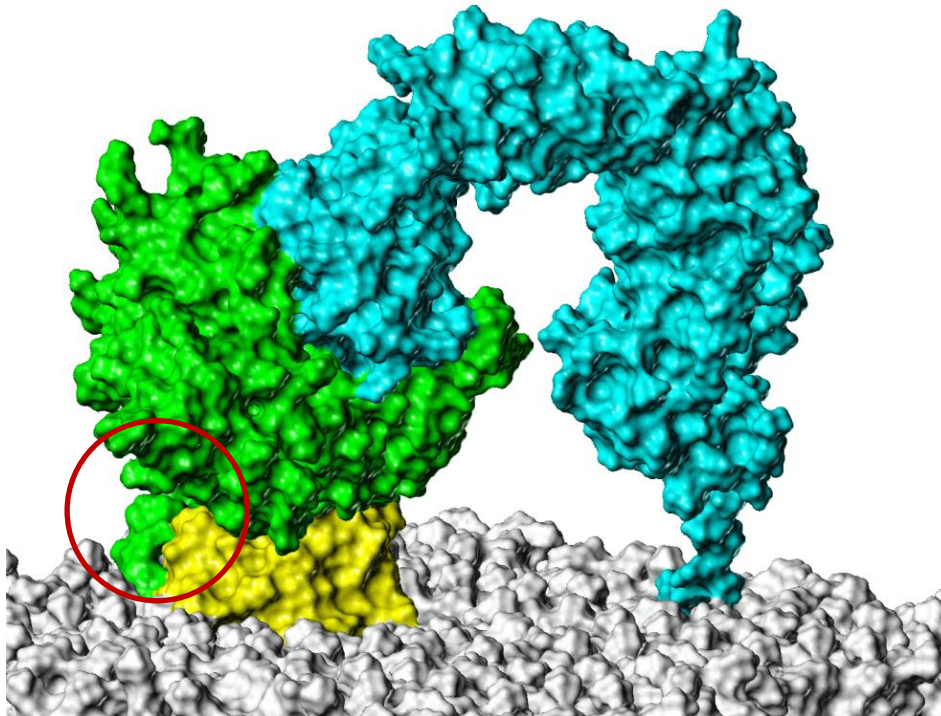


Abbildung 51: *In silico*-Modell des viralen *entries*.

In der Wirtszellmembran (grau) ist der CD4-Rezeptor (blau) verankert. Dieser interagiert mit Epitopen des viralen GP120 (grün). Die dadurch induzierte Konformationsänderung ermöglicht die Interaktion von GP120 mit dem Corezeptor CCR5 (gelb). Der rote Kreis markiert einen Teil der Glycosylstruktur des V3-Loops des GP120, der maßgeblich an der Corezeptorbindung beteiligt ist.

Eine detailliertere Darstellung der Interaktion zwischen dem viralen GP120 und dem humanen Corezeptor CCR5 zeigt Abbildung 52. Der CD4-Rezeptor und die Wirtszellmembran wurden in dieser Darstellung ausgeblendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass der V3-Loop aus dem GP120 herausragt. Dadurch ist dem Loop und insbesondere der Komplex-

Typ-Glycosylstruktur an Position 301 eine optimale Wechselwirkung mit dem Rezeptormolekül möglich.

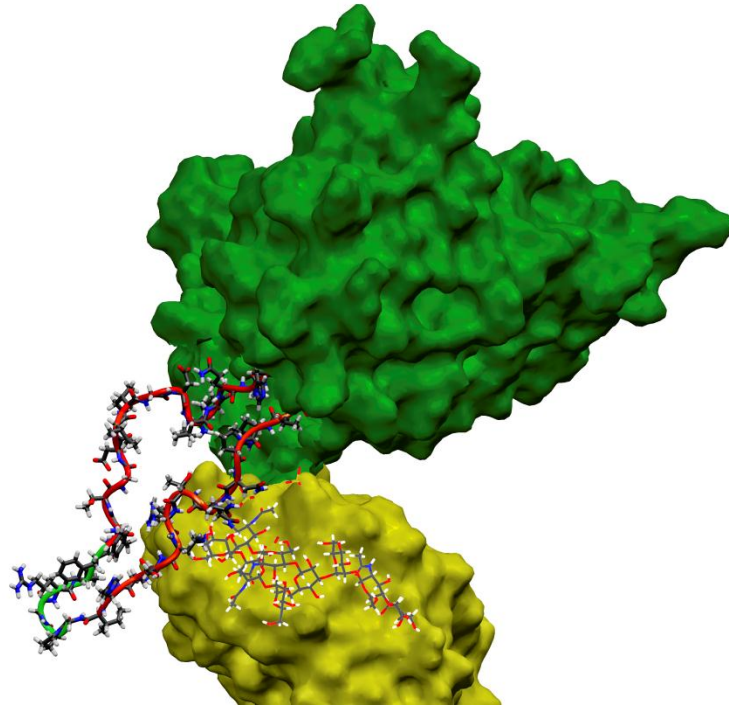


Abbildung 52: *In silico*-Darstellung des GP120/CCR5-Komplexes.

Die Darstellung zeigt detailliert die Interaktion des viralen GP120 (grün) mit dem humanen Corezeptor CCR5 (gelb). Die untere Begrenzung der Abbildung markiert in etwa die Verankerung des CCR5-Corezeptors in der Wirtszellmembran. Die Abbildung zeigt eine Ansicht der GP120-CCR5-Interaktion, die gegenüber der Abbildung 51 um 180° um die y-Achse gedreht ist. Der V3-Loop mit der Komplex-Typ-Glycosylierung ist als *capped sticks*-Darstellung hervorgehoben. Das ³¹⁰GPGRAF³¹⁵-Motiv ist farbig von der übrigen V3-Sequenz abgesetzt.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Wechselwirkung mit dem Corezeptor zu einem großen Maße über die Aminosäuren des N-terminalen V3-Bereichs, in dem sich die Glycosylierung befindet, erfolgt. Die *turn*-Struktur an der Spitze des Loops, die von den Aminosäuren ³¹⁰GPGRAF³¹⁵ ausgebildet wird, steht in größerem räumlichen Abstand zur Rezeptoroberfläche ebenso wie der überwiegende Teil des C-terminalen Sequenzabschnittes des Loops.

In Abbildung 53 wurde die Interaktion zwischen dem V3-Loop und dem Corezeptor auf eine minimale Darstellung reduziert. Das virale GP120 ist bis auf den V3-Loop ausgeblendet. Vom *N*-Glycan an Position 301 des V3-Loops sind nur die beiden ersten *N*-Acetylglucosamineinheiten als Minimalmotiv dargestellt.

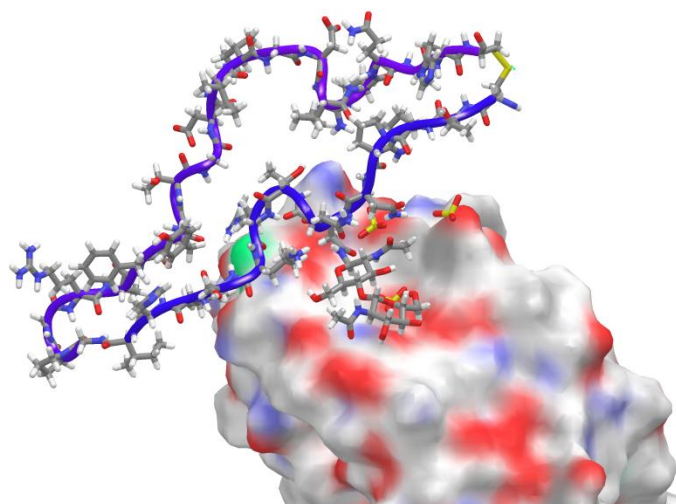


Abbildung 53: *In silico*-Darstellung der V3-CCR5-Interaktion.

Die Darstellung zeigt die Interaktion des V3-Loops des viralen GP120 (*capped sticks*) mit dem humanen Corezeptor CCR5. Die Einfärbung des Corezeptormoleküls erfolgte nach Atomtyp (weiß: Wasserstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, grün: Schwefel). Aus der Rezeptoroberfläche ragen die Sulfatgruppen der Tyrosine 3, 10 und 14 heraus. Die untere Begrenzung der Abbildung markiert in etwa die Verankerung des CCR5-Corezeptors in der Wirtszellmembran.

In dieser Darstellung ist sehr gut zu erkennen, dass die Aminosäuren ²⁹⁸RPNNNTRKSI³⁰⁷ aus dem N-terminalen V3-Bereich die größte Nähe zum Rezeptor aufweisen. Innerhalb dieses Sequenzabschnittes befinden sich die positiv geladenen Aminosäuren Arg298, Arg304 und Lys305, die mit den sulfatierten Tyrosinen 3, 10 und 14 aus dem N-terminalen Bereich des CCR5 interagieren. Die Seitenketten von Tyr316, Ala317 sowie Ile325 aus dem C-terminalen V3-Bereich tragen ebenfalls zur Corezeptorbindung bei.

Mithilfe des *in silico*-Modells lassen sich die Abstände r zwischen Protonen des V3-Loops und dem CCR5-Corezeptor bestimmen. Um die berechneten Abstände mit den experimentell ermittelten STD-NMR-Daten vergleichen zu können, wurden die Abstände über die Beziehung $1/r^6$ in theoretische STD-Prozentwerte umgerechnet. Die Bestimmung der Abstände wurde mit dem Programm *Maestro 9.1* durchgeführt. Dabei wurden alle Abstände von Protonen des V3-Loops berücksichtigt, die innerhalb eines Radius von 6 Å zum CCR5-Corezeptor liegen. Wies ein Proton des V3-Loops mehrere Kontakte zum Rezeptor auf, wurden diese Abstände gemittelt, da der STD-Effekt aus der räumlichen Nähe zu unterschiedlichen Protonen des Makromoleküls resultieren kann. Die Abstände chemisch äquivalenter Protonen des V3-Loops wurden ebenfalls gemittelt. Um die freie Rotation der Protonen von Methylgruppen in die Berechnung miteinzubeziehen, wurde hier nur der jeweils kürzeste Abstand berücksichtigt.

Im C-terminalen Bereich des V3-Loops sind nur wenige Kontakte zum Corezeptor zu finden. Diese beschränken sich auf die Aminosäuren Tyr316, Ala317 und Ile325. In Tabelle 15 sind die ermittelten Abstände sowie die daraus berechneten theoretischen STD-Prozente den experimentellen Daten gegenübergestellt. Es wurde hierbei eine Differenzierung zwischen den STD-NMR-Daten des Peptids **v3ct15** und **v3ct21** gemacht.

Tabelle 15: Theoretische STD-Prozent des C-terminalen Bereichs des V3-Loops mit CCR5.

	Abstand r [Å]	$1/r^6$ [$\cdot 10^{-5} \text{ Å}^{-6}$]	theor. STD-%	relative STD-% (NMR)	
				v3ct15	v3ct21
H β , Tyr316	5.851	2.49	19.8 %		23.4 %
H α , Ala317	4.842	7.77	61.6 %	54.2 %	43.5 %
H β , Ala317	4.778	8.41	66.7 %	1.5 %	
H β , Ile325	4.518	11.77	93.4 %		30.2 %
H γ , Ile325	5.308	4.47	35.5 %	20.3 %	7.3 %
H γ' , Ile325	5.378	4.13	32.8 %	5.6 %	

Für alle mittels *in silico*-Modell ermittelten Kontakte konnte eine Interaktion mit dem Corezeptor per STD-NMR beobachtet werden. Die berechneten und experimentell ermittelten Werte für Tyr316 (H β) und Ala317 (H α) stimmen gut überein. Größere Unterschiede ergeben sich bei den übrigen in Tabelle 15 angegebenen Protonen. Dennoch deuten die Ergebnisse beider Methoden auf eine Beteiligung von Ile325 an der Interaktion mit dem Corezeptor hin. Die sehr hohen experimentell bestimmten STD-Prozentwerte der δ -Protonen von Tyr316 und die deutlich niedrigeren STD-Prozente der ϵ -Protonen des Aromaten (Kapitel 4.6.2.1) deuten auf einen *edge on*-Kontakt mit dem Corezeptor hin. Dies konnte anhand des *in silico*-Modells nicht bestätigt werden. Anhand des Modells ist eher ein *side on*-Kontakt unter Beteiligung der δ -Protonen der aromatischen Seitenkette zu vermuten.

Die experimentellen STD-Prozente der Verbindungen **v3ct15** und **v3ct21** liegen über die gesamte Peptidsequenz verteilt vor (Kapitel 4.6.2.1). Anhand der Messungen lässt sich eine Beteiligung der Aminosäuren Gly312, Arg313, Phe315, Thr318, Asp320/324, Ile321/322, Arg326, Gln327 und Pro329 aus dem C-terminalen Bereich des V3-Loops an der Interaktion vermuten, die nicht durch das *in silico*-Modell wiedergegeben werden. Die Streuung des Epitops über die gesamte Sequenz der Peptide ist damit zu erklären, dass es durch die verkürzte Form zu einer deutlich abweichenden Sekundärstruktur der Peptide gegenüber der dreidimensionalen Struktur des gesamten V3-Loops kommt. Dies konnte durch die

konformativen Untersuchungen der Peptide mittels NOESY-NMR-Experimente eindeutig bestätigt werden (Kapitel 4.4). Die verkürzten C-terminalen Peptide liegen in einer α -helicalen Konformation vor, die in der Struktur der Peptide **v3o** und **v3og**, welche die gesamte Sequenz des V3-Loops beinhalten, nicht zu beobachten war.

Deutlich mehr Kontakte zum CCR5-Corezeptor liegen im N-terminalen Bereich des V3-Loops vor. Es wurde daher ein Vergleich zwischen dem *in silico*-Modell und den von B. Hünnefeld mittels STD-NMR-Messungen des Glycopeptids $^{296}\text{STRPNN}\underline{\text{N}}\text{NTRKSIHI}^{309}$ ermittelten Kontakten vorgenommen. Das Peptid trägt an Position 301 einen Chitobiosyl-asparagin-Baustein. Die relativen STD-Prozentwerte der NMR-Messungen waren mittels 1D- ^1H -STD-NMR- sowie 2D-STD HSQC-NMR-Experimenten bestimmt worden. In Tabelle 16 sind die Kontakte aufgelistet, für die von B. Hünnefeld per NMR STD-Prozente ermittelt werden konnten.^[274]

Aus dem *in silico*-Modell lässt sich entnehmen, dass alle Aminosäuren des Sequenzabschnitts $^{298}\text{RPN}\underline{\text{N}}\text{NTRKSI}^{307}$ für die Interaktion verantwortlich sind. Außerdem sind beide *N*-Acetylglucosamineinheiten der Chitobiose an Asn301 an der Wechselwirkung beteiligt. Das Modell deutet auf einen größeren Beitrag der zweiten Saccharideinheit hin, was im Widerspruch zu den STD-NMR-Ergebnissen von B. Hünnefeld steht.^[274]

Mittels STD-NMR-Experimente war eine besonders deutliche Beteiligung der Aminosäuren Ser306, Ile307, His308 und Ile309 („SIHI-Motiv“) an der Interaktion mit dem Corezeptor ermittelt worden. Dies kann anhand des *in silico*-Modells nur teilweise unterstützt werden. Interaktionen konnten lediglich für die Aminosäuren Ser306 und Ile307 aus diesem Bereich festgestellt werden. Es ist auch hier zu beachten, dass bei den STD-NMR-Messungen ein verkürztes Peptid verwendet wurde, welches vermutlich eine deutlich abweichende Sekundärstruktur gegenüber der räumlichen Struktur der vollständigen V3-Loop aufweist.

Tabelle 16: Theoretische STD-Prozent des N-terminalen Bereichs des V3-Loops mit CCR5.

	Abstand r [Å]	$1/r^6$ [$\cdot 10^{-5} \text{ Å}^{-6}$]	theor. STD-%	relative STD-% (NMR)	
				STD HSQC	$^1\text{H-STD}$
H β , Asn 301	4.763	8.57	68.0%	49.1 %	
GlcNAc, NHCH $_3$	4.580	10.83	65.0%	6.7 %	95.5 %
GlcNAc $'$, H2	4.771	8.48	50.9%	0.0 %	
GlcNAc $'$, H3	5.131	5.48	32.9%	6.7 %	45.5 %
GlcNAc $'$, H4	4.659	9.78	58.6%	5.5 %	27.3 %
GlcNAc $'$, H5	5.876	2.43	14.6%		36.4 %
GlcNAc $'$, NHCH $_3$	5.614	3.19	19.2%	16.5 %	50.0 %
H β , Thr303	5.073	5.87	46.6%	31.1 %	
H γ , Thr303	5.446	3.84	42.3%	32.3 %	45.5 %
H δ , Arg304	4.683	9.48	75.2%	0.0 %	
H α , Lys305	4.541	11.41	90.6%	0.0 %	
H γ , Lys305	5.047	6.05	48.0%	4.9 %	
H α , Ser306	4.466	12.60	100.0%	40.9 %	
H α , Ile307	5.683	2.97	23.6%	48.2 %	
H β , Ile307	5.019	6.26	49.6%	0.0 %	
H γ , Ile307	5.308	4.47	66.9%	100.0 %	
H γ' , Ile307	5.522	3.53	50.6%	61.0 %	
H δ , Ile307	4.674	9.59	76.1%	50.6 %	

Im N-terminalen Bereich des V3-Loops konnten mithilfe des *in silico*-Modells zahlreiche zusätzliche Kontakte bestimmt werden, die durch ionische Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Diese können mittels STD-NMR-Experimente durch den schnellen H/D-Austausch von Protonen von NH- und OH-Gruppen nicht detektiert werden. Es können daher auch Protonen an der Interaktion mit CCR5 beteiligt sein, die nicht von aliphatischen Proton-Proton-Wechselwirkungen hervorgerufen werden.

Die Beteiligung der Aminosäuren Arg298, Arg304 und Lys305, die über zahlreiche Salzbrücken mit drei sulfatierten Tyrosinen (Tyr3, Tyr10, Tyr14) aus dem N-terminalen Bereich von CCR5 interagieren, wurde von B. Hünnefeld per STD-NMR bestätigt.^[274] Dies erklärt auch den großen Einfluss der Ladung des V3-Loops.^[327-329] Eine größere Anzahl positiv geladener Aminosäuren verstärkt die Bindung an den Corezeptor.^[326]

Abbildung 54 zeigt eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse von SPR-Studien aus vorangegangenen Arbeiten.^[129,130,317,318] Es wurden sowohl Studien mit verkürzten Peptiden als auch mit Peptiden, die die gesamte Sequenz des V3-Loops umfassen, durchgeführt. Es wurden cyclisierte und offenkettige sowie glycosylierte und nichtglycosylierte Verbindungen untersucht. In Abbildung 54 sind jeweils die untersuchten Mutationen der einzelnen Aminosäuren angegeben.

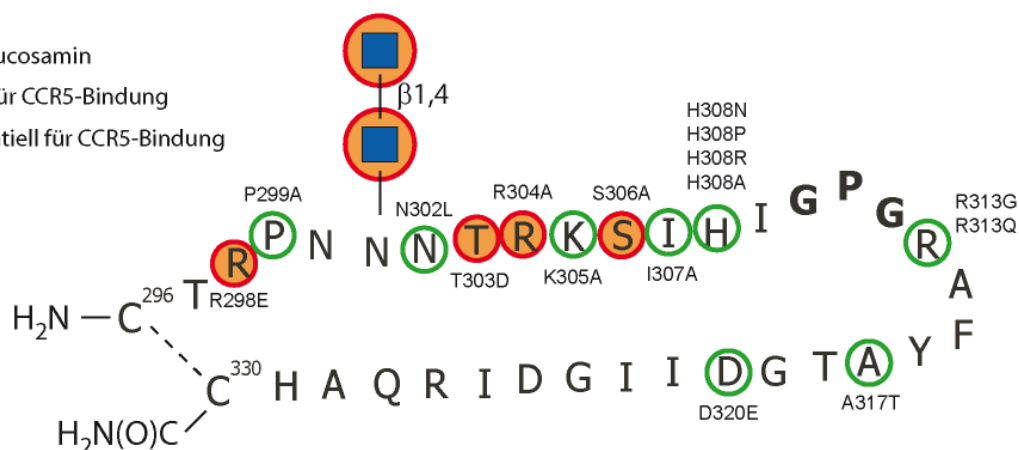


Abbildung 54: Schematische Zusammenfassung von Ergebnissen aus SPR-Studien mit V3-Peptiden.

Rote Kreise markieren Aminosäuren, die einen starken Einfluss auf die Corezeptor-Bindung haben. Grüne Kreise indizieren Aminosäuren, deren Mutationen keine oder nur einen geringen Einfluss auf die Interaktion mit CCR5 haben. Neben den Aminosäuren sind die jeweils durchgeführten Substitutionen angegeben.

Aus diesen Studien ist zu entnehmen, dass überwiegend Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich des V3-Loops sowie die Glycosylstruktur an Asn301 eine essenzielle Rolle bei der Rezeptorbindung spielen.

Die SPR-Ergebnisse lassen nicht auf einen Einfluss der Aminosäuren Arg313, Ala317 und Asp320 schließen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Analyse des *in silico*-Modells. Eine Ausnahme bildet hier Ala317. Für diese Aminosäure konnte im Modell eine Nähe zum Rezeptor beobachtet werden. Auch die STD-NMR-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen auf eine Beteiligung dieser Aminosäure bei der Rezeptorbindung schließen. Für Arg313 und Asp320 konnte lediglich eine schwache Beteiligung per STD-NMR festgestellt werden.

Es kann festgehalten werden, dass der V3-Loop überwiegend mit dem N-terminalen Bereich, der die Glycosylierung an Asn301 beinhaltet, in Interaktion mit CCR5 tritt. Die *in silico*-Daten legen nahe, dass besonders die Aminosäuren Asn300-302, Lys305, Ser306, Ile307 sowie Tyr316 mit dem N-terminalen Bereich des Rezeptors interagieren. Die Aminosäuren

Thr303 und Arg304 treten überwiegend mit der ECL3 in Kontakt. Aus der Interaktion mit der ECL3 resultieren ebenfalls die Kontakte des C-terminalen V3-Bereichs. Die Wechselwirkung der Chitobiosyleinheit an Asn301 ist fast ausschließlich auf die Interaktion mit dem N-terminalen Bereich des Rezeptors sowie weniger Interaktionen mit der ECL1 zurückzuführen.

Die Beteiligung der Aminosäuren Thr303, Arg304 sowie Ser306 konnte per SPR-Studien vorangegangener Arbeiten belegt werden, die Aminosäuren Asn300-302, Lys305 und Ile307 zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die V3-CCR5-Interaktion. Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass die SPR-Experimente z. T. mit verkürzten Peptiden durchgeführt wurden, die andere Konformationen einnehmen können als der vollständige V3-Loop. SPR-Analysen geben außerdem lediglich die Information über eine Änderung der Bindungsaffinität, lassen jedoch nicht unbedingt auf eine konkrete Beteiligung der einzelnen Aminosäuren an der Interaktion schließen. Die Diskrepanz der Ergebnisse ist daher nachvollziehbar.

Die Arbeitsgruppe um Da *et al.* stellten mit einem *in silico*-Ansatz die Vermutung auf, dass die Arginine 298, 304, 315 und 327 an einer Interaktion mit CCR5 beteiligt sind, wobei Arg298 und Arg327 ionische Wechselwirkungen mit den sulfatierten Tyrosinen eingehen.^[330] Arg304 interagiert mit dem N-terminalen Bereich, Arg315 mit der ECL2 von CCR5. Arg315 entspricht Arg313 der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenz. Die Beteiligung dieses Arginins konnte weder mittels STD-NMR noch durch das *in silico*-Modell bestätigt werden. Da die NMR-Untersuchungen jedoch ergaben, dass die dem Arg313 nahe gelegenen Aminosäuren Tyr316 und Ala317 und in geringem Maße Gly312, sowie Phe315 an der Interaktion beteiligt sind (Abbildung 34), ist anzunehmen, dass die lange und flexible Seitenkette des Arg313 ionische Wechselwirkungen mit CCR5 über die Protonen der Guanidiniumgruppe eingeht, die nicht per NMR detektiert werden können. Die Studie von Da *et al.* zeigte also ebenfalls eine Beteiligung des C-terminalen Bereichs des V3-Loops, wie sie die Ergebnisse der SPR- und STD-NMR-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit vermuten lassen.

Ogert *et al.* haben ein Homologiemodell von GP120 im Komplex mit CD4 und CCR5 im Rahmen einer Resistenzstudie gegen *Vicriviroc* erstellt, mit dem gezeigt werden konnte, dass vermutlich Arg327 (entspricht Arg326 der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenz) eine Salzbrücke zu Tyr10 des Corezeptors ausbildet. Das untersuchte *in silico*-Modell lässt

zwar keine Schlüsse auf eine solche Wechselwirkung zu, allerdings scheint laut STD-NMR-Ergebnissen eine Beteiligung des Arginins 327 wahrscheinlich.

Es ist anzumerken, dass das hier verwendete *in silico*-Modell auf der Basis der polaren Interaktion von Arg298, Arg304 und Lys305 des V3-Loops mit den sulfatierten Tyrosinen 3, 10 und 14 aus dem N-terminalen Bereich des Rezeptors erstellt wurde.

Da es sich bei der V3-CCR5-Bindung jedoch um einen dynamischen Prozess handelt, kann der V3-Loop mit großer Wahrscheinlichkeit flexibel ebenfalls über den C-terminalen Bereich mit dem Corezeptor in Interaktion treten. Eine Visualisierung dieses Bewegungsprozesses mittels einer *molecular dynamics*-Simulation wurde nicht durchgeführt. Diese hätte möglicherweise der Flexibilität des V3-Loops Rechnung getragen und die Beteiligung des C-terminalen Bereichs bestätigt. Die Aussage des *in silico*-Modells ist daher als Näherung zu betrachten. Die Unterschiede zu den Ergebnissen der STD-NMR-Untersuchungen, die eine deutliche Beteiligung des C-terminalen Bereichs nahelegen (Kapitel 4.8), sind somit nachvollziehbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien bestätigen zum einen die Beteiligung des N-terminalen V3-Bereichs an der V3-CCR5-Interaktion. Ergänzend zeigt die Analyse der Peptide **v3ct15** und **v3ct21** aus dem C-terminalen V3-Bereich mittels SPR und STD-NMR eindeutig, dass der C-Terminus ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Affinität zum CCR5-Rezeptor ausübt.

5 Zusammenfassung

Die Interaktion zwischen dem V3-Loop des GP120 aus dem HIV-1 und dem humanen Corezeptor CCR5 stellt einen entscheidenden Schritt des viralen *entries* dar. Eine detaillierte Aufklärung der V3-CCR5-Wechselwirkung ist daher für die Entwicklung von HIV *entry*-Inhibitoren essenziell und war Ziel dieser Arbeit. Aufbauend auf vorangegangenen Studien war es hierbei von besonderem Interesse, Peptide und Glycopeptide aus unterschiedlichen Bereichen des V3-Loops darzustellen und auf ihre Bindungseigenschaften zum CCR5-Corezeptor hin zu untersuchen.

Die synthetisierten Glycopeptide **v3cong** und **v3og** enthielten als Minimalmotiv eine Chitobiosyleinheit am Asparagin 301. Der hierfür erforderliche N_7 -Chitobiosylasparagin-Baustein (**6**) konnte erfolgreich über eine fünfstufige Syntheseroute dargestellt werden. Versuche zur Optimierung der Darstellung der beiden *precursor* Chitobiose (**3**) sowie Chitobiosylamin (**4**) führten zu keiner signifikanten Erhöhung der Gesamtausbeute.

In einer linearen Synthesestrategie mittels mikrowellenunterstützter automatisierter Festphasenpeptidsynthese konnten sechs lineare Peptide und Glycopeptide erfolgreich in guten bis sehr guten Ausbeuten dargestellt werden. Versuche, eine Cyclisierung der Peptide entweder in Lösung oder an der festen Phase zu erreichen, verliefen nicht erfolgreich.

Eine anschließende CD-spektroskopische Untersuchung aller synthetisierten Peptide ergab einen vergleichbaren Anteil der Strukturelemente α -Helix, β -Faltblatt, β -turn und *random coil*.

Detailliertere Einblicke in die Konformation konnten mittels NOESY-NMR-Experimenten erhalten werden. Über die beobachteten *long range*-Kontakte wurde gezeigt, dass zumindest ein nennenswerter Anteil der C-terminalen Peptide **v3ct15** und **v3ct21** eine helicale Struktur einnimmt. Die linearen Peptide **v3o** und **v3og**, die die gesamte Sequenz des V3-Loops beinhalten, zeigten eine räumliche Annäherung der N- und der C-terminalen Flanke bedingt durch das $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ -turn-Motiv an der Spitze des V3-Loops. Die Peptide **v3con** und **v3cong** hingegen lagen in einer zufälligen Konformation vor.

Die *in vitro*-Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Peptiden und dem membranständigen CCR5-Corezeptor erfolgte mittels zweier Methoden: SPR und STD-NMR. Die Durchführung von SPR-Experimenten ermöglichte eine Analyse der Affinität sowie der jeweiligen Assoziationskinetik der einzelnen Verbindungen. Alle untersuchten Peptide zeigten eine spezifische Interaktion mit CCR5-überexprimierenden HOS-Zellen. Hierbei

wurden für die beiden Glycopeptide **v3cong** sowie **v3og** die höchsten k_{on} -Werte bestimmt. Der signifikante Einfluss der Glycosylstruktur an Asn301 des V3-Loops auf die Assoziationsrate der V3-CCR5-Bindung konnte somit eindeutig nachgewiesen werden.

Hieran anschließende STD-NMR-Experimente mit CCR5-tragenden Liposomen gaben einen detaillierten Aufschluss über die Peptid-Rezeptor-Interaktion auf atomarer Ebene. Durch die Anwendung eines Doppeldifferenzfilters (STDD) konnten für die beiden Peptide **v3ct15** und **v3ct21** Bindungsepitope erstellt, sowie die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D der Interaktion bestimmt werden. Die ermittelten K_D -Werte lagen für beide Verbindungen jeweils im Bereich von 200 μ M und gaben Hinweise auf einen Bindungsmodus, der sich nicht mit berechenbaren Bindungsmodellen beschreiben lässt. Es konnten STD-Effekte beobachtet werden, die sich jeweils über die gesamten Peptidsequenzen erstreckten. Die Anwendbarkeit der STDD-NMR-Methode für die Untersuchung membranständiger Moleküle, wie z. B. dem CCR5-Rezeptor, mit peptidischen Liganden konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Analyse der linearen Peptide **v3o** und **v3og** ließ den Schluss zu, dass ihre Bindungskinetik für STD-NMR-Experimente zu langsam ist. Eine Analyse der analogen cyclischen Verbindungen erscheint hierbei vielversprechend.

Ergänzend wurde ein *in silico*-Modell der V3-CCR5-Interaktion untersucht. Mithilfe dieses Modells konnten Abstände zwischen dem V3-Loop und der Rezeptoroberfläche berechnet und in theoretische STD-Prozentwerte umgerechnet werden. Diese wurden mit den experimentellen Daten der STD-NMR-Untersuchungen dieser und einer vorangegangenen Arbeit verglichen.^[274] In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte anhand des *in silico*-Modells gezeigt werden, dass überwiegend Aminosäuren aus dem N-terminalen *stem*-Bereich sowie die Glycosylstruktur des V3-Loops an der Rezeptorbindung beteiligt sind. Darüber hinaus konnten mit den Ergebnissen der STD-NMR-Analyse Wechselwirkungen der Aminosäuren Tyr316, Ala317 sowie Gln327 aus dem C-terminalen V3-Bereich mit dem Corezeptor nachgewiesen werden.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Interaktion des V3-Loops aus dem GP120 mit dem humanen Corezeptor CCR5 geleistet werden. Resultate vorangegangener Arbeiten konnten unterstützt sowie durch neue Erkenntnisse ergänzt werden. Das detaillierte Verständnis der V3-CCR5-Interaktion, welches im Rahmen dieser Arbeit erweitert werden konnte, bietet eine wertvolle Grundlage zur Entwicklung neuer *entry*-Inhibitoren, die einen maßgeblichen Beitrag zur Bekämpfung der Pandemie AIDS darstellen.

6 Summary

The interaction between the V3 loop of gp120 of HIV-1 and the human coreceptor CCR5 is a crucial step in the viral entry. Therefore, a detailed elucidation of the V3-CCR5 interaction is essential for the development of HIV entry inhibitors and was goal of this thesis. Based on previous studies, it was of particular interest to synthesize peptides and glycopeptides originating from different parts of the V3 loop and analyze their binding properties to the CCR5 coreceptor.

The synthetic glycopeptides **v3cong** and **v3og** contained a chitobiosyl unit as a minimal motive attached to asparagine 301. On that account, the required N_γ -chitobiosyl asparagine building block (**6**) was successfully obtained via a five step synthetic route. Attempts to optimize the preparation of the two precursors chitobiose (**3**) and chitobiosylamine (**4**) did not lead to a significant increase of the overall yields.

By performing a linear synthetic strategy using microwave supported automated solid phase peptide synthesis, six peptides and glycopeptides were successfully synthesized in a range of good to very good yields. Attempts to obtain a cyclization of the peptides either in solution or on solid support were not successful.

A subsequent analysis by CD spectroscopy showed comparable contributions of the structural elements α -helix, β -sheet, β -turn and random coil within all synthesized peptides.

A more detailed insight into the conformation of the peptidic compounds has been achieved by NOESY NMR experiments. A significant portion of the two C-terminal peptides **v3ct15** and **v3ct21** adapted a helical structure determined by long range NOE contacts. The two linear peptides **v3o** and **v3og**, which cover the entire sequence of the V3 loop, showed a spacial approximation of the N- and the C-terminal flanks due to the $^{310}\text{GPGRAF}^{315}$ turn motif at the tip of the V3 loop. In contrast, the two peptides **v3con** and **v3cong** showed a random conformation.

In vitro studies of the interaction between the peptides and the membrane-incorporated CCR5 coreceptor were carried out by means of two methods: SPR and STD NMR. The performance of SPR experiments enabled the analysis of the affinity and the association kinetics of each individual compound. All of the analyzed peptides showed a specific interaction with CCR5-overexpressing HOS cells. In this context, the highest k_{on} values were determined for the two glycopeptides **v3cong** and **v3og**. Thus, the significant influence of the

glycosidic structure at Asn301 on the association rate of the V3 loop has unambiguously been proved.

Subsequent STD NMR experiments using CCR5-carrying liposomes gave detailed information of the peptide-receptor interaction at an atomic level. By the application of a double difference filter (STDD), the binding epitopes of the two peptides **v3ct15** and **v3ct21** were achieved and additionally, the values of the thermodynamic dissociation constant K_D were determined. The K_D values were determined to about 200 μM in case of both peptides indicating a binding mode which cannot be described by calculable binding models. Furthermore, STD effects ranging over the entire sequences have been observed. The applicability of the STDD NMR method for the examination of peptidic ligands with membrane-incorporated molecules, e. g. the CCR5 coreceptor, has been confirmed as a result of this study. The results of the analysis of the linear peptides **v3o** and **v3og** indicated a binding kinetics which is too slow to be observed by STD NMR experiments. The analysis of the corresponding cyclic compounds seems to be promising, however.

Additionally, an *in silico* model of the V3-CCR5 interaction was analyzed. Aided by this model, distances between the V3 loop and the surface of the receptor were calculated and converted to theoretical STD percentages. These data were compared to the experimental data of the STD NMR studies of this and a preceding study.^[274] On the basis of this *in silico* model, it could be shown that predominantly amino acids from the N-terminal stem region as well as the glycosidic structure of the V3 loop are involved in the binding to the receptor. In good accordance with the results of the STD NMR analysis, the additional participation of the amino acids Tyr316, Ala317, and Gln327 from the C-terminal V3 region in the interaction with the coreceptor was shown.

The results of this study provide an important contribution to elucidate the interaction of the V3 loop of the gp120 with the human coreceptor CCR5. Results of previous studies could be supported and have been supplemented with new findings. The detailed comprehension of the V3-CCR5 interaction, which could be extended in context of this thesis, provides a valuable basis for the development of new entry inhibitors to account for the containment of the pandemic AIDS.

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte und Chemikalien

7.1.1 Geräte

Gerät	Gerätetyp/-bezeichnung	Hersteller/Anbieter
CD-Spektrometer	<i>J-810</i>	Jasco, Groß-Umstadt/D
CO ₂ -Inkubator	Heraeus <i>BB6060</i>	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold/D
ESI-Massenspektrometer	6224 Accurate-Mass TOF LC/MS System mit 1200 <i>Infinity</i> LC-Einheit Säule: Zorbax Extend-C18 (50 mm x 2.1 mm, 5 µm, 0.1 mL/min)	Agilent Technologies, Waldbronn/D
Extruder	<i>LiposoFast basic</i>	Avestin Inc., Ottawa/CAN
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ GmbH, Osterode/D
HPLC	<i>Biocad 700E Perfusion</i> mit Gilson FC205 Fraktionssammler Merck/Hitachi <i>LaChrom</i> L7000-Serie mit DAD-Array-Detektor	Applied Biosystems, Darmstadt/D VWR International, Darmstadt/D
MALDI-TOF-MS	<i>Biflex III</i>	Bruker Daltonics, Bremen/D
Mikroskop	Typ <i>S200</i> ; Okular: A10/0.25	Helmut Hund, Wetzlar/D
Mikrowellen-Reaktor	Single-mode System <i>Discover</i>	CEM, Matthews (NC)/USA
NMR 500 MHz	<i>DRX 500</i> ; B ₀ = 11.67 T, ν _L (¹ H) = 499.87 MHz, ν _L (¹³ C) = 125.77 MHz), inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf	Bruker Biospin, Rheinstetten/D
NMR 700 MHz	<i>Avance 700</i> , B ₀ = 16.35 T, ν _L (¹ H) = 700.13 MHz, ν _L (¹³ C) = 176.08 MHz), inverser 5 mm Tripelresonanz-Cryoprobenkopf	
NMR-Probenröhrchen	3 mm <i>match</i> 5 mm <i>Typ502, Typ507-HP7</i>	Hilgenberg, Malsfeld/D Norell, Landisville (NJ)/USA
Peptidsynthesizer	automatisierter 12-Kanal-Synthesizer	CEM, Matthews (NC)/USA

Gerät	Gerätetyp/-bezeichnung	Hersteller/Anbieter
	<i>Liberty</i>	
pH-Meter	<i>pH 526</i>	WTW, Weilheim/D
Polarimeter	<i>P8000</i>	A. Krüss Optronic, Hamburg/D
Reinstwasseranlage	<i>SG Ultra Clear UV 18.2 MΩ</i>	SG Water, Barsbüttel/D
Rotationsverdampfer	<i>Laborata 4000-efficient</i>	Heidolph, Cinnaminson (NJ)/USA
RP-C ₁₈ -analoge Säule (semipräparativ)	<i>Vydac 218TP510</i> (250 mm x 20 mm, 5 μm, 5 mL/min)	Grace Vydac, Anaheim (CA)/USA
RP-C ₁₈ -Säule (analytisch)	<i>EC250/4 Nucleodur C₁₈ Pyramid</i> (250 mm x 4 mm, 5 μm, 1 mL/min)	Macherey-Nagel, Düren/D
RP-C ₁₈ -Säule (präparativ)	<i>VP250/21 Nucleodur C₁₈ Pyramid</i> (250 mm x 21 mm, 5 μm, 20 mL/min)	Macherey-Nagel, Düren/D
SpeedVac	<i>Savant SC110</i>	Fisher Scientific, Schwerte/D
SPR-Messgerät	<i>Biacore J</i>	Biacore AB, Uppsala/S
Sterilwerkbank	<i>HeraSafe HS12</i>	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold/D
Ultrafiltrationszelle	<i>Amicon 8400 (400 mL)</i>	Millipore Inc, Bellerica (MA)/USA
Ultraschallbad	<i>Sonorex Super RK106</i>	Bandelin, Berlin/D
Ultrazentrifuge	<i>Sorval Discovery 90S Hitachi</i>	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold/D
UV/VIS Spektrometer	<i>UV/Vis Spektrometer UV-160A</i>	Shimadzu, Kyoto/J
Zentrifugen	<i>5084R, 5417R, 5415D</i>	Eppendorf, Hamburg/D

7.1.2 Chemikalien

Hersteller/Lieferant	Chemikalien
ABCR	Triisopropylsilan
Agilent	<i>ES Tuning Mix</i>
Bachem	Leupeptin
Biacore AB	Acetatpuffer pH 4.0
Biochrom	FKS
Burdick und Jackson	Essigsäure (96 %)
Deutero	Deuteriumoxid, (99.9 %), DMSO- <i>d</i> ₆ (99.8 %), NaOD

Hersteller/Lieferant	Chemikalien
DLM	TRIS- d_{11}
Fluka	Ammoniumcarbamat, Antipain, Dihydroxybenzoesäure, DMF (abs.), Dinatriumhydrogenphosphat, Ethanolamin-HCl, Methanol (abs.), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Pefabloc, Pepstatin
Grüssing	Ammoniumhydrogencarbonat, Essigsäureanhydrid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Salzsäure (37 %)
Honeywell	Calciumchlorid, Natriumsulfat,
Invitrogen	Penicillin-Streptomycin, RMPI 1640-Medium, Trypsin-EDTA
Iris Biotech	Diisopropylethylamin, <i>N,N</i> -Dimethylformamid, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(O <i>t</i> Bu), Fmoc-L-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Cys(S <i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-Rink-Amid-AM-Harz (0.72 mmol/g), Piperidin, TBTU
Merck	Aceton, Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, Ethanol, Ethylacetat, Hydrazinhydrat-Monohydrat, <i>N</i> -Hydroxysuccinimid, Kaliumchlorid, 2-Mercaptoethanol, Methanol, Natriumazid, Natriumdodecylsulfat, <i>NovaPEG</i> Rink-Amide-Harz LL (0.17 mmol/g), 2-Propanol, Schwefelsäure 95-97 %, Toluol, Trifluoressigsäure
Riedel de Haen	Natrium, Natriumhydrogencarbonat
Sigma-Aldrich	Acetonitril (<i>HPLC gradient grade</i>), Biogel P2, 200 – 400 <i>mesh</i> , Chitin, Chitinase (EC 3.2.1.14), DCl, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin), Ferulasäure, Pyridin (abs.), Neomycin, Puromycin, Trypanblau
Westfalen	Stickstoff

7.1.3 Materialien

Material	Bezeichnung	Hersteller/Anbieter
Dünnschichtchromatographiefolie	Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie (GF ₂₅₄)	Merck, Darmstadt/D
Extrusionsmembranen	<i>Nuclepore</i> Polycarbonat-Membran (Porengröße: 0.1 μm)	Whatman, Kent/UK
Kieselgel	Kieselgel 60, Korngröße 40 – 63 μm	Merck, Darmstadt/D

Material	Bezeichnung	Hersteller/Anbieter
Zellkulturgefäße	<i>Gewebekulturflaschen</i> , belüftet, 175 cm ²	Sarstedt GmbH, Nümbrecht/D
Neubauer Zählkammer	(0.1 mm Tiefe/0.0025 mm ²),	Marienthal, Königshofen/D
Pipettenspitzen zur Probenentsalzung	<i>ZipTip_{C18}</i>	Millipore Inc, Bellerica (MA)/USA
Serologische Pipetten	pyrogenfrei, steril	Sarstedt GmbH, Nümbrecht/D
Spin-Tubes	<i>SpinX tubes</i> (0.22 µm Celluloseacetat)	Corning Life Sciences Inc., Lowell (MA)/USA
SPR-Sensorchips	<i>CMD 50</i>	XanTec, Düsseldorf/D
Spritzenfiltereinheiten	<i>Filtropur S</i> , 0.22 µm	Sarstedt GmbH, Nümbrecht/D
Ultrafiltrationsmembran	<i>PLAC</i> , 1000 Da	Millipore Inc, Bellerica (MA)/USA

7.1.4 Medien und Pufferlösungen

Wachstumsmedium	RPMI 1640-Medium mit 10 % (v/v) FKS, 5 % (v/v) Penicillin (10000 U/mL) und 5 % (v/v) Streptomycin (10 mg/mL).
Einfriermedium	RPMI 1640-Medium mit 20 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO
Proteaseinhibitorenmix	Gleiche Volumina folgender Stammlösungen (in D ₂ O): Antipain (10 mM), Leupeptin (20 mM), Pepstatin (1 mM), Pefabloc (500 mM)
PBS-Puffer	136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 11 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.7 mM KH ₂ PO ₄ , eingestellt mit NaOH/HCl auf pH 7.4
LUV-NMR-Puffer	10 mM TRIS- <i>d</i> ₁₁ , 150 mM NaCl, 6 mM NaN ₃ , eingestellt mit NaOD/DCl auf pH 7.4
LUV-EDTA-NMR-Puffer	10 mM TRIS- <i>d</i> ₁₁ , 150 mM NaCl, 6 mM NaN ₃ , 5 mM EDTA- <i>d</i> ₁₆ , eingestellt mit NaOD/DCl auf pH 7.4

7.1.5 Zelllinien

Die verwendeten Zellen (GHOST(3)Parental-Zellen und GHOST(3)Hi 5-Zellen) wurden aus humanen Osteosarcoma-Zellen erhalten und über das *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program* (NIH, Germantown (MD)/USA) bezogen.^[331]

7.1.6 Software

Verwendungszweck	Bezeichnung	Anbieter
Bildbearbeitung	Adobe Illustrator CS4	Adobe, San Jose (CA)/USA

Verwendungszweck	Bezeichnung	Anbieter
CD-Spektrenauswertung	<i>CDtool</i>	Lees et al., <i>Anal Biochem</i> 2004 , 332, (2).
ESI-Spektrenauswertung	MassHunter	Agilent Technologies, Waldbronn/D
Molmassenberechnung, Strukturdarstellung	ISIS Draw 2.5	Symyx Technologies, Santa Clara (CA)/USA
	ChemDraw Pro 11.0	CambridgeSoft, Cambridge (MA)/USA
MALDI-TOF Spektrenauswertung	XMass 4.1	Bruker Daltonics, Bremen/D
<i>molecular modeling</i>	Maestro 9.1/Desmond	Schrödinger, New York (NY)/USA
NMR-Spektrenauswertung	TopSpin 1.3/2.1/3.1	Bruker Biospin, Rheinstetten/D
Peptidsynthese	PepDriver	CEM, Matthews (NC)/USA
SPR-/STD-Datenauswertung	OriginPro 7.5/8.5	OriginLab, Northampton (MA)/USA
SPR-Spektrenauswertung	BiacoreEval V3.1	Biacore AB, Uppsala/S

7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Allgemeines

Die verwendeten Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders angegeben, vor der Verwendung destilliert. Alle Lösungsmittelverhältnisse sind volumetrisch. Das verwendete deionisierte Wasser wurde über eine Reinstwasseranlage gereinigt. Säulenchromatografische Reinigungen wurden an Kieselgel 60 durchgeführt. Dünnschichtchromatografische Untersuchungen wurden an Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption und/oder Eintauchen in Schwefelsäure (10 % in H₂O) und anschließende Wärmebehandlung mit einem Heißluftfön. Photometrische Messungen wurden an einem Photometer *UV-160A* vorgenommen.

AAV1 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die Synthesen der Peptide und Glycopeptide wurden nach der Fmoc-Strategie an einem Peptidsynthesizer *Liberty* mit einer Mikrowelleneinheit *Discover* durchgeführt.

Es wurden Ansatzgrößen zwischen 25 und 100 µmol bezogen auf die entsprechende Belegung des verwendeten Harzes gewählt. Das Harz wurde vor Beginn jeder Synthese mindestens 24 Stunden bei 40 °C in 5 mL DMF quellen gelassen.

Die Fmoc-Entschützung des Harzes erfolgte zweifach mit Piperidin (20 % in DMF) (30 Sekunden, 35 W, 75 °C).

Für die Kupplung der Aminosäuren wurden 0.2 M Lösungen in DMF eingesetzt. Die Kupplungsschritte wurden doppelt durchgeführt, wobei jeweils ca. 2 mL der Aminosäurelösungen benötigt wurden. Für die Kupplung des Chitobiosylasparagin-Bausteins wurden pro Kupplungsschritt 1.2 Äquivalente in jeweils 1.7 mL DMF eingesetzt. Die Aktivierung der Carboxylfunktion der Aminosäuren erfolgte mit je 1 mL 0.5 M TBTU in DMF und je 1 mL 2 M DIPEA in DMF (300 Sekunden, 25 W, 75 °C). Die Kupplung von Cystein, Histidin sowie des Chitobiosylasparagin-Bausteins wurde bei jeweils 50 °C durchgeführt. Die Kupplung von Arginin wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt.

Anschließend wurden nichtumgesetzte Aminofunktionen mit Essigsäureanhydrid (10 % in DMF) blockiert (30 Sekunden, 40 W, 65 °C). Die nachfolgende Fmoc-Entschützung des N-Terminus der wachsenden Peptidkette wurde mit Piperidin (20 % in DMF) durchgeführt (180 Sekunden, 35 W, 75 °C). Nach allen Reaktionsschritten wurde das Harz mit DMF gewaschen.

Nach der Synthese wurde das polymergebundene Peptid in eine Glasfritte der Porengröße P2 überführt. Zur Abschätzung der Kupplungsausbeute wurde die Entschützung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe manuell durchgeführt (AAV2). Die Abspaltung vom Harz (AAV4 bzw. AAV5) erfolgte ebenfalls manuell.

AAV2 Photometrische Bestimmung des Methylenfluorens (Fmoc-Wert) zur Bestimmung der Rohausbeute

Das Harz wurde mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Unter Lichtausschluss wurden 2 mL Piperidin (20 % in DMF) auf das Harz gegeben, für 15 Minuten bei RT geschüttelt und die Abspatlösung aufgefangen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Harz acht Mal mit je 2 mL DMF gewaschen und das Lösungsmittel ebenfalls aufgefangen. Von den vereinten Abspalt- und Waschlösungen (20 mL) wurden 100 µL abgenommen und mit 1900 µL DMF verdünnt. Die enthaltene Menge Methylenfluoren wurde photometrisch durch die Messung der UV-Absorption bei 301 nm quantifiziert.

Die gemessenen Extinktionswerte (OD) wurden in das Lambert-Beer'sche Gesetz eingesetzt (Gleichung 6), um die Stoffmenge n_{Fluoren} [mol] zu berechnen und so eine Abschätzung der Kupplungsausbeute machen zu können.^[332]

$$n_{\text{Fluoren}} = (OD \cdot \varepsilon^{-1} \cdot d^{-1} \cdot V) \cdot F \quad \text{Gleichung 6}$$

mit:	$\varepsilon_{301} = 7.95 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	(molarer Extinktionskoeffizient)
	$V = 0.02 \text{ L}$	(Gesamtvolumen der vereinten Abspatlösungen)
	$d = 1 \text{ cm}$	(Schichtdicke der Glasküvette)
	$F = 20$	(Verdünnungsfaktor)

Nach der Bestimmung der Metylenfluoren-Menge wurde das Harz mehrfach mit Dichlormethan gewaschen, im Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

AAV3 O-Deacetylierung der Glycopeptide an der festen Phase

Zur Entschützung des peracetylierten Saccharidteils der polymergebundenen Glycopeptide wurde das Harz zunächst mehrfach mit abs. Methanol gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Anschließend wurden 5 mL Hydrazin-Hydrat (20 % in abs. Methanol) auf das Harz gegeben und für sechs Stunden bei RT geschüttelt.^[333] Die Reaktionslösung wurde entfernt, das Harz mehrfach mit Methanol gewaschen, im Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

AAV4 Abspaltung der Peptide und Glycopeptide von der festen Phase unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen

Das Harz wurde mit 3 mL Abspatlösung, bestehend aus TFA/TIPS/H₂O (95:3:2), bedeckt und für 90 Minuten bei RT geschüttelt. Die Abspatlösung wurde aufgefangen, das Harz erneut mit 3 mL Abspatlösung bedeckt und für 90 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde das Harz drei Mal mit je 2 mL TFA gewaschen und die vereinten Abspalt- und Waschlösungen im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt.

Das Rohprodukt wurde in 10 mL ddH₂O unter Einwirkung von Ultraschall suspendiert und gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

AAV5 Abspaltung von Cys(Trt)-enthaltenden Peptiden und Glycopeptiden von der festen Phase und Ausbildung einer Disulfidbrücke

Die Abspaltung und Cyclisierung erfolgten unter Sauerstoffausschluss in einer Inertgasatmosphäre. Das Harz wurde vor der Abspaltung im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Das Harz wurde mit 3 mL entgaster Abspalllösung, bestehend aus TFA/TIPS/H₂O (95:3:2), bedeckt und für 90 Minuten bei RT geschüttelt. Die Abspalllösung wurde aufgefangen, das Harz erneut mit 3 mL Abspalllösung bedeckt und für 90 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde das Harz fünf Mal mit je 2 mL TFA gewaschen und die vereinten Abspalt- und Waschlösungen im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt.

Das Rohprodukt wurde in einer entgasten und mit Helium gesättigten 0.1 M NH₄HCO₃-Lösung (50 mL/ μ mol Harzäquivalent) unter Einwirkung von Ultraschall gelöst. Anschließend wurde unter Zusatz von Luftsauerstoff mittels einer Gasfritte für 72 Stunden bei RT stark gerührt.

Das Rohprodukt wurde mittels Ultrafiltration (AAV6) aus der Lösung isoliert.

AAV6 Ultrafiltration der cyclisierten Rohprodukte

Die Ultrafiltrationen wurden mittels einer Rührzelle mit einem Volumen von 400 mL (*Amicon* 8400) und einer Membran aus regenerierter Cellulose (*PLAC*) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 1000 Da unter einem Druck von 3 bar durchgeführt.

Die Ammoniumhydrogencarbonat-haltige Reaktionslösung (AAV5) wurde schrittweise in die Rührzelle überführt und auf ein Volumen von 50 mL eingengt. Danach wurden vier Mal je 300 mL ddH₂O zugegeben und wiederum auf ein Volumen von 50 mL eingengt. Anschließend wurde die eingengte Lösung gefriergetrocknet.

AAV7 Etherextraktion der Rohpeptide

Vor der Reinigung mittels HPLC wurden wasserunlösliche Bestandteile der Rohprodukte entfernt. Hierzu wurde das Rohprodukt mit 5 mL eiskaltem Diethylether versetzt, mittels Ultraschallbad homogenisiert und anschließend für fünf Minuten zentrifugiert (8000 g, 4 °C). Der Überstand wurde abdekantiert. Der Rückstand wurde in 10 mL ddH₂O aufgenommen, erneut homogenisiert und gefriergetrocknet.

AAV8 Reinigung der Rohprodukte mittels RP-HPLC

Zur Reinigung der Rohprodukte im präparativen Maßstab wurde eine HPLC-Anlage *BioCAD 700E Perfusion* mit einer *RP-C₁₈*-Säule verwendet. Zur Reinigung im semipräparativen Maßstab wurde eine HPLC-Anlage *Merck/Hitachi LaChrom L7000* mit einer semipräparativen *RP-C₁₈*-analogen Säule verwendet. Die Reinheitsbestimmung der

Peptide erfolgte ebenfalls an dieser HPLC-Anlage im analytischen Maßstab. Das verwendete Acetonitril entsprach der Reinheit *HPLC gradient grade*.

1 bis 25 mg der Rohprodukte wurden in 350 μL bzw. 1000 μL des Laufmittelgemischs aufgenommen, das dem Gemisch bei Methodenstart entspricht, und unter Einwirkung von Ultraschall homogenisiert. Zur Abtrennung unlöslicher Verunreinigungen wurde zunächst fünf Minuten bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand in einem Filtertube (Celluloseacetat, 0,22 μm) fünf Minuten zentrifugiert (15000 g).

Als Eluenten dienten ein entgastetes Gemisch aus Wasser/Acetonitril/TFA (95:5:0.1, Eluent A) und ein entgastetes Gemisch aus Wasser/Acetonitril/TFA (5:95:0.1, Eluent B). Die Elution erfolgte bei RT bei Flussraten von 1 mL/min (analytisch), 5 mL/min (semipräparativ) oder 20 mL/min (präparativ) mit unterschiedlichen Gradienten. Zur photometrischen Detektion dienten ein systeminterner UV-Detektor (Absorption bei 215 und 280 nm, *BioCAD 700E*-Anlage) und ein DAD-Array-Detektor (Absorptionsbereich 200 - 300 nm, *Merck/Hitachi*-Anlage).

Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe von Fraktionssammlern aufgefangen und einer Analyse mittels MALDI-TOF-MS (AAV9) bzw. ESI-MS (AAV10) unterzogen. Produkt-haltige Fraktionen wurden vereint, das Acetonitril unter vermindertem Druck destillativ entfernt und die Produkte gefriergetrocknet. Zeigten die Produkte noch keine zufriedenstellende Reinheit, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels HPLC mit verändertem Gradienten durchgeführt.

AAV9 Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren

Die MALDI-TOF-MS-Massenspektren wurden an einem *Biflex III*-Spektrometer bei einer Beschleunigungsspannung von 19 kV und einer Spannung des Sekundär-Elektronen-Vervielfachers von 3425 V aufgenommen.

Auf den Probenträger wurden 0,5 μL einer Matrixlösung aufgetragen und im Luftstrom kristallisiert. Als Matrices wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (ges. Lösung in Methanol/Acetonitril (1:1)) sowie Ferulasäure (FA) (ges. Lösung in Wasser/Acetonitril (2:1)) verwendet. Anschließend wurden 0,5 μL der zu untersuchenden Probe ($c \sim 10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) aufgetragen und erneut im Luftstrom kristallisiert. Gelang eine Detektion mit dieser Präparation nicht, wurde eine weitere Schicht Matrix aufgetragen und kristallisiert (Schichtpräparation).

Nach Einbringung des Probenträgers in das Gerät erfolgte eine Kalibrierung mit einem Standardsubstanzgemisch (*ES Tuning Mix*). Die Messungen wurden bei einer Attenuierung von 25 bis 35 mit 50 bis 250 Laserpulsen durchgeführt. Signale der Matrixmoleküle im Bereich $m/z < 800$ wurden unterdrückt.

AAV10 Aufnahme der ESI-Massenspektren

Die Aufnahme der ESI-Massenspektren erfolgte an einem ESI-TOF-Massenspektrometer im *negative ion*-Modus. Die Konzentration der Proben betrug 10 nmol/mL in Wasser/Acetonitril (95:5).

Bei der Durchführung der Massendetektion mit vorgeschalteter Flüssigchromatographieeinheit (1220 *Infinity* LC) wurde folgender Gradient angewendet:

Eluent A (95% Acetonitril/5 % Wasser)/Eluent B (95% Wasser/5 % Acetonitril): 100/0 → 100/0 (1 min) → 50/50 (30 min) → 0/100 (2 min) → 0/100 (2 min) → 100/0 (2 min) → 100/0 (0.5 min), Flussrate 0.1 mL/min. Es wurde eine *Zorbax Extend*-C₁₈-Säule verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem DAD-Array-Detektor (Absorptionsbereich 200 - 300 nm).

AAV11 Aufnahme der NMR-Spektren der Peptide und Glycopeptide

Die NMR-Spektren zur Charakterisierung der Peptide und Glycopeptide wurden an einem *DRX* 500 MHz- oder an einem *Avance* 700 MHz-Spektrometer aufgenommen. STD-NMR-Experimente wurden an einem *Avance* 700 MHz-Spektrometer durchgeführt.

Die Zuordnung der Signale wurde anhand von 1D-¹H- und 2D-TOCSY-Spektren (*mlevgpwh5*) und die Verifizierung der Sequenz anhand von 2D-NOESY-Spektren (*noesygpwh5*) in H₂O/D₂O (9:1) bei einer Temperatur von 285 K durchgeführt. Der pH-Wert der Proben wurde mit TFA auf 3.0 eingestellt. Zur Wasserunterdrückung wurde wahlweise eine WATERGATE- oder eine *excitation sculpting*-Pulssequenz verwendet. Die 2D-Spektren der Peptide und Glycopeptide wurden phasensensitiv durch TPPI über eine spektrale Breite von 10 ppm mit 256 bis 512 Inkrementen in F1 aufgenommen. In F2 wurden 16 bis 64 *Scans* mit 4096 Datenpunkten pro Inkrement aufsummiert. Die TOCSY-Mischzeit betrug 100 ms und die NOESY-Mischzeit 500 ms mit einer variablen Wartezeit (5 % der gewählten Mischzeit), um eine effektive Nullquantenunterdrückung zu erreichen.

Für die STD-NMR-Experimente erfolgte eine Zuordnung der Signale anhand von 2D-TOCSY-Spektren (*mlevgpwh5*) und die Sequenzierung anhand von 2D-NOESY-

Spektren (*noesygpphw5*) in D₂O bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 285 K.

Zur Spektrenprozessierung mit dem Programm *TopSpin* wurde eine Quadratsinusfunktion über den FID gelegt und ein *Zerofilling* durchgeführt. Die Spektren wurden auf das (Rest-)Wassersignal kalibriert ($\delta_{\text{HDO}} = 4.69$ ppm). Der Phasenfehler wurde manuell und die Basislinie automatisch korrigiert.

AAV12 Aufnahme von CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden an einem CD-Spektrometer *J-810* aufgenommen.

Die peptischen Liganden wurden in H₂O gelöst ($c = 0.33$ nmol/mL) und in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt und erfolgten in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 190 - 270$ nm mit einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min und einem Messintervall von 1 nm.

Die Daten wurden nach *Savitzky-Golay* geglättet und mit dem Programm *CDtool* ausgewertet.^[239]

AAV13 Allgemeine Verfahrensweisen zur Zellkultivierung

Die Kultivierung der adhärennten HOS-Zellen erfolgte in einem Inkubator *Heraeus BB6060* bei 37 °C in einer wassergesättigten CO₂-Atmosphäre (5 %). Die Aussaat und das Umsetzen der Zellen erfolgten in einer Sterilwerkbank. Das FKS für das Wachstums- und Einfriermedium wurde vor der Verwendung hitzedeaktiviert (56 °C, 20 min). Der verwendete PBS-Puffer wurde durch Autoklavieren sterilisiert. CCR5-überexprimierende HOS-Zellen wurden einmal pro Monat mit Puromycin (1 µg/mL), HOS-Parentalzellen mit Neomycin (50 µg/mL) selektiert. Die Zellkulturen wurden regelmäßig mikroskopisch auf einen bakteriellen oder mykotischen Befall kontrolliert.

Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und mit 25 mL Wachstumsmedium ausgesät. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen umgesetzt und dabei aufgeteilt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen und mit 8 mL Trypsin/EDTA-Lösung fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen wurde u. U. durch leichtes Aufschlagen der Kulturschale auf den Werkbankboden unterstützt. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 12 mL Wachstumsmedium inaktiviert. Die abgelösten Zellen wurden fünf Minuten bei 150 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet entweder zur Lagerung in Aliquots mit Einfriermedium oder zur erneuten Aussaat

mit Wachstumsmedium versetzt. Wurden die Zellen für SPR-Messungen verwendet, wurden diese in PBS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden nicht häufiger als acht Mal umgesetzt. Zum Einfrieren wurden die Zellen zügig auf eine Temperatur von -80 °C gebracht, um die Aufnahme des cytotoxischen DMSO zu minimieren.

Die Zellkonzentration wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (0.1 mm Tiefe/ 0.0025 mm^2) unter dem Mikroskop bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit PBS-Puffer verdünnt (1:10). $10\text{ }\mu\text{L}$ der Verdünnung wurden mit Trypanblau versetzt (1:1). $10\text{ }\mu\text{L}$ hiervon wurden in die Zählkammer eingebracht. Der Anteil vitaler Zellen betrug mindestens 95 %. Blaugefärbte, abgestorbene Zellen wurden nicht mitgezählt.

Die Zellkonzentration wurde nach Gleichung 7 bestimmt.

$$\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{L}} = \left(\frac{n_z}{4}\right) \cdot 1000 \cdot 10 \cdot 2 \quad \text{Gleichung 7}$$

mit: n_z : Anzahl der Zellen in allen vier Quadranten der Neubauerzählkammer

AAV14 Liposomenherstellung

Die Liposomenherstellung erfolgte nach der Vorschrift von B. Huenefeld.^[274]

Die HOS-Zellen wurden zunächst durch dreimaliges Zentrifugieren in einen LUV-NMR-Puffer überführt (150 g , 4 °C , 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 6 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer aufgenommen, zentrifugiert und erneut in 6 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer aufgenommen. Es wurden $200\text{ }\mu\text{L}$ Proteaseinhibitorenmix zugegeben und die Zellkonzentration nach AAV13 bestimmt. Die Suspension wurde unter Eiskühlung für 60 Minuten bei 50 bar homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (150 g , 4 °C , 5 min), der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 1 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer gewaschen. In einem weiteren Schritt wurden die vereinten Überstände bei 2000 g zentrifugiert (4 °C , 10 min), der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 1 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer gewaschen. Die vereinten Überstände wurden bei 10000 g zentrifugiert (4 °C , 90 min), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 mL LUV-EDTA-NMR-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von $200\text{ }\mu\text{L}$ Proteaseinhibitorenmix wurde die Suspension in eine Spritze aufgezogen und bei RT elf Mal durch einen Filter der Porengröße 100 nm extrudiert.

7.3 Darstellung des N_{γ} -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6)

Die Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach der Vorschrift von J. Tost durchgeführt.^[130] Alle Reaktionen wurden in einer Stickstoffatmosphäre und in käuflich erhältlichen, trockenen Lösungsmitteln durchgeführt.

7.3.1 Darstellung von Chitobioseoctaacetat (2)

Ausbeute:

Es wurden 4.61 g (6.81 mmol) Chitobioseoctaacetat (**2**) isoliert. Das entspricht einer Ausbeute von 5 % bezogen auf die Stoffmenge an eingesetzten Dimereinheiten des Chitins (**1**).

Charakterisierung:

IUPAC-Name: 2-Acetamido-2-desoxy-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-1,3,6-tri-*O*-acetyl- α -D-glucopyranose

Farbloser Feststoff

Summenformel: $C_{28}H_{40}N_2O_{17}$

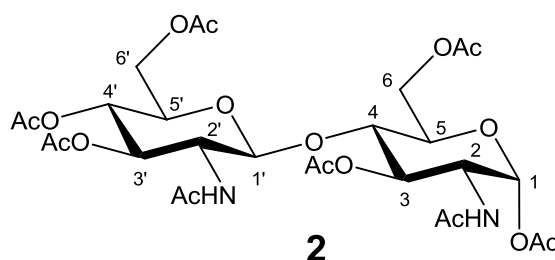
Molmasse: 676.63 g/mol

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = +52^{\circ}$ ($c = 0.50$, Essigsäure) [Lit: $[\alpha]_D^{30} = +56^{\circ}$ ($c = 0.52$, Essigsäure)]^[303]

Schmelzpunkt: 306 °C [Lit: 301-303 °C]^[303]

R_f -Wert ($CHCl_3/MeOH$ (9:1)) = 0.40

MALDI-TOF-MS: $m/z = 677.5 [M+H]^+$; 699.3 $[M+Na]^+$



1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K):

δ [ppm] = 8.00 (*d*, 1H, $^3J_{NH,2'} = 9.2$ Hz, NH'), 7.93 (*d*, 1H, $^3J_{NH,2} = 9.4$ Hz, NH), 5.82 (*d*, 1H, $^3J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1 α), 5.12 (*dd*, 1H, $^3J_{3',2'} = 10.0$ Hz, $^3J_{3',4'} = 10.0$ Hz, H-3'), 5.07 (*dd*, 1H, $^3J_{3,2} = 10.9$ Hz, $^3J_{3,4} = 8.4$ Hz, H-3), 4.82 (*dd*, 1H, $^3J_{4',3'} = 9.6$ Hz, $^3J_{4',5'} = 9.8$ Hz, H-4'), 4.65

(*d*, 1H, $^3J_{1',2'} = 8.4$ Hz, H-1' β), 4.35 (*dd*, 1H, $^3J_{6'a,5'} = n. b.$, $^2J_{6'a,6'b} = 12.0$ Hz, H-6' α), 4.29 (*dd*, 1H, $^3J_{6'b,5'} = 4.0$ Hz, $^2J_{6'b,6'a} = 12.5$ Hz, H-6' β), 4.15 (*dd*, 1H, $^3J_{2,1\alpha} = 3.5$ Hz, $^3J_{2,3} = 11.2$ Hz, H-2), 4.01 (*dd*, 1H, $^3J_{6b,5} = 4.4$ Hz, $^2J_{6b,6a} = 12.0$ Hz, H-6b), 3.92 (*dd*, 1H, $^3J_{6a,5} = 2.0$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H-6a), 3.90 – 3.78 (*m*, 3H, H-4, H-5, H-5'), 3.59 (*dd*, 1H, $^3J_{2',1'\beta} = 8.4$ Hz, $^3J_{2',3'} = 9.7$ Hz, H-2'), 2.15, 2.06, 2.01, 1.99, 1.95, 1.90 (6 x *s*, 18H, C(O)CH₃), 1.78, 1.74 (2 x *s*, 6H, NH-C(O)CH₃).

¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K):

δ [ppm] = 170.0, 169.9, 169.6, 169.6, 169.4, 169.2 (6 x C(O)CH₃), 100.3 (C-1'), 89.7 (C-1), 75.2 (C-4), 72.4 (C-5'), 70.5 (C-5), 70.3 (C-3'), 70.1 (C-3), 68.2 (C-4'), 61.7 (C-6'), 61.6 (C-6), 53.6 (C-2), 50.0 (C-2'), 22.6, 22.2 (2 x NH-C(O)CH₃), 20.9, 20.7, 20.5, 20.4, 20.3, 19.2 (6 x C(O)CH₃).

7.3.2 Versuch der enzymatischen Darstellung von Chitobioseoctaacetat (2)

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Hackenberger *et al.* durchgeführt.^[297]

20.9 g Chitin (1) (entspricht 49.3 mmol Dimereneinheiten) wurden zwei Stunden in 125 mL konz. HCl unter Einwirkung von Ultraschall verdaut. Der erhaltene dunkelbraune Sirup wurde unter Rühren in 1.5 L Eiswasser aufgenommen und 16 h bei 4 °C gelagert. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit 25 mL 1 M NaOH neutralisiert und mit 25 mL Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde mit 30 mL Aceton sowie 30 mL Diethylether gewaschen, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und anschließend gefriergetrocknet.

Es wurden 1.97 g kolloidales Chitin in Form eines hellbraunen Feststoffes erhalten. Dieser wurde mit 15 mL 0.1 N Na₂HPO₄-Lösung (pH 6.4) versetzt und das Enzym *Chitinase* (aus *Streptomyces griseus*: 2.2 mg, 2400 units/g, 5.3 units) zugegeben. Die Suspension wurde 15 Tage bei 37 °C gerührt. Der nach Filtration erhaltene Rückstand wurde mehrfach mit Wasser gewaschen und das Filtrat (rohe Chitobiose (3a)) gefriergetrocknet (DC-Kontrolle Filtrat: MeOH/CHCl₃ (1:1), R_f = 0.34).

1.07 g rohe Chitobiose (3a) wurden mit 12.0 mL (13.0 g, 127 mmol) Essigsäureanhydrid und 1.29 g (15.7 mmol) wasserfreiem Natriumacetat acetyliert. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Tage bei 80 °C gerührt. Das Produkt wurde abfiltriert und mit 8 mL ges. NaHCO₃-Lösung und 10 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde das Produkt aus MeOH umkristallisiert (DC-Kontrolle: MeOH/CHCl₃ (5:95), R_f = 0.30).

Ausbeute:

Es wurden 420 mg eines farblosen Feststoffes erhalten. Die Charakterisierung per NMR und MALDI-TOF-MS ergab, dass es sich bei dem Feststoff nicht um das Produkt Chitobioseoctaacetat (**2**) handelte.

7.3.3 Darstellung von Chitobiose (**3**)

Es wurden 45 mL Methanol mit einer frisch angesetzten Natriummethanolatlösung (1 %) auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Dazu wurden unter Kontrolle des pH-Werts 1.01 g (1.49 mmol) Chitobioseoctaacetat (**2**) gegeben und das Gemisch für 16 h bei RT gerührt. (DC-Kontrolle: CHCl₃/MeOH (1:1), R_f = 0.23) Anschließend wurde die Suspension durch Zugabe von Trockeneis neutralisiert (pH-Wert 5 - 7). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der erhaltene Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet. Dieser wurde anschließend mit Hilfe einer Biogelsäule (Porengröße P2, Laufmittel: Wasser) gereinigt.

Ausbeute:

Es wurden 528 mg (1.25 mmol) Produkt (**3**) als α/β -Anomerengemisch (5:1) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 84 %.

Charakterisierung:

IUPAC-Name: 2-Acetamido-2-desoxy-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose

Farbloser Feststoff

Summenformel: C₁₆H₂₈N₂O₁₁

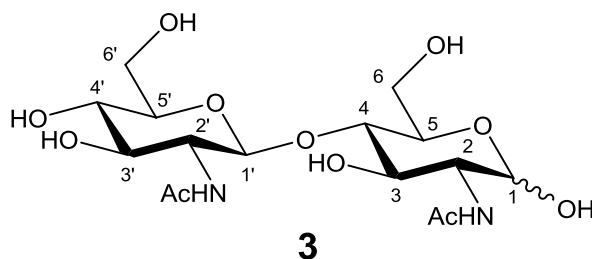
Molmasse: 424.41 g/mol

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = +17^\circ$ (c = 1.0, H₂O) [Lit: $[\alpha]_{\text{D}}^{30} = +18.5^\circ$ (c = 1.0, H₂O)]^[334]

Schmelzpunkt: 252 °C [Lit: 245 – 247 °C]^[334]

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH (1:1)) = 0.33

MALDI-TOF-MS: m/z = 425.2 [M+H]⁺; 447.4 [M+Na]⁺



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 300 K):

δ [ppm] = 5.06 (*d*, 1H, $^3J_{1\alpha,2} = 3.9$ Hz, H-1 α), 4.59 (*d*, 1H, $^3J_{1\beta,2} = 8.8$ Hz, H-1 β), 4.48 (*d*, 1H, $^3J_{1'\beta,2'} = 8.3$ Hz, H-1' β), 3.87 – 3.28 (*m*, 12H, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b), 2.04, 2.00 (2 x *s*, 6H, NH-C(O)CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, 300 K):

δ [ppm] = 100.3 (C-1'), 93.7 (C-1 α), 89.3 (C-1 β), 78.1 (C-4), 74.8 (C-5'), 73.4 (C-5), 72.3 (C-3'), 71.0 (C-3), 68.7 (C-4'), 59.0 (C-6'), 58.9 (C-6), 54.6 (C-2), 54.0 (C-2'), 22.2, 22.5 (2 x NH-C(O)CH₃).

7.3.4 Darstellung von Chitobiosylamin (4)

Variante 1

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Likhosherstov *et al.* durchgeführt.^[296]

Zu 1.01 g (2.36 mmol) Di-*N*-Acetylchitobiose (**3**) wurden 2 mL gesättigte Ammoniumhydrogencarbonatlösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h bei 47 °C gerührt, wobei durch wiederholte Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat eine Sättigung des Reaktionsansatzes gewährleistet wurde. Es erfolgte eine dünnschichtchromatografische Reaktionskontrolle (EtOAc/MeOH/H₂O (4:3:2), R_f = 0.29). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der verbliebene Feststoff mehrfach in je 10 mL kaltem Wasser aufgenommen und bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet.

Ausbeute:

Es wurden 931 mg (2.20 mmol) Produkt (**4**) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 93 %.

Charakterisierung:

IUPAC-Name: 2-Acetamido-2-desoxy-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosylamin

Gelblicher/farbloser Feststoff

Summenformel: C₁₆H₂₉N₃O₁₀

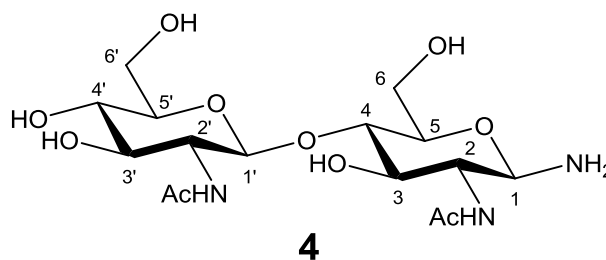
Molmasse: 423.42 g/mol

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = +28^\circ$ (c = 1.0, H₂O)

Schmelzpunkt: 263 °C

R_f-Wert (EtOAc/MeOH/H₂O (4:3:2)) = 0.32

MALDI-TOF-MS: m/z = 424.3 [M+H]⁺; 446.2 [M+Na]⁺



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 300 K):

δ [ppm] = 4.66 (*d*, 1H, ³J_{1',2'} = 7.7 Hz, H-1'**β**), 4.17 (*d*, 1H, ³J_{1,2} = 8.7 Hz, H-1**β**), 3.95 (*dd*, 1H, ²J_{6'a,6'b} = 12.3 Hz, ³J_{6'a,5'} = n. b., H-6'**a**), 3.83 (*dd*, 1H, ²J_{6a,6b} = 12.1 Hz, ³J_{6a,5} = n. b., H-6**a**), 3.82 – 3.49 (*m*, 10H, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6**b**, H-6'**b**), 2.09, 2.07 (2 x *s*, 6H, NH-C(O)CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, 300 K):

δ [ppm] = 101.5 (C-1'), 84.2 (C-1), 79.8 (C-4), 75.9 (C-5'), 75.4 (C-5), 73.5 (C-3'), 73.2 (C-3), 69.7 (C-4'), 60.6 (C-6'), 60.3 (C-6), 55.8 (C-2), 55.6 (C-2'), 22.3, 22.1 (2 x NH-C(O)CH₃).

Variante 2

Die Synthese wurde analog der Vorschrift von Hackenberger *et al.* mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Tabelle 17).^[297]

Zu einer Suspension aus Di-*N*-Acetylchitobiose (**3**) in Methanol wurde Ammoniumcarbamat zugegeben und bei 37 °C gerührt. Danach wurde für eine Stunde bei 0 °C gerührt und der farblose Niederschlag abfiltriert. Dieser wurde zweimal mit kaltem Methanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum für zehn Sekunden getrocknet.

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen für die Umsetzung zum Chitobiosylamin (4).

Synthese	Reaktionsdauer [h]	Reaktanden	R _f -Wert	Ausbeute
a	16	0.51 g (1.19 mmol) Di- <i>N</i> -Acetylchitobiose; 0.29 g (3.69 mmol) Ammoniumcarbamat; 12 mL Methanol	0.36	81 % (0.36 g, 0.94 mmol)
b	30	0.49 g (1.19 mmol) Di- <i>N</i> -Acetylchitobiose; 0.28 g (3.69 mmol) Ammoniumcarbamat; 12 mL Methanol	0.30	81 % (0.32 g, 0.94 mmol)
c	72	0.18 g (1.19 mmol) Di- <i>N</i> -Acetylchitobiose; 0.11 g (1.40 mmol) Ammoniumcarbamat; 10 mL Methanol	0.38	57 % (0.09 g, 0.22 mmol)

Es wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen des erhaltenen farblosen Feststoffes nach der Trocknung im Ölpumpenvakuum für zehn Minuten durchgeführt. Die Anwesenheit des Produkts konnte auf diesem Weg nicht erbracht werden. Die Diskussion dieser Reaktion befindet sich in Kapitel 4.1.2.

7.3.5 Darstellung des *t*Bu-geschützten *N*_γ-Chitobiosylasparagin-Bausteins (5)

Ausbeute:

Es wurden 1.14 g (1.11 mmol) Produkt (5) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 56 % bezogen auf Fmoc-L-Asp-*Ot*Bu.

Charakterisierung:

IUPAC-Name: *O*¹-*t*Butyl-*N*²-(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*N*⁴-[3,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]-asparagin

Farbloser Feststoff

Summenformel: C₄₉H₆₂N₄O₂₀

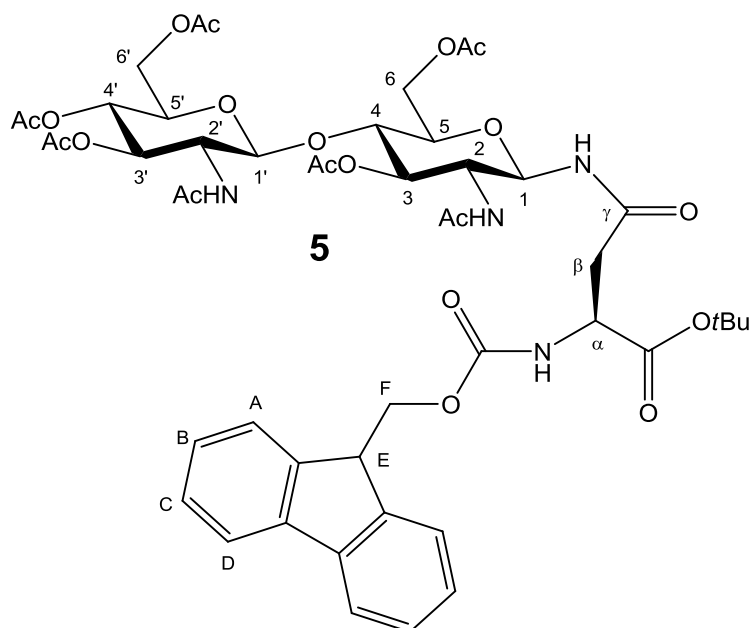
Molmasse: 1027.05 g/mol

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = + 2.9^\circ$ (c = 1.0, DMF)

Schmelzpunkt: 237 – 238 °C

R_f-Wert (CHCl₃/MeOH (9:1)) = 0.5

MALDI-TOF-MS: m/z = 1028.1 [M+H]⁺; 1050.4 [M+Na]⁺



¹H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K):

δ [ppm] = 8.51 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H1}} = 8.7$ Hz, NH α), 8.00 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc',H2'}} = 8.8$ Hz, NHAc'), 7.93-7.89 (*m*, 2H, H-A/H-D), 7.84 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc,H2}} = 9.3$ Hz, N-HAc), 7.74-7.72 (*m*, 2H, H-A/H-D), 7.51 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H1}} = 8.6$ Hz, N-H γ), 7.43-7.40 (*m*, 2H, H-B/H-C), 7.32-7.30 (*m*, 2H, H-B/H-C), 5.14 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H3',H2'}} = 10.2$ Hz, $^3J_{\text{H3',H4'}} = 10.2$ Hz, H-3'), 5.07 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H1,NH}\gamma} = 9.4$ Hz, H-1 β), 4.96 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.4$ Hz, H-3), 4.82 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H4',H3'}} = 9.8$ Hz, $^3J_{\text{H4',H5'}} = 9.8$ Hz, H-4'), 4.67 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H1',H2'}} = 8.7$ Hz, H-1' β), 4.35-4.38 (*m*, 2H, H-F), 4.30 (*m*, 1H, H- α), 4.27 (*m*, 1H, H-6a), 4.23 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H6'b,H6'a}} = 12.1$ Hz, $^3J_{\text{H6'b,H5'}} = 6.8$ Hz, H-6'a), 3.97 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{H6b,H5}} = 5.5$ Hz, H-6b), 3.91 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H6'a,H6'b}} = 11.8$ Hz, $^3J_{\text{H6'a,H5'}} = 6.3$ Hz, H-6'b), 3.81 (*m*, 2H, H-2', H-2), 3.72 – 3.68 (*m*, 1H, H-4), 3.61 – 3.49 (*m*, 2H, H-5, H-5'), 3.45-3.36 (*m*, 1H, H-E), 2.64 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H}\beta,\text{H}\beta'} = 5.5$ Hz, $^3J_{\text{H}\beta,\text{H}\alpha} = 16.6$ Hz, H- β), 2.48 (*m*, 1H, H- β'), 2.05, 2.02, 1.96, 1.95, 1.91 (5 x *s*, 15H, COCH₃), 1.75, 1.70 (2 x *s*, 6H, NHCOCH₃), 1.36 (*s*, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K):

δ [ppm] = 170.4 (C- γ), 170.0, 169.6, 169.6, 169.4, 169.3, 169.2, 169.1 (7 x C(O)CH₃), 155.8 (C(O)O-Fmoc), 143.8 (C-C), 140.7 (C-H), 127.6 (C-B/C), 127.0 (C-B/C), 125.2 (C-A), 120.1 (C-D), 100.0 (C-1'), 80.7 (C(O)(CH₃)₃), 77.8 (C-1), 75.5 (C-4), 74.1 (C-5), 73.5 (C-3), 72.3 (C-3'), 70.4 (C-5'), 68.3 (C-4'), 62.6 (C-6'), 61.6 (C-6), 53.8 (C-2'), 52.3 (C-2), 50.7 (C- α), 37.0 (C- β), 27.5 (O-(CH₃)₃), 22.6, 22.5 (2 x NH-C(O)CH₃), 20.7, 20.5, 20.4, 20.3, 20.2 (5 x C(O)CH₃).

7.3.6 Darstellung des N_γ -Chitobiosylasparagin-Bausteins (6)

Ausbeute:

Es wurden 810 mg (0.83 mmol) Produkt (6) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 75 %.

Charakterisierung:

IUPAC-Name: N^2 -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N^4 -[3,6-di-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy-4-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-asparagin

Farbloser Feststoff

Summenformel: $C_{45}H_{54}N_4O_{20}$

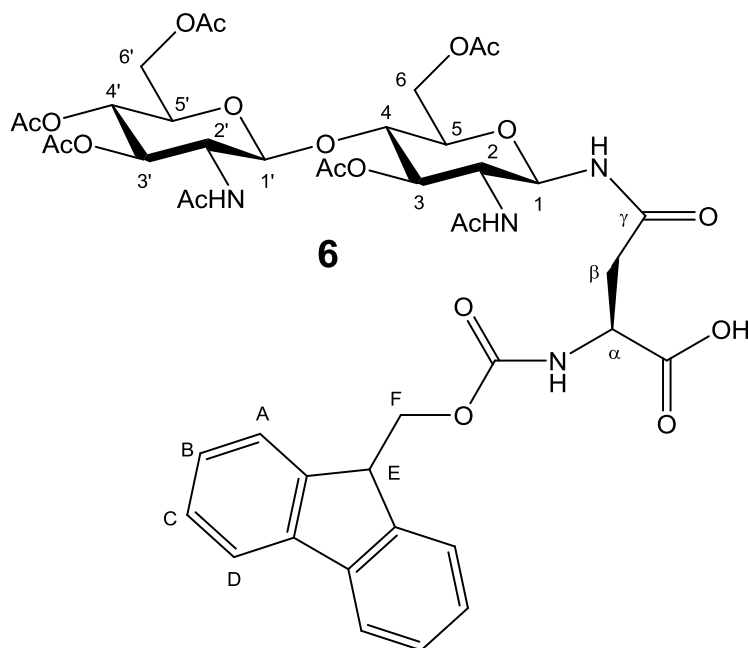
Molmasse: 970.94 g/mol

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = +4.5^\circ$ (c = 0.6, DMF)

R_f -Wert (CHCl₃/MeOH (5:1)) = 0.64

MALDI-TOF-MS: m/z = 971.9 [M+H]⁺

Im ¹H-Spektrum war eindeutig zu erkennen, dass die Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe erfolgreich verlaufen war. Daher wurde auf die Charakterisierung mittels ¹³C-NMR verzichtet.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K):

δ [ppm] = 8.47 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H1}} = 8.9$ Hz, **NH_a**), 7.97 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc',H2'}} = 10.0$ Hz, **NHAc'**), 7.92-7.84 (*m*, 2H, **H-A/H-D**), 7.80 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NHAc,H2}} = 9.5$ Hz, **NHAc**), 7.75-7.62 (*m*, 2H, **H-A/H-D**), 7.48 (*d*, 1H, $^3J_{\text{NH,H1}} = 8.2$ Hz, **NH_γ**), 7.44-7.37 (*m*, 2H, **H-B/H-C**), 7.35-7.28 (*m*, 2H, **H-B/H-C**), 5.13 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H3',H2'}} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H3',H4'}} = 10.0$ Hz, **H-3'**), 5.06 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H1,NHγ}} = 9.4$ Hz, **H-1β**), 4.96 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.3$ Hz, **H-3**), 4.81 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H4',H3'}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H4',H5'}} = 9.7$ Hz, **H-4'**), 4.66 (*d*, 1H, $^3J_{\text{H1',H2'}} = 8.3$ Hz, **H-1'β**), 4.39-4.32 (*m*, 2H, **H-F**), 4.32 – 4.23 (*m*, 2H, **H-α**, **H-6a**), 4.23 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H6'b,H6'a}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H6'b,H5'}} = 6.5$ Hz, **H-6'a**), 3.97 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{H6b,H5}} = 5.5$ Hz, **H-6b**), 3.90 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{H6'a,H6'b}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H6'a,H5'}} = 6.3$ Hz, **H-6'b**), 3.79 (*m*, 2H, **H-2'**, **H-2**), 3.70 (*dd*, 1H, $^3J_{\text{H4',H3'}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{H4',H5'}} = 9.1$ Hz, **H-4**), 3.61 – 3.45 (*m*, 3H, **H-5**, **H-5'**, **H-E**), 2.63 (*dd*, 1H, $^2J_{\text{Hβ,Hβ'}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{Hβ,Hα}} = 16.0$ Hz, **H-β**), 2.04, 2.01, 1.95, 1.94, 1.90 (5 x *s*, 15H, **COCH₃**), 1.74, 1.69 (2 x *s*, 6H, **NH-C(O)CH₃**). **H-β'** befand sich unter dem Lösungsmittelsignal.

7.4 Darstellung der peptidischen Liganden

Um die Auswertung zu erleichtern, wurden die NMR-Spektren zur Peptid-Charakterisierung bei der gleichen Temperatur (285 K), wie sie für die STD-NMR-Messungen angewendet wurde, akquiriert. Des Weiteren wurden die Spektren sowohl bei pH 3.0 sowie bei pH 7.4 aufgenommen. Der pH-Wert von 7.4 entspricht den Bedingungen der STD-NMR-Messungen.

7.4.1 Darstellung des Peptids **v3con**



Die Darstellung des Peptids **v3con** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 21 % (21.4 μmol).

Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt. Nach der folgenden Etherextraktion (nach AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 73 % (119.4 mg, 73.3 μmol) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte präparativ gemäß AAV8. 25 mg des Peptids wurden in 1 mL Laufmittel gelöst. Zur Trennung wurde der folgende Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 80/20 (1 min) \rightarrow 75/25 (18 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 90/10 (2 min) \rightarrow 90/10 (0.5 min), Flussrate 20 mL/min. Die Retentionszeit betrug 6.9 min (Anteil Laufmittel A: 79 %).

Das Peptid **v3con** wurde mit einer Ausbeute von 14 % (23.3 mg, 14.3 μmol) und einer Reinheit von 71 % erhalten. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Peptids **v3con** wurde gemäß AAV9 durchgeführt. [$M_w(\mathbf{v3con}) = 1636.8 \text{ g/mol}$, MALDI-TOF-MS: $m/z = 1638.4 [M+H]^+$; 1659.6 $[M+Na]^+$; 1675.6 $[M+K]^+$]. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde gemäß AAV11 durchgeführt.

Tabelle 18: $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3con*.

Die Messung wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	NH ($^3J_{\text{NH-H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Ser296	-	3.992	3.749	3.749	-	-	-	-	-	-
Thr297	8.503 (7.3)	3.903	4.137	-	0.953	-	-	-	-	-
Arg298	8.379 (6.6)	4.372	1.598	1.598	1.442	1.442	2.965	2.965	6.983	-
Pro299	-	4.162	2.047	2.047	1.773	1.773	3.590	3.395	-	-
Asn300	8.425 (6.8)	4.469	2.575	2.536	-	-	-	-	-	CONH ₂ : 6.736/7.457
Asn301	8.332 (6.7)	4.470	2.594	2.516	-	-	-	-	-	6.736/7.443
Asn302	8.248 (6.7)	4.528	2.692	2.633	-	-	-	-	-	6.717/7.422
Thr303	7.931 (7.4)	3.903	4.040	-	0.953	-	-	-	-	-
Arg304	8.160 (7.5)	4.079	1.578	1.521	1.402	1.402	2.946	2.946	6.953	-
Lys305	8.185 (7.2)	4.196	1.559	1.500	1.189	1.189	1.422	1.422	2.731	NH ₂ : 7.332
Ser306	8.187 (7.3)	4.196	3.571	3.571	-	-	-	-	-	-
Ile307	8.012 (6.4)	3.923	1.578	-	0.601	1.110	0.601	-	-	γ'' : 0.895
His308	8.479 (6.7)	4.470	2.946	2.946	-	-	-	-	-	2H: 8.365 4H: 7.010
Ile309	8.114 (7.8)	3.845	1.539	-	0.641	1.208	0.641	-	-	γ'' : 0.914
CONH₂	7.546/6.912									

7.4.2 Darstellung des Glycopeptids *v3cong*



(N: Asn-(β -D-GlcNAc- β 1,4-D-GlcNAc))

Die Darstellung des Glycopeptids **v3cong** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 50 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 60 % (29.8 μmol).

Die Entschützung der Hydroxylgruppen des Chitobiosylbausteins erfolgte gemäß AAV3. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt. Nach der folgenden Etherextraktion (nach AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 57 % (58.1 mg, 28.5 μmol) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte präparativ gemäß AAV8. 25 mg des Peptids wurden in 1 mL Laufmittel gelöst. Zur Trennung wurde der folgende Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 80/20 (1 min) \rightarrow 75/25 (18 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 90/10 (2 min) \rightarrow 90/10 (0.5 min), Flussrate 20 mL/min. Die Retentionszeit betrug 7.2 min (Anteil Laufmittel A: 81 %).

Das Glycopeptid **v3cong** wurde mit einer Ausbeute von 15 % (15.3 mg, 7.5 μmol) und einer Reinheit von 87 % erhalten. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Peptids **v3con** wurde gemäß AAV9 durchgeführt. $[M_{\text{w}}(\mathbf{v3cong}) = 2042.3 \text{ g/mol}$, MALDI-TOF-MS: $m/z = 2043.8 [M+H]^+$; $2065.5 [M+Na]^+$; $2081.2 [M+K]^+$). Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde gemäß AAV11 durchgeführt.

Tabelle 19: ^1H -NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3cong*.

Die Messung wurde in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	NH ($^3J_{\text{NH-H}\alpha}$)	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Ser296	-	3.992	3.749	3.749	-	-	-	-	-	-
Thr297	8.501 (7.9)	4.139	3.885	-	0.955	-	-	-	-	-
Arg298	8.379 (6.1)	4.394	1.580	1.580	1.444	1.444	2.967	2.967	6.983	-
Pro299	-	4.174	2.049	2.049	1.776	1.776	3.574	3.377	-	-
Asn300	8.382 (7.3)	4.472	2.557	2.557	-	-	-	-	-	CONH ₂ :
Asn301	8.304 (7.3)	4.491	2.577	2.518	-	-	-	-	-	6.738/7.465
Asn302	8.287 (7.4)	4.491	2.596	2.518	-	-	-	-	-	6.738/7.443 6.718/7.411
Thr303	7.940 (7.2)	4.022	3.964	-	0.955	-	-	-	-	-
Arg304	8.169 (5.4)	4.061	1.580	1.511	1.385	1.385	2.946	2.946	6.955	-
Lys305	8.200 (7.3)	4.061	1.561	1.561	1.189	1.189	1.502	1.502	2.733	NH ₂ : 7.333
Ser306	8.193 (7.2)	4.198	3.573	3.573	-	-	-	-	-	-
Ile307	8.017 (7.3)	3.925	1.561	-	0.601	1.110	0.601	-	-	γ'' : 0.895
His308	8.476 (7.2)	4.472	2.909	2.909	-	-	-	-	-	2H: 8.364 4H: 7.011
Ile309	8.112 (7.3)	3.846	1.522	-	0.643	1.209	0.643	-	-	γ'' : 0.916
CONH ₂	7.544/6.914									

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a/b	NHAc
GlcNAc	8.494 (9.1)	8.053	4.765	3.494	3.497	3.397	3.280	*/*	1.745
GlcNAc'	-	8.252 (10.1)	4.315	3.651	3.495	3.221	3.299	*/*	1.803

Tabelle 20: ^1H -NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3cong*.

Die Messung wurde in D_2O bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Ser296	4.027	3.787	3.787	-	-	-	-	-	-
Thr297	4.178	3.928	-	0.993	-	-	-	-	-
Arg298	4.110	1.618	1.618	1.480	1.480	3.017	3.017	-	-
Pro299	4.209	2.087	2.087	1.814	1.677	3.630	3.416	-	-
Asn300	4.432	2.601	2.584	-	-	-	-	-	-
Asn301	4.509	2.578	2.541	-	-	-	-	-	-
Asn302	4.510	2.645	2.611	-	-	-	-	-	-
Thr303	4.059	3.982	-	0.974	-	-	-	-	-
Arg304	4.099	1.638	1.559	1.406	1.406	2.983	2.983	-	-

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Lys305	4.099	1.599	1.599	1.208	1.208	1.462	1.462	2.770	NH ₂ : *
Ser306	4.217	3.615	3.615	-	-	-	-	-	-
Ile307	3.960	1.599	-	0.622	1.150	0.622	-	-	γ'' : 0.915
His308	4.510	2.971	2.971	-	-	-	-	-	2H: 8.411 4H: 7.050
Ile309	3.894	1.560	-	0.681	1.228	0.681	-	-	γ'' : 0.935

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a/b	NHAc
GlcNAc	-	-	4.802	3.625	3.514	3.416	3.318	*/*	1.780
GlcNAc'	-	-	4.370	3.689	3.514	3.259	3.376	*/*	1.837

7.4.3 Darstellung des Peptids **v3ct15**



Die Darstellung des Peptids **v3ct15** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 49 % (48.9 μmol).

Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt. Nach der folgenden Etherextraktion (nach AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 97 % (156.8 mg, 96.9 μmol) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte semipräparativ gemäß AAV8. 5 mg des Peptids wurden in 350 μL Laufmittel gelöst. Zur Trennung wurde der folgende Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 100/0 \rightarrow 75/25 (2 min) \rightarrow 30/70 (18 min) \rightarrow 0/100 (1 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 100/0 (2 min) \rightarrow 100/0 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 8.0 min (Anteil Laufmittel A: 59 %).

Das Peptid **v3ct15** wurde mit einer Ausbeute von 12 % (19.9 mg, 12.3 μmol) und einer Reinheit von 97 % erhalten. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Peptids **v3ct15** wurde gemäß AAV9 durchgeführt. [$M_w(\text{v3ct15}) = 1615.8 \text{ g/mol}$, MALDI-TOF-MS: $m/z = 1617.0 [M+H]^+$; 1638.2 $[M+Na]^+$; 1654.6 $[M+K]^+$]. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde gemäß AAV11 durchgeführt.

Tabelle 21: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3ct15*.

Die Messung wurde in H₂O/D₂O (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	NH (³ J _{NH-Hα})	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ε	andere Protonen
Tyr316	-	3.957	2.934	2.817	-	-	6.900	-	6.607	-
Ala317	8.378 (6.7)	4.204	1.137	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	8.096 (6.7)	4.028	3.970	-	1.000	-	-	-	-	-
Gly319	8.296 (6.1)	3.716	3.716	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	8.145 (7.3)	4.478	2.641	2.563	-	-	-	-	-	-
Ile321	8.020 (7.9)	3.911	1.625	-	0.609	1.196	0.609	-	-	γ ^{''} : 0.922
Ile322	8.072 (7.3)	3.852	1.605	-	0.648	1.215	0.648	-	-	γ ^{''} : 0.942
Gly323	8.250 (6.0)	3.677	3.677	-	-	-	-	-	-	-
Asp324	8.107 (7.3)	4.478	2.661	2.583	-	-	-	-	-	-
Ile325	7.943 (7.3)	3.892	1.625	-	0.629	1.215	0.629	-	-	γ ^{''} : 0.942
Arg326	8.229 (6.7)	4.067	1.567	1.508	1.391	1.333	2.934	2.934	6.970	-
Gln327	8.178 (7.0)	4.028	1.801	1.703	2.114	2.114	-	-	-	NH ₂ : 6.705/7.354
Ala328	8.245 (5.1)	3.989	1.089	-	-	-	-	-	-	-
His329	8.377 (7.3)	4.478	3.032	2.973	-	-	-	-	-	2H: 8.365 4H: 7.010
Ser330	8.173 (7.3)	4.165	3.618	3.618	-	-	-	-	-	-
CONH₂	7.535/6.998									

Tabelle 22: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3ct15*.

Die Messung wurde in D₂O bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ε	andere Protonen
Tyr316	3.993	2.962	2.854	-	-	-	-	-	-
Ala317	4.246	1.168	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	4.069	3.997	-	1.027	-	-	-	-	-
Gly319	3.787	3.787	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	4.495	2.646	2.646	-	-	-	-	-	-
Ile321	3.888	1.633	-	0.675	1.253	0.675	-	-	γ ^{''} : 0.969
Ile322	3.949	1.662	-	0.646	1.233	0.646	-	-	γ ^{''} : 0.950
Gly323	3.728	3.728	-	-	-	-	-	-	-
Asp324	4.496	2.683	2.600	-	-	-	-	-	-
Ile325	3.921	1.672	-	0.666	1.242	0.666	-	-	γ ^{''} : 0.978
Arg326	4.096	1.604	1.545	1.428	1.378	2.971	2.971	-	-
Gln327	4.071	1.857	1.731	2.131	2.131	-	-	-	-
Ala328	4.025	-	1.125	-	-	-	-	-	-
His329	4.505	3.082	2.991	-	-	-	-	-	2H: 8.365 4H: 7.010
Ser330	4.198	3.636	3.636	-	-	-	-	-	-

7.4.4 Darstellung des Peptids **v3ct21**



Die Darstellung des Peptids **v3ct21** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 45 % (45.2 μmol).

Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt. Nach der folgenden Etherextraktion (nach AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 65 % (143.2 mg, 65.0 μmol) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte semipräparativ in zwei Schritten gemäß AAV8. 5 mg des Peptids wurden in 350 μL Laufmittel gelöst. Für den ersten Reinigungsschritt wurde folgender Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 100/0 \rightarrow 100/0 (2 min) \rightarrow 50/50 (30 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 100/0 (2 min) \rightarrow 100/0 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 20.7 min (Anteil Laufmittel A: 69 %).

Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mit folgendem Gradienten: Eluent A/Eluent B 80/20 \rightarrow 80/20 (1 min) \rightarrow 76/24 (13 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 80/20 (2 min) \rightarrow 80/20 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 7.4 min (Anteil Laufmittel A: 78 %).

Das Peptid **v3ct21** wurde mit einer Ausbeute von 8 % (17.4 mg, 7.9 μmol) und einer Reinheit von 86 % erhalten. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Peptids **v3ct21** wurde gemäß AAV9 durchgeführt. [$M_w(\mathbf{v3ct21}) = 2201.4 \text{ g/mol}$, MALDI-TOF-MS: $m/z = 2202.7 [M+H]^+$; 2224.8 $[M+Na]^+$; 2240.5 $[M+K]^+$]. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde gemäß AAV11 durchgeführt.

Tabelle 23: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids v3ct21.

Die Messung wurde in H₂O/D₂O (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	NH (³ J _{NH-Hα})	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ε	andere Protonen
Gly310	-	3.831	3.831	-	-	-	-	-	-	-
Pro311	-	4.260	2.050	2.020	1.757	1.757	3.632	3.359	-	-
Gly312	8.402 (5.5)	3.769	3.710	-	-	-	-	-	-	-
Arg313	8.072 (6.5)	4.043	1.555	1.483	1.355	1.355	2.929	2.929	6.946	-
Ala314	8.204 (6.2)	4.020	1.034	-	-	-	-	-	-	-
Phe315	7.965 (6.7)	4.257	2.734	2.734	-	-	-	-	-	δ/ε/ξ: 6.895/7.085
Tyr316	7.783 (7.9)	4.262	2.782	2.740	-	-	6.862	-	6.563	-
Ala317	7.984 (5.5)	4.082	1.152	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	7.908 (6.7)	4.024	4.024	-	0.995	-	-	-	-	-
Gly319	8.220 (5.8)	3.749	3.710	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	8.128 (7.3)	4.472	2.636	2.558	-	-	-	-	-	-
Ile321	7.999 (7.6)	3.925	1.648	-	0.624	1.229	0.624	-	-	γ ^{''} : 0.936
Ile322	8.071 (7.1)	3.866	1.620	-	0.648	1.151	0.604	-	-	γ ^{''} : 0.956
Gly323	8.255 (5.5)	3.696	3.696	-	-	-	-	-	-	-
Asp324	8.097 (7.4)	4.472	2.656	2.577	-	-	-	-	-	-
Ile325	7.964 (7.0)	3.906	1.659	-	0.663	1.229	0.663	-	-	γ ^{''} : 0.975
Arg326	8.234 (6.7)	4.071	1.588	1.542	1.405	1.366	2.968	2.968	7.027	-
Gln327	8.161 (7.0)	4.062	1.835	1.718	2.128	2.128	-	-	-	NH ₂ : 6.718/7.371
Ala328	8.224 (5.5)	4.003	1.112	-	-	-	-	-	-	-
His329	8.376 (6.7)	4.492	3.065	2.987	-	-	-	-	-	2H: 8.383 4H: 7.090
Ser330	8.177 (7.0)	4.188	3.632	3.632	-	-	-	-	-	-
CONH₂	7.545/7.012									

Tabelle 24: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids v3ct21.

Die Messung wurde in D₂O bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ε	andere Protonen
Gly310	3.841	3.841	-	-	-	-	-	-	-
Pro311	4.274	2.049	2.049	1.774	1.774	3.666	3.357	-	-
Gly312	3.794	3.707	-	-	-	-	-	-	-
Arg313	4.061	1.561	1.482	1.365	1.365	2.928	2.928	-	-
Ala314	4.033	1.032	-	-	-	-	-	-	-
Phe315	4.263	2.753	2.753	-	-	-	-	-	δ/ε/ξ: 6.893/7.092
Tyr316	4.282	2.751	2.615	-	-	6.873	-	6.581	-
Ala317	4.111	1.169	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	4.033	4.033	-	1.032	-	-	-	-	-
Gly319	3.768	3.768	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	4.462	2.517	2.517	-	-	-	-	-	-
Ile321	3.944	1.658	-	0.642	1.228	0.642	-	-	γ ^{''} : 0.954
Ile322	3.884	1.638	-	1.248	0.954	0.681	-	-	γ ^{''} : 0.681
Gly323	3.717	3.717	-	-	-	-	-	-	-

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Asp324	4.473	2.615	2.615	-	-	-	-	-	-
Ile325	3.927	1.697	-	0.681	1.247	0.681	-	-	γ'' : 0.993
Arg326	4.078	1.580	1.482	1.384	1.384	2.949	2.949	-	-
Gln327	4.062	1.853	1.736	2.126	2.126	-	-	-	-
Ala328	4.008	1.111	-	-	-	-	-	-	-
His329	4.510	3.093	2.986	-	-	-	-	-	2H: 8.410 4H: 7.089
Ser330	4.204	3.631	3.631	-	-	-	-	-	-

7.4.5 Darstellung des Peptids **v30**



Die Darstellung des Peptids **v30** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 37 % (37.1 μmol).

Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt. Nach der folgenden Etherextraktion (nach AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 40 % (154.0 mg, 40.4 μmol) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte semipräparativ in zwei Schritten gemäß AAV8. 5 mg des Peptids wurden in 350 μL Laufmittel gelöst. Für den ersten Reinigungsschritt wurde folgender Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (3 min) \rightarrow 60/40 (30 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 90/10 (2 min) \rightarrow 90/10 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 16.8 min (Anteil Laufmittel A: 73 %).

Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mit folgendem Gradienten: Eluent A/Eluent B: 80/20 \rightarrow 80/20 (1 min) \rightarrow 70/30 (14 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 80/20 (2 min) \rightarrow 80/20 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 6.4 min (Anteil Laufmittel A: 74 %).

Das Peptid **v30** wurde mit einer Ausbeute von 3 % (12.2 mg, 3.2 μmol) und einer Reinheit von 91 % erhalten. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Peptids **v30** wurde gemäß AAV9 durchgeführt. [$M_w(\mathbf{v30}) = 3821.2 \text{ g/mol}$, MALDI-TOF-MS: $m/z = 3822.5 [M+H]^+$; 3843.4 $[M+Na]^+$]. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde gemäß AAV11 durchgeführt.

Tabelle 26: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids v3o.Die Messung wurde in D₂O bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Ser296	4.031	3.786	3.786	-	-	-	-	-	-
Thr297	3.939	4.180	-	0.994	-	-	-	-	-
Arg298	4.412	1.659	1.659	1.541	1.486	3.004	3.004	-	-
Pro299	4.205	2.067	2.067	1.795	1.677	3.631	3.416	-	-
Asn300	4.452	2.578	2.578	-	-	-	-	-	-
Asn301	4.530	2.617	2.556	-	-	-	-	-	-
Asn302	4.510	2.617	2.532	-	-	-	-	-	-
Thr303	4.072	4.072	-	0.994	-	-	-	-	-
Arg304	4.080	1.619	1.619	1.477	1.477	2.974	2.974	-	-
Lys305	4.100	1.599	1.540	1.207	1.207	1.462	1.462	2.766	-
Ser306	4.217	3.602	3.602	-	-	-	-	-	-
Ile307	4.001	1.599	-	0.681	1.209	0.603	-	-	γ'' : 0.914
His308	4.510	2.987	2.987	-	-	-	-	-	2H: 8.374 4H: 7.030
Ile309	3.939	1.658	-	0.642	1.228	0.642	-	-	γ'' : 0.994
Gly310	3.874	3.865	-	-	-	-	-	-	-
Pro311	4.231	2.030	2.030	1.775	1.775	3.650	3.416	-	-
Gly312	3.710	3.710	-	-	-	-	-	-	-
Arg313	4.042	1.560	1.560	1.463	1.345	2.923	2.923	-	-
Ala314	4.019	1.013	-	-	-	-	-	-	-
Phe315	4.274	2.732	2.732	-	-	-	-	-	$\delta/\epsilon/\xi$: 6.887/7.050
Tyr316	4.292	2.733	2.615	-	-	6.862	-	6.561	-
Ala317	4.022	1.035	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	4.070	4.070	-	0.993	-	-	-	-	-
Gly319	3.730	3.730	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	4.490	2.636	2.562	-	-	-	-	-	-
Ile321	3.965	1.599	-	0.622	1.111	0.622	-	-	γ'' : 0.916
Ile322	3.926	1.697	-	0.681	1.228	0.681	-	-	γ'' : 0.954
Gly323	3.691	3.691	-	-	-	-	-	-	-
Asp324	4.490	2.636	2.562	-	-	-	-	-	-
Ile325	3.883	1.638	-	0.681	1.247	0.681	-	-	γ'' :0.935
Arg326	4.080	1.619	1.619	1.477	1.477	2.974	2.974	-	-
Gln327	4.066	1.873	1.736	2.127	2.127	-	-	-	-
Ala328	4.022	1.111	-	-	-	-	-	-	-
His329	4.510	3.091	2.988	-	-	-	-	-	2H: 8.408 4H: 7.089
Ser330	4.200	3.631	3.631	-	-	-	-	-	-

7.4.6 Darstellung des Glycopeptids **v3og**



(N: Asn-(β -D-GlcNAc- β 1,4-D-GlcNAc))

Die Darstellung des Glycopeptids **v3og** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 42 % (41.6 μmol).

Die Entschützung der Hydroxylgruppen des Chitobiosylbausteins erfolgte gemäß AAV3. Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt. Nach der folgenden Etherextraktion (nach AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 28 % (122.6 mg, 28.1 μmol) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte semipräparativ in zwei Schritten gemäß AAV8. 5 mg des Peptids wurden jeweils in 350 μL Laufmittel gelöst. Für den ersten Reinigungsschritt wurde folgender Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (3 min) \rightarrow 50/50 (30 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 90/10 (2 min) \rightarrow 90/10 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 17.4 min (Anteil Laufmittel A: 69 %).

Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mit folgendem Gradienten: Eluent A/Eluent B 80/20 \rightarrow 80/20 (1 min) \rightarrow 70/30 (12 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 80/20 (2 min) \rightarrow 80/20 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min. Die Retentionszeit betrug 6.4 min (Anteil Laufmittel A: 73 %).

Das Peptid **v3og** wurde mit einer Ausbeute von 1 % (4.8 mg, 1.1 μmol) und einer Reinheit von 94 % erhalten. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Peptids **v3og** wurde gemäß AAV9 durchgeführt. [$M_w(\text{v3og}) = 4226.7 \text{ g/mol}$, MALDI-TOF-MS: $m/z = 4228.0 [M+H]^+$]. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde gemäß AAV11 durchgeführt.

Tabelle 27: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3og*.

Die Messung wurde in H₂O/D₂O (9:1) bei einem pH-Wert von 3.0 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt. Die Protonen der mit (*) gekennzeichneten Aminosäuren liegen übereinander.

AS	NH (³ J _{NH-Hα})	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ε	andere Protonen
Ser296	-	4.024	3.769	3.769	-	-	-	-	-	-
Thr297	8.511 (7.9)	4.159	3.925	-	0.994	-	-	-	-	-
Arg298	8.379 (6.1)	4.413	1.601	1.522	1.463	1.463	*	*	6.990	-
Pro299	-	4.196	2.069	2.069	1.796	1.796	3.632	3.397	-	-
Asn300	8.388 (7.3)	4.433	2.577	2.577	-	-	-	-	-	CONH ₂ :
Asn301	8.314 (6.7)	4.511	2.597	2.538	-	-	-	-	-	6.738/7.426
Asn302	8.288 (6.7)	4.511	2.616	2.558	-	-	-	-	-	6.758/7.458
Thr303	7.951 (6.8)	4.042	4.042	-	0.975	-	-	-	-	6.758/7.480
Arg304	8.171 (7.3)	4.062	1.620	1.541	1.424	1.366	2.929	2.929	6.990	-
Lys305	8.188 (8.2)	4.081	1.522	1.580	1.209	1.209	1.444	1.444	*	NH ₂ : 7.358
Ser306	8.182 (6.7)	4.218	3.984	3.984	-	-	-	-	-	-
Ile307*	7.998 (7.9)	3.925	1.639	-	0.623	*	0.623	-	-	γ ^{''} : 0.916
His308	8.468 (7.4)	4.511	2.968	2.890	-	-	-	-	-	2H: 8.353 4H: 7.012
Ile309	8.128 (8.1)	3.984	3.847	-	0.662	*	0.662	-	-	γ ^{''} : 0.916
Gly310	8.216 (6.5)	3.886	3.847	-	-	-	-	-	-	-
Pro311	-	4.233	2.030	2.030	1.757	1.757	3.593	3.417	-	-
Gly312	8.368 (5.7)	3.710	3.710	-	-	-	-	-	-	-
Arg313	7.993 (6.7)	4.042	1.581	1.463	1.346	1.346	2.909	2.909	6.953	-
Ala314	8.142 (6.1)	4.101	1.014	-	-	-	-	-	-	-
Phe315	7.939 (7.0)	4.257	2.733	2.733	-	-	-	-	-	δ/ε/ξ: 6.878/7.051
Tyr316	7.783 (8.2)	4.257	2.772	2.597	-	-	6.854	-	6.562	-
Ala317	7.987 (6.1)	4.081	1.151	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	7.910 (6.7)	4.042	4.042	-	0.995	-	-	-	-	-
Gly319	8.218 (5.6)	3.729	3.729	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	8.127 (7.3)	4.472	2.636	2.558	-	-	-	-	-	-
Ile321*	7.998 (7.9)	3.925	1.639	-	0.623	*	0.623	-	-	γ ^{''} : 0.916
Ile322	8.070 (7.3)	3.866	1.620	-	0.662	*	0.662	-	-	γ ^{''} : 0.937
Gly323	8.254 (5.6)	3.691	3.691	-	-	-	-	-	-	-
Asp324	8.097 (7.6)	4.472	2.655	2.577	-	-	-	-	-	-
Ile325	7.967 (7.3)	3.905	1.659	-	0.662	*	0.662	-	-	γ ^{''} : 0.975
Arg326	8.233 (6.7)	4.062	1.600	1.522	1.405	1.365	2.948	2.948	7.026	-
Gln327	8.163 (7.0)	4.061	1.835	1.717	2.128	2.128	-	-	-	NH ₂ : 6.719/7.371
Ala328	8.222 (5.5)	4.003	1.112	-	-	-	-	-	-	-
His329	8.377 (7.9)	4.492	3.065	2.987	-	-	-	-	-	2H: 8.382 4H: 7.071
Ser330	8.177 (7.3)	4.178	3.632	3.632	-	-	-	-	-	-
CONH ₂	7.545/7.012									
	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a/b	NHAc	
GlcNAc	8.503 (9.1)	8.064	4.785	3.613	3.515	3.398	3.319	*/*	1.780	
GlcNAc'	-	8.259 (10.4)	4.355	3.691	3.515	3.241	3.339	*/*	1.834	

Tabelle 28: ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung des Peptids *v3og*.Die Messung wurde in D₂O bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 285 K durchgeführt.

AS	α	β	β'	γ	γ'	δ	δ'	ϵ	andere Protonen
Ser296	4.034	3.787	3.787	-	-	-	-	-	-
Thr297	4.186	3.941	-	0.998	-	-	-	-	-
Arg298	4.426	1.631	1.536	1.488	1.488	-	-	-	-
Pro299	4.198	2.091	2.091	1.809	1.809	3.645	3.419	-	-
Asn300	4.456	2.606	2.524	-	-	-	-	-	-
Asn301	4.524	2.639	2.587	-	-	-	-	-	-
Asn302	4.524	2.639	2.587	-	-	-	-	-	-
Thr303	4.066	4.066	-	1.007	-	-	-	-	-
Arg304	4.085	1.603	1.516	1.447	1.388	-	-	-	-
Lys305	4.113	1.623	1.554	1.222	1.222	1.457	1.457	2.977	-
Ser306	4.203	3.644	3.644	-	-	-	-	-	-
Ile307	3.972	1.603	-	0.627	*	0.627	-	-	γ'' : 0.971
His308	4.524	2.992	2.903	-	-	-	-	-	2H: 8.379 4H: 7.034
Ile309	4.006	1.603	-	0.685	*	0.685	-	-	γ'' : 0.997
Gly310	3.888	3.888	-	-	-	-	-	-	-
Pro311	4.246	2.061	2.061	1.789	1.789	3.430	3.606	-	-
Gly312	3.711	3.711	-	-	-	-	-	-	-
Arg313	4.066	1.594	1.447	1.359	1.359	-	-	-	-
Ala314	4.127	1.068	-	-	-	-	-	-	-
Phe315	4.280	2.752	2.752	-	-	-	-	-	$\delta/\epsilon/\xi$: 6.893/7.064
Tyr316	4.280	2.752	2.627	-	-	6.866	-	6.566	-
Ala317	4.106	1.174	-	-	-	-	-	-	-
Thr318	4.066	4.066	-	1.007	-	-	-	-	-
Gly319	3.755	3.755	-	-	-	-	-	-	-
Asp320	4.459	2.605	2.521	-	-	-	-	-	-
Ile321	3.943	1.662	-	0.635	*	0.635	-	-	γ'' : 0.946
Ile322	3.887	1.633	-	0.685	*	0.685	-	-	γ'' : 0.959
Gly323	3.704	3.704	-	-	-	-	-	-	-
Asp324	4.459	2.605	2.521	-	-	-	-	-	-
Ile325	3.929	1.701	-	0.685	*	0.685	-	-	γ'' : 1.016
Arg326	4.085	1.603	1.516	1.447	1.388	-	-	-	-
Gln327	4.065	1.865	1.746	2.141	2.141	-	-	-	-
Ala328	4.027	1.125	-	-	-	-	-	-	-
His329	4.514	3.094	2.992	-	-	-	-	-	2H: 8.408 4H: 7.089
Ser330	4.177	3.937	3.937	-	-	-	-	-	-

	NH	NHAc	1	2	3	4	5	6a/b	NHAc
GlcNAc	-	-	4.807	3.595	3.489	3.429	3.332	*/*	1.789
GlcNAc'	-	-	4.368	3.694	3.528	3.255	3.342	*/*	1.857

7.4.7 Versuchte Darstellung des cyclischen Peptids **v3c**



Die Darstellung des cyclischen Peptids **v3c** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Metylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 20 % (20.2 μmol).

Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV5 durchgeführt. Dabei wurde eine deutliche Polymerbildung beobachtet. Nach anschließender Ultrafiltration (AAV6) und Etherextraktion (AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 15 % (57.8 mg, 15.0 μmol) erhalten.

Die Anwesenheit des Produkts mittels massenspektrometrischem Nachweis (AAV9) konnte nicht bestätigt werden.

7.4.8 Versuchte Darstellung des cyclischen Glycopeptids **v3cg**



Die Darstellung des cyclischen Peptids **v3cg** erfolgte gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 100 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes (0.72 mmol/g). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Metylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 14 % (14.1 μmol).

Die Entschützung der Hydroxylgruppen des Chitobiosylbausteins erfolgte gemäß AAV3. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-schutzgruppen wurde gemäß AAV5 durchgeführt. Dabei wurde eine deutliche Polymerbildung beobachtet. Nach anschließender Ultrafiltration (AAV6) und Etherextraktion (AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 14 % (57.5 mg, 13.5 μmol) erhalten.

Die Anwesenheit des Produkts konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden (AAV9). $[\text{M}_w(\mathbf{v3cg}) = 4257.8 \text{ g/mol, MALDI-TOF-MS: } m/z = 4258.4 [\text{M}+\text{H}]^+]$.

Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte semipräparativ gemäß AAV8. 1 mg des Peptids wurde in 350 μL Laufmittel gelöst. Zur Trennung wurde der folgende Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 100/0 \rightarrow 100/0 (1 min) \rightarrow 50/50 (30 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 100/0 (2 min) \rightarrow 100/0 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min.

Das Produkt konnte nach der chromatografischen Trennung nicht mehr massenspektrometrisch (AAV9) nachgewiesen werden. Die Durchführung einer chromatografischen Trennung mit anschließendem spektrometrischem Nachweis mittels ESI (AAV10) verlief ebenfalls erfolglos.

7.4.9 Versuchte Darstellung des cyclischen Peptids **v3c37** an der festen Phase



Die Darstellung des cyclischen Peptids **v3c37** wurde zweimal durchgeführt und erfolgte nach einer Vorschrift von Galande *et al.* gemäß AAV1 mit einer Ansatzgröße von 25 μmol bezogen auf die Belegung des eingesetzten Rink-Amid-Harzes (0.17 mmol/g).^[226] Das Cystein an Position 330 wurde mit einer 4-Methoxytrityl-geschützten Thiolgruppe eingesetzt. Das Cystein an Position 296 wurde mit einer *S-tert*-Butyl-Schutzgruppe eingesetzt.

Bei der ersten Synthese wurde die Cyclisierung in einer Glasfritte durchgeführt. Dazu wurde das sich am Harz befindliche Peptid in die Fritte überführt, mehrfach mit abs. Methanol gewaschen und im Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet. Zur Entfernung der *S-tert*-Butyl-Schutzgruppe wurden 11 mL 2-Mercaptoethanol (30 % in DMF) auf das Harz gegeben und für zweieinhalb Stunden bei RT geschüttelt. Nach Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz mit Dichlormethan gewaschen. Zur Aktivierung der entschützten Thiolgruppe wurden 78.0 mg (250 μmol) 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) in 5 mL Dichlormethan auf das Harz gegeben und für 80 Minuten bei RT geschüttelt. Nach Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz mit Dichlormethan gewaschen. Zur Entfernung der Mmt-Schutzgruppe unter gleichzeitiger Bildung der Disulfidbrücke wurden 10 mL einer 1 %igen TFA-Lösung (mit 5 % TIPS in Dichlormethan) auf das Harz gegeben und bei RT geschüttelt. Die Reaktion wurde UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 386 nm verfolgt. Dazu wurden jeweils 50 μL der Reaktionslösung entnommen und mit 1500 μL Dichlormethan verdünnt. Die Reaktion wurde solange durchgeführt bis keine Veränderung der UV-Absorption mehr festzustellen war (95 Minuten). Nach Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz mit Dichlormethan gewaschen.

Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 88 % (22.0 μmol). Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der restlichen Seitenkettenschutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt.

Nach der Etherextraktion (AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 12 % (12.1 mg, 3.0 μmol) erhalten.

Bei der zweiten Synthese wurde die Cyclisierung im Mikrowellenreaktor durchgeführt. Zur Entfernung der *S-tert*-Butyl-Schutzgruppe wurden 5 mL 2-Mercaptoethanol (30 % in DMF) auf das Harz gegeben (25 W, 60 °C, 7 min). Anschließend wurde das Harz mit DMF gespült. Zur Aktivierung der entschützten Thiolgruppe wurden 78.0 mg (250 μmol) 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) in 5 mL Dichlormethan auf das Harz gegeben (25 W, 60 °C, 7 min). Anschließend wurde das Harz mit DMF gespült. Zur Bildung der Disulfidbrücke wurden sechsmal je 3 mL einer 1 %igen TFA-Lösung (mit 5 % TIPS in Dichlormethan) auf das Harz gegeben (25 W, 60 °C, 6 x 5 min).

Die terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde manuell nach AAV2 abgespalten. Die Bestimmung der Menge an Methylenfluoren ergab eine abgeschätzte Ausbeute von 52 % (13.0 μmol). Die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitiger Abspaltung der restlichen Seitenkettenschutzgruppen wurde gemäß AAV4 durchgeführt.

Nach der Etherextraktion (AAV7) wurde das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 24 % (24.5 mg, 6.0 μmol) erhalten.

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgte semipräparativ gemäß AAV8. 1 mg des jeweiligen Peptids wurde in je 350 μL Laufmittel gelöst. Zur Trennung wurde der folgende Gradient angewendet:

Eluent A/Eluent B 100/0 \rightarrow 100/0 (1 min) \rightarrow 50/50 (30 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 0/100 (2 min) \rightarrow 100/0 (2 min) \rightarrow 100/0 (0.5 min), Flussrate 5 mL/min.

Die Produkte beider Cyclisierungsvarianten konnten nach der chromatografischen Trennung nicht massenspektrometrisch (AAV9) nachgewiesen werden. Die Durchführung einer chromatografischen Trennung mit anschließendem spektrometrischen Nachweis mittels ESI (AAV10) verlief ebenfalls in beiden Fällen erfolglos.

7.5 STD-NMR

Um eine optimale Wasserunterdrückung für die STD-NMR-Experimente zu erreichen, wurden 1D- ^1H -Spektren mit *presat*-, WATERGATE- und *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung von dem Peptid **v3ct15** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, pH 3.0) aufgenommen.

Spektren, die mit einer Vorsättigung des Wassersignals (*presat*, Pulssequenz: *zgpr*) akquiriert wurden, zeigten ein sehr starkes T_1 -Rauschen. Diese Art der Wasserunterdrückung eignete sich daher nicht für STD-NMR-Messungen.

Durch die Form des Anregungsprofils der Wasserunterdrückung mit einer WATERGATE-Pulssequenz (*zgpgw5*) kommt es in der Nähe des Wassersignals und an den Grenzen des spektralen Fensters zu einer Intensitätsverringering der Signale und damit zu Fehlern bei der Integration. Dies kann durch Variation der Pulslänge für die Wasserunterdrückung (*d19*) vermieden werden. Es wurden Spektren mit 32 k Datenpunkten und 4096 Scans über eine spektrale Breite von 11 Hz aufgenommen. Die Länge des Delays *d19* wurde zwischen 90 und 170 ms gewählt. Die Spektren wurden auf das Wassersignal kalibriert ($\delta_{\text{HDO}} = 4.69$ ppm). Der Phasenfehler und die Basislinie wurden manuell korrigiert.

Durch das Anregungsprofil der Wasserunterdrückung mit einer *excitation sculpting*-Pulssequenz (*zgesgp*) kommt es zu unterschiedlich intensiven Signalen in der Nähe des Wassersignals und an den Grenzen des spektralen Fensters und damit zu Fehlern bei der Integration. Durch Variation der Pulslänge für die Wasserunterdrückung (*pl12*) kann dies vermieden werden. Es wurden Spektren mit 32 k Datenpunkten und 2048 Scans über eine spektrale Breite von 11 Hz aufgenommen. Die Länge des Pulses *pl12* wurde zwischen 2 und 8 ms gewählt. Die Stärke für den Puls der Wasserunterdrückung (*sp1*) wurde für jedes Experiment optimiert. Die Spektren wurden auf das (Rest-)Wassersignal kalibriert ($\delta_{\text{HDO}} = 4.69$ ppm). Der Phasenfehler und die Basislinie wurden manuell korrigiert.

7.5.1 STDD-NMR-Experimente

Die Liposomenlösungen wurden nach AAV14 hergestellt. Die Probenvolumina betragen entweder 650 μL (5 mm Röhrchen) oder 200 μL (3 mm Röhrchen). Die Rezeptorkonzentrationen der Proben lagen zwischen 0.5 und 1.5 nM. Die Ligandkonzentrationen lagen zwischen 2.4 und 667 μM , was einem Ligandüberschuss von 2.4- bis 833-fach entsprach.

Zu Beginn jeder Experimentreihe wurden eine ligandhaltige Liposomenprobe (mit dem höchsten Ligandüberschuss) und eine ligandfreie Liposomenprobe gleicher Rezeptorkonzentration angesetzt. Es wurde eine Kreuztitration durchgeführt, bei der aus jeder Probe das identische Volumen entnommen wurde und in die jeweils andere Probe überführt wurde. Das Volumen der Probe und die Rezeptorkonzentration blieben dabei konstant.

Die Aufnahme der STD-NMR-Spektren erfolgte an einem *Avance* 700 MHz-Spektrometer bei 285 K. Die Wasserunterdrückung wurde mittels *excitation sculpting*-Pulssequenz erreicht, wobei die optimale Pulsleistung für jede Messreihe individuell bestimmt wurde.

Alle Experimente einer Messreihe wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen. Es wurde ein Pseudo-2D-Experiment ohne Spinlock verwendet (*stddiffesgp2d.th*). Die Einstrahlpunkte wurden analog zu B. Hünnefeld bei -1 ppm (*on resonance*) und $+40$ ppm (*off resonance*) gewählt.^[274] Die FIDs der *on*- und *off resonance*-Spektren des Pseudo-2D-NMR-Experiments wurden in zwei Inkrementen eines seriellen Files gespeichert. Die Sättigung des Rezeptors wurde durch eine Kaskade von 90° -Gaußpulsen (50 ms) über einen Zeitraum von 3 s mit einer Abschwächung der Pulsleistung von 45 dB erreicht. Die Experimente wurden über eine spektrale Breite von 12 ppm mit 32 k Datenpunkten und 2 Inkrementen aufgenommen. Die Scananzahl betrug 2048. Die Detektoreinstellungen wurden bei allen Experimenten einer Messreihe beibehalten. Zur Ermittlung der Ligand-Artefakte wurde jeweils eine liposomenfreie Peptidlösung mit den gleichen Aufnahmeparametern vermessen.

Die Prozessierung der STD-Spektren erfolgte mit einem *zerofilling* und einer Linienverbreiterung von 1 Hz. Die *on*- und *off resonance*-Spektren wurden durch den Befehl *splitser* getrennt erhalten. Es wurde eine für das *on*- und *off resonance*-Spektrum identische automatische Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt. Das STD-Spektrum wurde durch Subtraktion der beiden Spektren erhalten.

Von jedem ligandhaltigen STD-Spektrum wurde das STD-Spektrum der reinen Liposomenlösung abgezogen, um ein STDD-Spektrum zu generieren, das ausschließlich Signale enthält, die vom Liganden hervorgerufen werden. Es wurde eine serielle Integration der *off resonance*- und STDD-Spektren durchgeführt, um die absoluten STD-Prozente durch Vergleich der Integrale zu erhalten. Die Liposomen-Artefakte wurden durch die Doppeldifferenzbildung eliminiert, die Ligand-Artefakte wurden manuell von den absoluten STD-Prozentwerten abgezogen.

Die STD-Amplifikationsfaktoren wurden erhalten, indem die absoluten STD-Prozente mit den entsprechenden Ligandüberschüssen multipliziert wurden. Die K_D -Werte der einzelnen Ligandprotonen wurden durch Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentrationen und einer Anpassung der Sättigungskurve an das *one site binding*-Modell ermittelt.

Die Bestimmung der Bindungsepitope wurde bei einem 200-fachen (296 μM , **v3ct15**) bzw. 633-fachen (304 μM , **v3ct21**) Ligandüberschuss durchgeführt. Hierfür wurde der höchste

Wert der absoluten STD-Prozente auf 100 % normiert, um die relativen STD-Prozente zu erhalten.

Da in einigen Fällen eine eindeutige Zuordnung der Ligandsignale mit 1D-STD-NMR-Spektren nicht möglich war, wurden zweidimensionale STD-HSQC-NMR-Spektren aufgenommen. Dazu wurde eine Ligandprobe (**v3ct21**) mit einer Konzentration von 690 μM in LUV-EDTA-NMR-Puffer hergestellt. Es wurde ebenfalls eine Probe mit einer Rezeptorkonzentration von 5 μM und einer Ligandkonzentration von 690 μM hergestellt.

Von der Ligandprobe wurde ein phasensensitives, breitbandenkoppeltes HSQC-Spektrum mit der Pulssequenz *hsqcedetgpsisp.2* aufgenommen (700 MHz, 285 K). Es wurden 138 Hz für die C-H-Kopplungskonstante gewählt. Die spektrale Breite in F1 betrug 170 ppm und in F2 10 ppm. Die Anzahl der Datenpunkte pro Inkrement betrug 1024 bei 128 Inkrementen. Die Scanzahl betrug 768.

Die Messungen ergaben, dass die gewählte Ligandkonzentration zu niedrig war. Bei höheren Ligandkonzentrationen konnte allerdings keine stabile ligandhaltige Liposomenprobe hergestellt werden, da die Liposomen nach etwa 30 Minuten aggregierten und sedimentierten.

Daher wurden in die Auswertung ausschließlich die Signale einbezogen, deren Zuordnung in den 1D-STD-NMR-Spektren eindeutig möglich war (Kapitel 4.6.2).

Die Negativkontrolle wurde mit Parentalliposomen, die keinen CCR5-Rezeptor trugen, und dem Peptid **v3ct21** durchgeführt. Es wurde eine Parentalliposomenkonzentration gewählt, die bei Anwesenheit von CCR5 einer Rezeptorkonzentration von 0.5 μM entsprechen würde. Die maximale Ligandkonzentration betrug 333 μM . Der höchste Ligandüberschuss war 666-fach.

7.6 SPR-Bindungsstudien

Die SPR-Messungen wurden an einem Biacore *J*-Gerät bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Es wurden Messchips mit einer 50 nm dicken carboxymethylierten Dextranschicht verwendet (*CMD 50M*). Als Laufmittel diente steril filtrierter (Celluloseacetat, 0.2 μm), entgaster PBS-Puffer (pH 7.4). Es wurden frisch geerntete Zellen für die SPR-Messungen verwendet, die vor den Messungen drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen und gezählt (AAV13) wurden.

Auf dem Messchip diente Flusszelle 2 als Referenzzelle, auf der kein Ligand immobilisiert wurde. Pro Messchip wurde ein Peptid auf Flusszelle 1 immobilisiert. Dazu wurden Stammlösungen der Peptide (50 $\mu\text{g/mL}$) in H_2O hergestellt. Zunächst wurde die Chipoberfläche mit

einer frisch angesetzten Lösung aus EDC (0.2 M) und NHS (0.05 M) über eine Kontaktzeit von 10 Minuten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ aktiviert. Danach wurde das Peptid immobilisiert, indem die jeweilige Stammlösung 1:1 mit einem 10 mM Acetatpuffer (pH 4.0) versetzt wurde und über eine Kontaktzeit von sechs Minuten bei einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch eine Flusszelle der Chipoberfläche geleitet wurde. Die Immobilisierung wurde solange wiederholt bis eine entsprechende Zunahme der RU-Werte eine zufriedenstellende Belegung anzeigte (~ 250 fmol). Nichtumgesetzte Carboxylfunktionen wurden abschließend mit Ethanolamin-HCl (1 M, pH 8.5) blockiert (8 min, Flussrate 30 $\mu\text{L}/\text{min}$).

In Tabelle 29 sind die Belegungen der einzelnen Messchips aufgeführt. Da die Immobilisierung nicht gleichmäßig gelang, wurden die RU-Werte der Belegung auf 100 fmol normiert, um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu vereinfachen. Die ermittelten Werte für RU_{max} wurden für die K_D -Wert-Bestimmung ebenfalls entsprechend normiert.

Tabelle 29: Absolute und auf 100 fmol normierte Belegung der Sensorchip-Flusszellen mit den Peptiden.










Peptid	Belegung [RU]	Belegung [fmol]	auf 100 fmol normierte Belegung [RU]
v3cong	327	185	176
v3ct15	490	272	158
v3ct21	2160	981	67
v3o	136	128	106
v3og	364	115	317

Die Aufnahme der Messreihen mit HOS-Zellen erfolgte, indem eine Verdünnungsreihe der Zellen in PBS-Puffer mit den Konzentrationen 36, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen/ μL erstellt wurde. Die Zelllösungen wurden vor jeder Messung suspendiert und anschließend über eine Kontaktzeit von zwölf Minuten bei einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die Chipoberfläche geleitet. Die Messungen wurden zunächst mit aufsteigenden Zellkonzentrationen durchgeführt. Bei späteren Messungen wurden die Konzentrationen zufällig gewählt. Nach dem Ende der Injektionen wurde mindestens zwei Minuten gewartet, bevor die vollständige Dissoziation der Zellen von der Chipoberfläche je nach Zellkonzentration durch ein- bis vierminütige Regenerationspulse mit SDS (1.7 mM) herbeigeführt wurde.

Die Negativkontrolle wurde, wie oben beschrieben, mit dem Glycopeptid **v3og** und HOS-Parentalzellen durchgeführt.

8 Sicherheitshinweise und Toxikologie

Gefahrensymbole nach GHS

Codierung	Gefahrenbezeichnung	Piktogramm	Beschreibung	Signalwort
GHS01	Explosionsgefährlich		Explodierende Bombe	Gefahr
GHS02	Hochentzündlich; leichtentzündlich		Flamme	Gefahr
GHS03	Brandfördernd		Flamme über einem Kreis	Gefahr
GHS04	-		Gasflasche	Achtung
GHS05	Ätzend		Ätzwirkung	Achtung/Gefahr
GHS06	Sehr giftig; giftig		Totenkopf mit gekreuzten Knochen	Gefahr
GHS07	-		dickes Ausrufezeichensymbol	Gefahr
GHS08	-		Gesundheitsgefahr	Gefahr
GHS09	Umweltgefährlich		Umwelt	Achtung/Gefahr

Substanzname	Codierung nach GHS	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	GHS02 GHS07	Gefahr	225, 319, 336 EUH066	210, 233, 240, 241, 242, 243, 264, 280, 303+361+353, 305+351+338, 337+313, 370+378, 403+235, 501
Acetonitril	GHS02 GHS07	Gefahr	225, 302, 312, 319, 332	210, 233, 240, 241, 242, 243, 261, 264, 280, 301+312, 302+352, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 322, 330, 337+313, 370+378, 403+235, 501
Ammoniumcarbamat	GHS07	Achtung	302	264, 301+312, 330, 501
Ammoniumhydrogencarbonat	GHS07	Achtung	302	264, 301+312, 330, 501
Antipain				Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetra- methyluroniumtetrafluoroborat	GHS07	Achtung	315, 319, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
Bio-Gel P-2, 200 - 400 <i>mesh</i>				Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG
Chitin				Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG
Chitinase (EC 3.2.1.14)				Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG

Substanzname	Codierung nach GHS	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Chloroform	GHS07 GHS08	Achtung	302, 315, 350, 373	201, 202, 260, 264, 280, 281, 301+312, 302+352, 308+313, 321, 330, 332+313, 362, 405, 501
Deuteriumoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Dichlormethan	GHS08	Achtung	351	201, 202, 281, 308+313, 405, 501
Diethylether	GHS02 GHS07	Gefahr	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 233, 240, 241, 242, 243, 264, 280, 301+312, 303+361+353, 330, 370+378, 403+235, 501
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	GHS02 GHS05 GHS07	Gefahr	225, 301, 314, 412	210, 233, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 273, 280, 301+312, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 370+378, 403+235, 405, 501
2,5-Dihydroxybenzoesäure	GHS07	Achtung	315, 319, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethyl-carbodiimidhydrochlorid	GHS05 GHS07	Gefahr	315, 318, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 332+313, 362, 403+233, 405, 501
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	GHS07 GHS08	Gefahr	312, 319, 332, 360D	201, 202, 261, 264, 280, 281, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313, 312, 322, 373+313, 363, 405, 501
<i>N,N</i> -Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Essigsäure (100%)	GHS02 GHS05	Gefahr	226, 314	210, 233, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 370+378, 403+235, 405, 501
Essigsäureanhydrid	GHS02 GHS05 GHS07	Gefahr	226, 302, 314, 332	210, 233, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 280, 301+312, 301+330+313, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 370+378, 403+235, 405, 501
<i>ES Tuning Mix</i>	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Ethanol	GHS02	Gefahr	225	210, 233, 240, 241, 242, 243, 280, 303+361+353, 370+378, 403+235, 501
Ethanolamin-HCl	GHS05 GHS07	Gefahr	302, 312, 314, 332	260, 264, 280, 301+312, 301+330+331, 302+352, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 405, 501

Substanzname	Codierung nach GHS	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Ethylacetat	GHS02 GHS07	Gefahr	EUH066, 225, 319, 336	210, 233, 240, 241, 242, 243, 264, 280, 303+361+353, 305+351+338, 337+313, 370+378, 403+235, 501
Ethylendiamintetraacetat- <i>d</i> ₁₆	GHS07	Achtung	319	264, 280, 305+351+338, 337+313 361, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
Ferulasäure	GHS07	Achtung	315, 319, 335	
Fötales Kälberserum	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Fmoc-Aminosäurederivate	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Fmoc-Rink-Amid-Harz	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Fmoc-Rink-Amid-AM-Harz	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Hydrazinhydrat-Monohydrat	GHS02 GHS05 GHS06 GHS08 GHS09	Gefahr	226, 301, 311, 314, 317, 331, 350, 410	201, 202, 210, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 273, 280, 281, 301+310, 301+330+331, 302+352, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 308+313, 321, 333+313, 370+378, 391, 403+233, 403+233, 405, 501
<i>N</i> -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			
Leupeptin	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
2-Mercaptoethanol	GHS05 GHS06 GHS09	Gefahr	302, 311, 314, 332, 411	260, 264, 273, 280, 301+312, 301+330+331, 302+352, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 390, 405, 501
Methanol	GHS02 GHS06 GHS08	Gefahr	225, 301, 311, 331, 370	210, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 280, 301+310, 302+352, 303+361+353, 304+340, 321, 330, 370+378, 403+233, 403+235, 405, 501
Natrium	GHS02 GHS05	Gefahr	EUH014, 260, 314	223, 231+232, 260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 335+334, 370+378, 402+404, 405, 501
Natriumacetat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Natriumazid	GHS06 GHS09	Gefahr	EUH032, 300, 410	264, 273, 301+310, 321, 330, 391, 405, 501
Natriumchlorid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			

Substanzname	Codierung nach GHS	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Natriumdodecylsulfat	GHS02 GHS07	Achtung	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
Natriumhydrogencarbonat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Natriumhydroxid	GHS05	Gefahr	314	260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+383, 310, 321, 405, 501
Natriumsulfat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Neomycin	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Pefabloc	GHS05	Gefahr	314	260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 405, 501
Penicillin	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Pepstatin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Piperidin	GHS02 GHS05 GHS06	Gefahr	225, 311, 314, 331	210, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 280, 301+330+331, 302+352, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 370+378, 403+233, 403+235, 405, 501
Puromycin	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Pyridin	GHS02 GHS07	Gefahr	225, 302, 312, 332	210, 233, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 280, 301+312, 302+352, 303+361+353, 304+340, 322, 330, 370+378, 403+235, 501
RPMI-Medium 1640	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
Salzsäure (37 %)	GHS05 GHS07	Gefahr	314, 335	260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 403+233, 405, 501
Schwefelsäure (95-97 %)	GHS05	Gefahr	314	260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 405, 501
Streptomycin	Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG			
2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin)	GHS07	Achtung	315, 319, 335	261, 264, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501

Substanzname	Codierung nach GHS	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Toluol	GHS02 GHS07 GHS08	Gefahr	225, 304, 315, 336, 361D, 373	201, 201, 210, 233, 240, 241, 242, 243, 260, 264, 280, 281, 301+310, 302+352, 303+361+353, 308+313, 321, 331, 332+313, 370+378, 403+235, 405, 501 260, 264, 273, 280,
Trifluoressigsäure	GHS05 GHS07	Gefahr	314, 332, 412	301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338 310, 321, 405, 501 210, 240, 241, 242, 243, 261, 264, 280, 302+352, 303+361+353,
Triisopropylsilan	GHS02 GHS07	Achtung	226, 315, 319, 335	304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 370+378, 403+233, 403+235, 405, 501 261, 264, 280, 302+352,
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan-11	GHS07	Achtung	315, 319, 335	304+340, 305+351+338, 312, 321, 332+313, 337+313, 362, 403+233, 405, 501
Trypanblau Trypsin-EDTA	GHS08	Gefahr	350	201, 202, 281, 308+313, 405, 501 Unbekannte Gefährdung im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG

Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen, GHS Kat. 1A und 1B

CAS-Nr.	Stoffname	Kategorie	Verfahren und eingesetzte Menge	Anzahl der Experimente
68-12-2	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	1B	Peptidsynthese, 90 L	15
7803-57-8	Hydrazinhydrat-Monohydr.	1B	Peptidsynthese, 5 mL	15
72-57-1	Trypanblau	1B	Zellkultur, 1 mL	25

9 Literaturverzeichnis

- 1 Gallo, R. C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V. S.; Mann, D.; Sidhu, G. D.; Stahl, R. E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J.; Popovic, M., Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220*, (4599), 865-867.
- 2 Barre-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.
- 3 Barré-Sinoussi, F., HIV: a Discovery Opening the Road to Novel Scientific Achievements and Global Health Improvement. *Noble Lectures* **2008**.
- 4 UNAIDS, UNAIDS Report on the global AIDS Epidemic 2010. **2010**.
- 5 Lemey, P.; Pybus, O. G.; Wang, B.; Saksena, N. K.; Salemi, M.; Vandamme, A. M., Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100*, (11), 6588-6592.
- 6 Wainberg, M. A., HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* **2004**, *18 Suppl 3*, 63-68.
- 7 Simon, F.; Mauclore, P.; Roques, P.; Loussert-Ajaka, I.; Muller-Trutwin, M. C.; Saragosti, S.; Georges-Courbot, M. C.; Barre-Sinoussi, F.; Brun-Vezinet, F., Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **1998**, *4*, (9), 1032-1037.
- 8 Hemelaar, J.; Gouws, E.; Ghys, P. D.; Osmanov, S., Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* **2006**, *20*, (16), W13-23.
- 9 Johnson, W. E.; Desrosiers, R. C., Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* **2002**, *53*, 499-518.
- 10 Gelderblom, H. R., Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **1991**, *5*, (6), 617-638.
- 11 Pornillos, O.; Ganser-Pornillos, B. K.; Yeager, M., Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* **2011**, *469*, (7330), 424-427.
- 12 NIAID, Webseite: <http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/biology/pages/hivvirionlargeimage.aspx>, aufgerufen 01.07.2011.
- 13 Turner, B. G.; Summers, M. F., Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **1999**, *285*, (1), 1-32.
- 14 Weissenhorn, W.; Dessen, A.; Harrison, S. C.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C., Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **1997**, *387*, (6631), 426-430.
- 15 Helseth, E.; Olshevsky, U.; Furman, C.; Sodroski, J., Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **1991**, *65*, (4), 2119-2123.
- 16 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.
- 17 McCune, J. M.; Rabin, L. B.; Feinberg, M. B.; Lieberman, M.; Kosek, J. C.; Reyes, G. R.; Weissman, I. L., Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, *53*, (1), 55-67.

- 18 Wyatt, R.; Kwong, P. D.; Desjardins, E.; Sweet, R. W.; Robinson, J.; Hendrickson, W. A.; Sodroski, J. G., The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **1998**, *393*, (6686), 705-711.
- 19 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.
- 20 Zhu, P.; Liu, J.; Bess, J., Jr.; Chertova, E.; Lifson, J. D.; Grise, H.; Ofek, G. A.; Taylor, K. A.; Roux, K. H., Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **2006**, *441*, (7095), 847-852.
- 21 Klatzmann, D.; Champagne, E.; Chamaret, S.; Gruet, J.; Guetard, D.; Hercend, T.; Gluckman, J. C.; Montagnier, L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **1984**, *312*, (5996), 767-768.
- 22 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.
- 23 Dalgleish, A. G.; Beverley, P. C.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F.; Weiss, R. A., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **1984**, *312*, (5996), 763-767.
- 24 Wu, L.; LaRosa, G.; Kassam, N.; Gordon, C. J.; Heath, H.; Ruffing, N.; Chen, H.; Humblies, J.; Samson, M.; Parmentier, M.; Moore, J. P.; Mackay, C. R., Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J Exp Med* **1997**, *186*, (8), 1373-1381.
- 25 Sattentau, Q. J.; Moore, J. P.; Vignaux, F.; Traincard, F.; Poignard, P., Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* **1993**, *67*, (12), 7383-7393.
- 26 Rizzuto, C. D.; Wyatt, R.; Hernandez-Ramos, N.; Sun, Y.; Kwong, P. D.; Hendrickson, W. A.; Sodroski, J., A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **1998**, *280*, (5371), 1949-1953.
- 27 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.
- 28 Moore, J. P.; Trkola, A.; Dragic, T., Co-receptors for HIV-1 entry [see comments]. *Curr Opin Immunol* **1997**, *9*, (4), 551-562.
- 29 NIH, Webseite: https://www.aidsreagent.org/program_info.cfm#5, aufgerufen 01.07.2011.
- 30 Moore, J. P.; McKeating, J. A.; Weiss, R. A.; Sattentau, Q. J., Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **1990**, *250*, (4984), 1139-1142.
- 31 Hart, T. K.; Kirsh, R.; Ellens, H.; Sweet, R. W.; Lambert, D. M.; Petteway, S. R. J.; Leary, J.; Bugelski, P. J., Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, (6), 2189-2193.
- 32 Wang, D.; Lu, M.; Arora, P. S., Inhibition of HIV-1 fusion by hydrogen-bond-surrogate-based alpha helices. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, (10), 1879-1882.
- 33 Fackler, O. T.; Peterlin, B. M., Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* **2000**, *10*, (16), 1005-1008.
- 34 Miyauchi, K.; Kim, Y.; Latinovic, O.; Morozov, V.; Melikyan, G. B., HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* **2009**, *137*, (3), 433-444.

- 35 sciencephotoLIBRARY, Webseite: <http://www.sciencephoto.com/media/248275/view>, aufgerufen 08.06.2011.
- 36 Brown, P. O.; Bowerman, B.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M., Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* **1987**, *49*, (3), 347-356.
- 37 Bushman, F.; Fujiwara, T.; Craigie, R., Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* **1990**, *249*, (4976), 1555-1558.
- 38 Bartlett, J. G.; Moore, R. D., Improving HIV therapy. *Scient Am* **1998**, *279*, (1), 84-87, 89.
- 39 Dewhurst, S.; Whetter, L., Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci* **1997**, *2*, 147-159.
- 40 Preston, B.; Poiesz, B.; Loeb, L., Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **1988**, *242*, (4882), 1168-1171.
- 41 Perelson, A. S.; Neumann, A. U.; Markowitz, M.; Leonard, J. M.; Ho, D. D., HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **1996**, *271*, (5255), 1582-1586.
- 42 Roberts, J.; Bebenek, K.; Kunkel, T., The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **1988**, *242*, (4882), 1171-1173.
- 43 Wei, X.; Ghosh, S. K.; Taylor, M. E.; Johnson, V. A.; Emini, E. A.; Deutsch, P.; Lifson, J. D.; Bonhoeffer, S.; Nowak, M. A.; Hahn, B. H.; et, a. l., Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **1995**, *373*, (6510), 117-122.
- 44 Kolegraff, K.; Bostik, P.; Ansari, A. A., Characterization and Role of Lentivirus-Associated Host Proteins. *Exp Biol Med* **2006**, *231*, (3), 252-263.
- 45 Markowitz, M.; Louie, M.; Hurley, A.; Sun, E.; Di Mascio, M.; Perelson, A. S.; Ho, D. D., A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. *J Virol* **2003**, *77*, (8), 5037-5038.
- 46 Rolink, A. G.; Schaniel, C.; Andersson, J.; Melchers, F., Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* **2001**, *13*, (2), 202-207.
- 47 Janeway, C. A.; Travers, P., *Immunologie*. 2. Aufl. ; Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg. Berlin. Oxford, **1997**.
- 48 Mocroft, A.; Ledergerber, B.; Katlama, C.; Kirk, O.; Reiss, P.; Monforte, A. d. A.; Knysz, B.; Dietrich, M.; Phillips, A. N.; Lundgren, J. D., Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *The Lancet* **2003**, *362*, (9377), 22-29.
- 49 Doyle, C.; Strominger, J. L., Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **1987**, *330*, (6145), 256-259.
- 50 Robey, E.; Axel, R., CD4: collaborator in immune recognition and HIV infection. *Cell* **1990**, *60*, (5), 697-700.
- 51 Sweet, R. W.; Truneh, A.; Hendrickson, W. A., CD4: Its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target. *Curr Opin Biotechnol* **1991**, *2*, (4), 622-633.
- 52 Brand, D.; Srinivasan, K.; Sodroski, J., Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *J Virol* **1995**, *69*, (1), 166-171.
- 53 Modrow, S.; Falke, D., *Molekulare Virologie*. 3. Aufl.; Spektrum Akademischer Verlag, **2010**.
- 54 Endres, M. J.; Clapham, P. R.; Marsh, M.; Ahuja, M.; Turner, J. D.; McKnight, A.; Thomas, J. F.; Stoebenau-Haggarty, B.; Choe, S.; Vance, P. J.; Wells, T. N. C.; Power, C. A.; Sutterwala, S. S.; Doms,

- R. W.; Landau, N. R.; Hoxie, J. A., CD4-Independent Infection by HIV-2 Is Mediated by Fusin/CXCR4. *Cell* **1996**, *87*, (4), 745-756.
- 55 LaBranche, C. C.; Hoffman, T. L.; Romano, J.; Haggarty, B. S.; Edwards, T. G.; Matthews, T. J.; Doms, R. W.; Hoxie, J. A., Determinants of CD4 Independence for a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variant Map outside Regions Required for Coreceptor Specificity. *J Virol* **1999**, *73*, (12), 10310-10319.
- 56 Bandres, J. C.; Wang, Q. F.; O'Leary, J.; Baleaux, F.; Amara, A.; Hoxie, J. A.; Zolla-Pazner, S.; Gorny, M. K., Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J Virol* **1998**, *72*, (3), 2500-2504.
- 57 Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E.; Berger, E. A., HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **1996**, *272*, (5263), 872-877.
- 58 Deng, H.; Liu, R.; Ellmeier, W.; Choe, S.; Unutmaz, D.; Burkhart, M.; Marzio, P. D.; Marmon, S.; Sutton, R. E.; Hill, C. M.; Davis, C. B.; Peiper, S. C.; Schall, T. J.; Littman, D. R.; Landau, N. R., Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **1996**, *381*, (6584), 661-666.
- 59 Gorry, P.; Ancuta, P., Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* **2011**, *8*, (1), 45-53.
- 60 Horuk, R., Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today* **1999**, *20*, (2), 89-94.
- 61 Paterlini, M. G., Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity. *Biophys J* **2002**, *83*, (6), 3012-3031.
- 62 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.
- 63 Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M., Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **1999**, *17*, 657-700.
- 64 McNicholl, J. M.; Smith, D. K.; Qari, S. H.; Hodge, T., Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* **1997**, *3*, (3), 261-271.
- 65 Cocchi, F.; DeVico, A. L.; Garzino-Demo, A.; Arya, S. K.; Gallo, R. C.; Lusso, P., Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **1995**, *270*, (5243), 1811-1815.
- 66 Alkhatib, G.; Combadiere, C.; Broder, C. C.; Feng, Y.; Kennedy, P. E.; Murphy, P. M.; Berger, E. A., CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **1996**, *272*, (5270), 1955-1958.
- 67 Bleul, C. C.; Farzan, M.; Choe, H.; Parolin, C.; Clark-Lewis, I.; Sodroski, J.; Springer, T. A., The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **1996**, *382*, (6594), 829-833.
- 68 Verani, A.; Lusso, P., Chemokines as Natural HIV Antagonists. *Curr Mol Med* **2002**, *2*, (8), 691-702.
- 69 Premack, B. A.; Schall, T. J., Chemokine receptors: Gateways to inflammation and infection. *Nat Med* **1996**, *2*, (11), 1174-1178.
- 70 Farzan, M.; Chung, S.; Li, W.; Vasilieva, N.; Wright, P. L.; Schnitzler, C. E.; Marchione, R. J.; Gerard, C.; Gerard, N. P.; Sodroski, J.; Choe, H., Tyrosine-sulfated peptides functionally reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region. *J Biol Chem* **2002**, *277*, (43), 40397-40402.
- 71 Doranz, B. J.; Lu, Z. H.; Rucker, J.; Zhang, T. Y.; Sharron, M.; Cen, Y. H.; Wang, Z. X.; Guo, H. H.; Du, J. G.; Accavitti, M. A.; Doms, R. W.; Peiper, S. C., Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **1997**, *71*, (9), 6305-6314.

- 72 Thorsden, I.; Polzer, S.; Schreiber, M., Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1. *BMC Infect Dis* **2002**, *2*, (1), 31.
- 73 Rucker, J.; Edinger, A. L.; Sharron, M.; Samson, M.; Lee, B.; Berson, J. F.; Yi, Y.; Margulies, B.; Collman, R. G.; Doranz, B. J.; Parmentier, M.; Doms, R. W., Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **1997**, *71*, (12), 8999-9007.
- 74 Choe, H.; Farzan, M.; Konkel, M.; Martin, K.; Sun, Y.; Marcon, L.; Cayabyab, M.; Berman, M.; Dorf, M. E.; Gerard, N.; Gerard, C.; Sodroski, J., The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **1998**, *72*, (7), 6113-6118.
- 75 Cheng-Mayer, C.; Seto, D.; Tateno, M.; Levy, J. A., Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* **1988**, *240*, (4848), 80-82.
- 76 Dimitrov, D. S.; Xiao, X.; Chabot, D. J.; Broder, C. C., HIV coreceptors. *J Membr Biol* **1998**, *166*, (2), 75-90.
- 77 Schuitemaker, H.; Koot, M.; Kootstra, N. A.; Dercksen, M. W.; de Goede, R. E.; van Steenwijk, R. P.; Lange, J. M.; Schattenkerk, J. K.; Miedema, F.; Tersmette, M., Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* **1992**, *66*, (3), 1354-1360.
- 78 Speck, R. F.; Wehrly, K.; Platt, E. J.; Atchison, R. E.; Charo, I. F.; Kabat, D.; Chesebro, B.; Goldsmith, M. A., Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol* **1997**, *71*, (9), 7136-7139.
- 79 Cardozo, T.; Kimura, T.; Philpott, S.; Weiser, B.; Burger, H.; Zolla-Pazner, S., Structural Basis for Coreceptor Selectivity by The HIV Type 1 V3 Loop. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2007**, *23*, (3), 415-426.
- 80 Raymond, S.; Delobel, P.; Mavigner, M.; Cazabat, M.; Souyris, C.; Sandres-Saune, K.; Cuzin, L.; Marchou, B.; Massip, P.; Izopet, J., Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* **2008**, *22*, (14), 11-16.
- 81 Polzer, S.; Dittmar, M. T.; Schmitz, H.; Schreiber, M., The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **2002**, *304*, (1), 70-80.
- 82 Scarlatti, G.; Tresoldi, E.; Bjorndal, A.; Fredriksson, R.; Colognesi, C.; Deng, H. K.; Malnati, M. S.; Plebani, A.; Siccardi, A. G.; Littman, D. R.; Fenyo, E. M.; Lusso, P., In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* **1997**, *3*, (11), 1259-1265.
- 83 Polzer, S.; Dittmar, M. T.; Schmitz, H.; Meyer, B.; Muller, H.; Krausslich, H. G.; Schreiber, M., Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* **2001**, *11*, (1), 11-19.
- 84 Ho, S. H.; Tasca, S.; Shek, L.; Li, A.; Gettie, A.; Blanchard, J.; Boden, D.; Cheng-Mayer, C., Coreceptor switch in R5-tropic simian/human immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* **2007**, *81*, (16), 8621-8633.
- 85 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.
- 86 Samson, M.; Libert, F.; Doranz, B. J.; Rucker, J.; Liesnard, C.; Farber, C. M.; Saragosti, S.; Lapoumeroulie, C.; Cognaux, J.; Forceille, C.; Muyltermans, G.; Verhofstede, C.; Burtonboy, G.;

- Georges, M.; Imai, T.; Rana, S.; Yi, Y.; Smyth, R. J.; Collman, R. G.; Doms, R. W.; Vassart, G.; Parmentier, M., Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **1996**, *382*, (6593), 722-725.
- 87 Dean, M.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G. A.; Smith, M. W.; Allikmets, R.; Goedert, J. J.; Buchbinder, S. P.; Vittinghoff, E.; Gomperts, E.; Donfield, S.; Vlahov, D.; Kaslow, R.; Saah, A.; Rinaldo, C.; Detels, R.; O'Brien, S. J., Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **1996**, *273*, (5283), 1856-1862.
- 88 Rana, S.; Besson, G.; Cook, D.; Rucker, J.; Smyth, R.; Yi, Y.; Turner, J.; Guo, H.; Du, J.; Peiper, S.; Lavi, E.; Samson, M.; Libert, F.; Liesnard, C.; Vassart, G.; Doms, R.; Parmentier, M.; Collman, R., Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J Virol* **1997**, *71*, (4), 3219-3227.
- 89 Biti, R.; French, R.; Young, J.; Bennetts, B.; Stewart, G.; Liang, T., HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* **1997**, *3*, (3), 252-253.
- 90 Lis, H.; Sharon, N., Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **1993**, *218*, (1), 1-27.
- 91 Sharon, N.; Lis, H., Kohlenhydrate und Zellerkennung. *Spektrum d. Wiss.* **1993**, *3*, 66-74.
- 92 Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G. a. M., J., *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press **1999**.
- 93 Gottschalk, A., *Glycoproteins*. Elsevier, Amsterdam, **1972**.
- 94 Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A., Glycosylation and the Immune System. *Science* **2001**, *291*, (5512), 2370-2376.
- 95 Reitsma, S.; Slaaf, D.; Vink, H.; van Zandvoort, M.; oude Egbrink, M., The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Phys* **2007**, *454*, (3), 345-359.
- 96 Lindhorst, T., *Essentials of carbohydrate chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- 97 Maia, I. G.; Leite, A., N-glycosylation in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* **2001**, *24*, 231-234.
- 98 Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L., *Stryer - Biochemie*. 6. Auflage; Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, **2007**.
- 99 Gavel, Y.; Heijne, G. v., Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Engin* **1990**, *3*, (5), 433-442.
- 100 Mellquist, J. L.; Kasturi, L.; Spitalnik, S. L.; Shakin-Eshleman, S. H., The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency. *Biochemistry* **1998**, *37*, (19), 6833-6837.
- 101 Kasturi, L.; Chen, H.; Shakin-Eshleman, S. H., Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem J* **1997** *323*, 415-419.
- 102 Moore, J. P.; Sattentau, Q. J.; Wyatt, R.; Sodroski, J., Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* **1994**, *68*, (1), 469-484.

- 103 Lasky, L. A.; Groopman, J. E.; Fennie, C. W.; Benz, P. M.; Capon, D. J.; Dowbenko, D. J.; Nakamura, G. R.; Nunes, W. M.; Renz, M. E.; Berman, P. W., Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* **1986**, *233*, (4760), 209-212.
- 104 Leonard, C. K.; Spellman, M. W.; Riddle, L.; Harris, R. J.; Thomas, J. N.; Gregory, T. J., Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **1990**, *265*, (18), 10373-10382.
- 105 Modrow, S.; Hahn, B. H.; Shaw, G. M.; Gallo, R. C.; Wong-Staal, F.; Wolf, H., Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* **1987**, *61*, (2), 570-578.
- 106 van Anken, E.; Sanders, R. W.; Liscaljet, I. M.; Land, A.; Bontjer, I.; Tillemans, S.; Nabatov, A. A.; Paxton, W. A.; Berkhout, B.; Braakman, I., Only five of 10 strictly conserved disulfide bonds are essential for folding and eight for function of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, (10), 4298-4309.
- 107 Moore, J. P.; Sodroski, J., Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol* **1996**, *70*, (3), 1863-1872.
- 108 Wei, X.; Decker, J. M.; Wang, S.; Hui, H.; Kappes, J. C.; Wu, X.; Salazar-Gonzalez, J. F.; Salazar, M. G.; Kilby, J. M.; Saag, M. S.; Komarova, N. L.; Nowak, M. A.; Hahn, B. H.; Kwong, P. D.; Shaw, G. M., Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **2003**, *422*, (6929), 307-312.
- 109 Binley, J. M.; Ban, Y.-E. A.; Crooks, E. T.; Eggink, D.; Osawa, K.; Schief, W. R.; Sanders, R. W., Role of Complex Carbohydrates in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Resistance to Antibody Neutralization. *J Virol* **2010**, *84*, (11), 5637-5655.
- 110 Gruters, R. A.; Neefjes, J. J.; Tersmette, M.; de Goede, R. E.; Tulp, A.; Huisman, H. G.; Miedema, F.; Ploegh, H. L., Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. *Nature* **1987**, *330*, (6143), 74-77.
- 111 Fenouillet, E.; Gluckman, J. C.; Jones, I. M., Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem Sci* **1994**, *19*, (2), 65-70.
- 112 Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Sattentau, Q. J.; Sodroski, J.; Hendrickson, W. A., Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* **2000**, *74*, (4), 1961-1972.
- 113 Wülfken, J., Entwicklung CD4 bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion. Dissertation, Universität Hamburg, **2001**.
- 114 Huang, C. C.; Tang, M.; Zhang, M. Y.; Majeed, S.; Montabana, E.; Stanfield, R. L.; Dimitrov, D. S.; Korber, B.; Sodroski, J.; Wilson, I. A.; Wyatt, R.; Kwong, P. D., Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **2005**, *310*, (5750), 1025-1028.
- 115 Schonning, K.; Jansson, B.; Olofsson, S.; Nielsen, J. O.; Hansen, J. S., Resistance to V3-directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer. *Virology* **1996**, *218*, (1), 134-140.
- 116 Lee, W. R.; Syu, W. J.; Du, B.; Matsuda, M.; Tan, S.; Wolf, A.; Essex, M.; Lee, T. H., Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**, *89*, (6), 2213-2217.
- 117 Cocchi, F.; DeVico, A. L.; Garzino-Demo, A.; Cara, A.; Gallo, R. C.; Lusso, P., The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* **1996**, *2*, (11), 1244-1247.

- 118 Chiou, S. H.; Freed, E. O.; Panganiban, A. T.; Kenealy, W. R., Studies on the role of the V3 loop in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1992**, *8*, (9), 1611-1618.
- 119 Moore, J. P.; Nara, P. L., The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *AIDS* **1991**, *5 Suppl 2*, 21-33.
- 120 Cormier, E. G.; Dragic, T., The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* **2002**, *76*, (17), 8953-8957.
- 121 Javaherian, K.; Langlois, A. J.; McDanal, C.; Ross, K. L.; Eckler, L. I.; Jellis, C. L.; Profy, A. T.; Rusche, J. R.; Bolognesi, D. P.; Putney, S. D., Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**, *86*, (17), 6768-6772.
- 122 Javaherian, K.; Langlois, A. J.; LaRosa, G. J.; Profy, A. T.; Bolognesi, D. P.; Herlihy, W. C.; Putney, S. D.; Matthews, T. J., Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* **1990**, *250*, (4987), 1590-1593.
- 123 Huang, W.; Eshleman, S. H.; Toma, J.; Fransen, S.; Stawiski, E.; Paxinos, E. E.; Whitcomb, J. M.; Young, A. M.; Donnell, D.; Mmiro, F.; Musoke, P.; Guay, L. A.; Jackson, J. B.; Parkin, N. T.; Petropoulos, C. J., Coreceptor Tropism in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype D: High Prevalence of CXCR4 Tropism and Heterogeneous Composition of Viral Populations. *J Virol* **2007**, *81*, (15), 7885-7893.
- 124 Low, A. J.; Dong, W.; Chan, D.; Sing, T.; Swanstrom, R.; Jensen, M.; Pillai, S.; Good, B.; Harrigan, P. R., Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS* **2007**, *21*, (14), F17-F24 10.1097/QAD.1090b1013e3282ef1081ea.
- 125 Moulard, M.; Lortat-Jacob, H.; Mondor, I.; Roca, G.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Zhao, L.; Olson, W.; Kwong, P. D.; Sattentau, Q. J., Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **2000**, *74*, (4), 1948-1960.
- 126 Cheng-Mayer, C.; Quiroga, M.; Tung, J. W.; Dina, D.; Levy, J. A., Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol* **1990**, *64*, (9), 4390-4398.
- 127 Pollakis, G.; Kang, S.; Kliphuis, A.; Chalaby, M. I.; Goudsmit, J.; Paxton, W. A., N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* **2001**, *276*, (16), 13433-13441.
- 128 Ogert, R. A.; Lee, M. K.; Ross, W.; Buckler-White, A.; Martin, M. A.; Cho, M. W., N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* **2001**, *75*, (13), 5998-6006.
- 129 Dojahn, J., Kombinatorische Synthese und Untersuchung von V3-Peptid- und Glycopeptidbibliotheken als potentielle HIV Impfstoffe. Dissertation, Universität Hamburg, **2002**.
- 130 Tost, J., Synthese von N-Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins GP120 und Untersuchung ihrer Korezeptorspezifität. **2004**, Dissertation. Universität Hamburg.
- 131 Farber, J. M.; Berger, E. A., HIV's response to a CCR5 inhibitor: I'd rather tighten than switch! *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*, (4), 1749-1751.
- 132 Pereira, C. F.; Paridaen, J. T., Anti-HIV drug development - an overview. *Curr Pharm Des* **2004**, *10*, (32), 4005-4037.
- 133 Roling, J.; Draenert, R.; Goebel, F. D., Options in HIV therapy: present and future. *Internist* **2005**, *46*, (8), 892-894, 896-898.

- 134 Rockstroh, J. K., Antiretroviral therapy of HIV-infections. *Pharm Uns Zeit* **2000**, *29*, (5), 284-296.
- 135 Menéndez-Arias, L., Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antivir Res* **2010**, *85*, (1), 210-231.
- 136 FDA, Webseite: <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDS/Activities/ucml18915.htm>, aufgerufen 17.06.2011.
- 137 Condra, J. H.; Miller, M. D.; Hazuda, D. J.; Emini, E. A., Potential new therapies for the treatment of HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **2002**, *53*, 541-555.
- 138 Imamichi, T., Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr Pharm Des* **2004**, *10*, (32), 4039-4053.
- 139 Highleyman, L., Getting the most from available antiretroviral therapies. *BETA* **2008**, *20*, (4), 14-16.
- 140 Esser, S.; Helbig, D.; Hillen, U.; Dissemond, J.; Grabbe, S., Side effects of HIV therapy. *JDDG* **2007**, *5*, (9), 745-754.
- 141 Castro, H. C.; Loureiro, N. I.; Pujol-Luz, M.; Souza, A. M.; Albuquerque, M. G.; Santos, D. O.; Cabral, L. M.; Frugulhetti, I. C.; Rodrigues, C. R., HIV-1 reverse transcriptase: a therapeutical target in the spotlight. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, (3), 313-324.
- 142 O'Brien, W. A., Saquinavir/Ritonavir: its evolution and current treatment role. *AIDS Read* **2006**, *16*, (1), 38-44.
- 143 Martins, S.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A., The current status of the NNRTI family of antiretrovirals used in the HAART regime against HIV infection. *Curr Med Chem* **2008**, *15*, (11), 1083-1095.
- 144 Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Lehrman, S. N.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H., Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**, *83*, (21), 8333-8337.
- 145 De Clercq, E., New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1587*, (2-3), 258-275.
- 146 Eron, J. J., HIV-1 Protease Inhibitors. *Clin Infect Dis* **2000**, *30*, (Supplement 2), 160-S170.
- 147 Cameron, D. W.; Heath-Chiozzi, M.; Danner, S.; Cohen, C.; Kravcik, S.; Maurath, C.; Sun, E.; Henry, D.; Rode, R.; Potthoff, A.; Leonard, J., Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. *The Lancet* **1998**, *351*, (9102), 543-549.
- 148 Anderson, J.; Schiffer, C.; Lee, S. K.; Swanstrom, R., Viral protease inhibitors. *Handb Exp Pharmacol* **2009**, (189), 85-110.
- 149 Randolph, J.; DeGoey, D., Peptidomimetic inhibitors of HIV protease. *Curr Top Med Chem* **2004**, *4*, 1079-1095.
- 150 Hicks, C.; Gulick, R. M., Raltegravir: The First HIV Type 1 Integrase Inhibitor. *Clin Infect Dis* **2009**, *48*, (7), 931-939.
- 151 Croxtall, J. D.; Lyseng-Williamson, K. A.; Perry, C. M., Raltegravir. *Drugs* **2008**, *68*, (1), 131-138.
- 152 Shimura, K.; Kodama, E.; Sakagami, Y.; Matsuzaki, Y.; Watanabe, W.; Yamataka, K.; Watanabe, Y.; Ohata, Y.; Doi, S.; Sato, M.; Kano, M.; Ikeda, S.; Matsuoka, M., Broad Antiretroviral Activity and Resistance Profile of the Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol* **2008**, *82*, (2), 764-774.
- 153 DeJesus, E.; Berger, D.; Markowitz, M.; Cohen, C.; Hawkins, T.; Ruane, P.; Elion, R.; Farthing, C.; Zhong, L.; Cheng, A. K.; McColl, D.; Kearney, B. P., Antiviral Activity, Pharmacokinetics, and Dose

- Response of the HIV-1 Integrase Inhibitor GS-9137 (JTK-303) in Treatment-Naive and Treatment-Experienced Patients. *J AIDS* **2006**, *43*, (1), 1-5.
- 154 Grinsztejn, B.; Nguyen, B.-Y.; Katlama, C.; Gatell, J. M.; Lazzarin, A.; Vittecoq, D.; Gonzalez, C. J.; Chen, J.; Harvey, C. M.; Isaacs, R. D., Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *The Lancet* **2007**, *369*, (9569), 1261-1269.
- 155 Lataillade, M.; Kozal, M. J., The Hunt for HIV-1 Integrase Inhibitors. *AIDS Patient Care and STDs* **2006**, *20*, (7), 489-501.
- 156 Li, F.; Goila-Gaur, R.; Salzwedel, K.; Kilgore, N. R.; Reddick, M.; Matallana, C.; Castillo, A.; Zoumplis, D.; Martin, D. E.; Orenstein, J. M.; Allaway, G. P.; Freed, E. O.; Wild, C. T., PA-457: A potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100*, (23), 13555-13560.
- 157 Blair, W. S.; Cao, J.; Fok-Seang, J.; Griffin, P.; Isaacson, J.; Jackson, R. L.; Murray, E.; Patick, A. K.; Peng, Q.; Perros, M.; Pickford, C.; Wu, H.; Butler, S. L., New Small-Molecule Inhibitor Class Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virion Maturation. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, (12), 5080-5087.
- 158 Martin, D.; Salzwedel, K.; Allaway, G., Bevirimat: a novel maturation inhibitor for the treatment of HIV-1 infection. *Antivir Chem Chemother* **2008**, *19*, (3), 107-113.
- 159 Bullock, P.; Larsen, D.; Press, R.; Wehrman, T.; Martin, D. E., The absorption, distribution, metabolism and elimination of bevirimat in rats. *Biopharm Drug Dispos* **2008**, *29*, (7), 396-405.
- 160 Hillier, S. L.; Moench, T.; Shattock, R.; Black, R.; Reichelderfer, P.; Veronese, F., In Vitro and In Vivo: The Story of Nonoxynol 9. *J AIDS* **2005**, *39*, (1), 1-8.
- 161 Van Damme, L.; Ramjee, G.; Alary, M.; Vuylsteke, B.; Chandeying, V.; Rees, H.; Sirivongrangsorn, P.; Tshibaka, L. M.; Ettiègne-Traoré, V.; Uaheowitchai, C.; Karim, S. S. A.; Mâsse, B.; Perriens, J.; Laga, M., Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *The Lancet* **2002**, *360*, (9338), 971-977.
- 162 Whatmore, A. M.; Cook, N.; Hall, G. A.; Sharpe, S.; Rud, E. W.; Cranage, M. P., Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J Virol* **1995**, *69*, (8), 5117-5123.
- 163 Kahn, M. A., A review and update on HIV infection and the AIDS epidemic in the adolescent and adult. *J Tenn Dent Assoc* **2000**, *80*, (4), 21-27.
- 164 Deacon, N. J.; Tsykin, A.; Solomon, A.; Smith, K.; Ludford-Menting, M.; Hooker, D. J.; McPhee, D. A.; Greenway, A. L.; Ellett, A.; Chatfield, C.; Lawson, V. A.; Crowe, S.; Maerz, A.; Sonza, S.; Learmont, J.; Sullivan, J. S.; Cunningham, A.; Dwyer, D.; Downton, D.; Mills, J., Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **1995**, *270*, (5238), 988-991.
- 165 McMichael, A. J.; Borrow, P.; Tomaras, G. D.; Goonetilleke, N.; Haynes, B. F., The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10*, (1), 11-23.
- 166 Letvin, N. L.; Barouch, D. H.; Montefiori, D. C., Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* **2002**, *20*, 73-99.
- 167 Sterjovski, J.; Churchill, M. J.; Wesselingh, S. L.; Gorry, P. R., HIV-1 entry inhibitors: classes, applications and factors affecting potency. *Curr HIV Res* **2006**, *4*, (4), 387-400.
- 168 Rusconi, S.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T., An update in the development of HIV entry inhibitors. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, (13), 1273-1289.
- 169 Keduo Qian, S. L. M.-N. K.-H. L., HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med Res Rev* **2009**, *29*, (2), 369-393.

- 170 Bhattacharya, S.; Osman, H., Novel targets for anti-retroviral therapy. *J Infect* **2009**, *59*, (6), 377-386.
- 171 Strizki, J., Targeting HIV attachment and entry for therapy. *Adv Pharmacol* **2008**, *56*, 93-120.
- 172 Daar, E. S.; Li, X. L.; Moudgil, T.; Ho, D. D., High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, *87*, (17), 6574-6578.
- 173 Schooley, R.; Merigan, T.; Gaut, P.; Hirsch, M.; Holodniy, M.; Flynn, T.; Liu, S.; Byington, R.; Henochowicz, S.; Gubish, E., et al., Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I-II escalating dosage trial. *Annu Intern Med* **1990**, *112*, (4), 247-253.
- 174 Norris, D.; Morales, J.; Godofsky, E.; Garcia, F.; Hardwicke, R.; Lewis, S. In *TNX-355, in combination with optimized background regimen, achieves statistically significant viral load reduction and CD4 cell count increase when compared with OBR alone in phase 2 study at 48 weeks*, 16th International AIDS Conference, Toronto, Canada, **2006**.
- 175 Hanna, G. J.; Lalezari, J.; Hellinger, J. A.; Wohl, D. A.; Nettles, R.; Persson, A.; Krystal, M.; Lin, P.; Colonna, R.; Grasela, D. M., Antiviral Activity, Pharmacokinetics, and Safety of BMS-488043, a Novel Oral Small-Molecule HIV-1 Attachment Inhibitor, in HIV-1-Infected Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, (2), 722-728.
- 176 Williams, I. G., Enfuvirtide (Fuzeon): the first fusion inhibitor. *Int J Clin Pract* **2003**, *57*, (10), 890-897.
- 177 Poveda, E.; Briz, V.; Soriano, V., Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev* **2005**, *7*, (3), 139-147.
- 178 Oldfield, V.; Keating, G.; Plosker, G., Enfuvirtide: A Review of its Use in the Management of HIV Infection. *Drugs* **2005**, *65*, 1139-1160.
- 179 Trimeris, Information on Fuzeon. Webseite: <http://www.fuzeon.com/>, aufgerufen 25.5.2011.
- 180 Schon, A.; Madani, N.; Klein, J. C.; Hubicki, A.; Ng, D.; Yang, X.; Smith, A. B. r.; Sodroski, J.; Freire, E., Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. *Biochemistry* **2006**, *45*, (36), 10973-10980.
- 181 Si, Z.; Madani, N.; Cox, J. M.; Chruma, J. J.; Klein, J. C.; Schon, A.; Phan, N.; Wang, L.; Biorn, A. C.; Cocklin, S.; Chaiken, I.; Freire, E.; Smith, A. B. r.; Sodroski, J. G., Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, *101*, (14), 5036-5041.
- 182 Zou, Y. R.; Kottmann, A. H.; Kuroda, M.; Taniuchi, I.; Littman, D. R., Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **1998**, *393*, (6685), 595-599.
- 183 Tachibana, K.; Hirota, S.; Iizasa, H.; Yoshida, H.; Kawabata, K.; Kataoka, Y.; Kitamura, Y.; Matsushima, K.; Yoshida, N.; Nishikawa, S.-i.; Kishimoto, T.; Nagasawa, T., The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **1998**, *393*, (6685), 591-594.
- 184 De Clercq, E., Potential Clinical Applications of the CXCR4 Antagonist Bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* **2005**, *5*, 805-824.
- 185 Moyle, G.; DeJesus, E.; Boffito, M.; Wong, R. S.; Gibney, C.; Badel, K.; MacFarland, R.; Calandra, G.; Bridger, G.; Becker, S.; Team, X. A. C. T. S., Proof of Activity with AMD11070, an Orally Bioavailable Inhibitor of CXCR4-Tropic HIV Type 1. *Clin Infect Dis* **2009**, *48*, (6), 798-805.
- 186 Hatse, S.; Princen, K.; Bridger, G.; De Clercq, E.; Schols, D., Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* **2002**, *527*, (1-3), 255-262.
- 187 Nakashima, H.; Masuda, M.; Murakami, T.; Koyanagi, Y.; Matsumoto, A.; Fujii, N.; Yamamoto, N., Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-

- 7]polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**, *36*, (6), 1249-1255.
- 188 Arakaki, R.; Tamamura, H.; Premanathan, M.; Kanbara, K.; Ramanan, S.; Mochizuki, K.; Baba, M.; Fujii, N.; Nakashima, H., T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *J Virol* **1999**, *73*, (2), 1719-1723.
- 189 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.
- 190 Gulick, R. M.; Lalezari, J.; Goodrich, J.; Clumeck, N.; DeJesus, E.; Horban, A.; Nadler, J.; Clotet, B.; Karlsson, A.; Wohlfeiler, M.; Montana, J. B.; McHale, M.; Sullivan, J.; Ridgway, C.; Felstead, S.; Dunne, M. W.; van der Ryst, E.; Mayer, H., Maraviroc for Previously Treated Patients with R5 HIV-1 Infection. *N Engl J Med* **2008**, *359*, (14), 1429-1441.
- 191 Singh, I. P.; Chauthe, S. K., Small molecule HIV entry inhibitors: Part I. Chemokine receptor antagonists: 2004 – 2010. *Exp Opin Ther Pat* **2011**, *21*, (2), 227-269.
- 192 Trkola, A.; Ketas, T. J.; Nagashima, K. A.; Zhao, L.; Cilliers, T.; Morris, L.; Moore, J. P.; Maddon, P. J.; Olson, W. C., Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* **2001**, *75*, (2), 579-588.
- 193 Mosier, D. E.; Picchio, G. R.; Gulizia, R. J.; Sabbe, R.; Pognard, P.; Picard, L.; Offord, R. E.; Thompson, D. A.; Wilken, J., Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol* **1999**, *73*, (5), 3544-3550.
- 194 Julg, B.; Goebel, F. D., What's New in HIV/AIDS? Chemokine receptor antagonists: a new era of HIV therapy? *Infection* **2005**, *33*, (5-6), 408-410.
- 195 Princen, K.; Hatse, S.; Vermeire, K.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Gerlach, L. O.; Rosenkilde, M.; Schwartz, T. W.; Skerlj, R.; Bridger, G.; Schols, D., Inhibition of human immunodeficiency virus replication by a dual CCR5/CXCR4 antagonist. *J Virol* **2004**, *78*, (23), 12996-13006.
- 196 Ghezzi, S.; Menzo, S.; Brambilla, A.; Bordignon, P. P.; Lorini, A. L.; Clementi, M.; Poli, G.; Vicenzi, E., Inhibition of R5X4 Dualtropic HIV-1 Primary Isolates by Single Chemokine Co-receptor Ligands. *Virology* **2001**, *280*, (2), 253-261.
- 197 Chen, X.; Yang, L.; Zhang, N.; Turpin, J. A.; Buckheit, R. W.; Osterling, C.; Oppenheim, J. J.; Howard, O. M. Z., Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine, Inhibits Chemokine Receptor Function and Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47*, (9), 2810-2816.
- 198 Kullmann, W., *Enzymatic Peptide Synthesis*. CRC Press, Boca Raton, **1987**.
- 199 Itakura, K.; Hirose, T.; Crea, R.; Riggs, A. D.; Heyneker, H. L.; Bolivar, F.; Boyer, H. W., Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **1977**, *198*, (4321), 1056-1063.
- 200 Merrifield, R. B., Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* **1962**, *21*, 412.
- 201 Merrifield, R. B., Solid-Phase Peptide Syntheses. *Endeavour* **1965**, *24*, 3-7.
- 202 Tam, J. P.; Xu, J.; Eom, K. D., Methods and strategies of peptide ligation. *Pept Sci* **2001**, *60*, (3), 194-205.
- 203 Haase, C.; Seitz, O., *Chemical Synthesis of Glycopeptides*. **2007**; 1-36.

- 204 Carpino, L. A.; Han, G. Y., The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. *J Org Chem* **1972**, *37*, 3404-3409.
- 205 Reid, G. E.; Simpson, R. J., Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids. *Anal Biochem* **1992**, *200*, (2), 301-309.
- 206 Carpino, L. A., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 4397-4398.
- 207 Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Muegge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M., The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salt. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, (3), 441-445.
- 208 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. *Tetrahedr Lett* **1989**, *30*, 2739-2742.
- 209 Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T., Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *J Org Chem* **1992**, *57*, (18), 4781-4784.
- 210 Loupy, A., *Microwaves in Organic Chemistry (Vol. 2)*. Wiley-VCH Weinheim, **2006**.
- 211 Santagada, V.; Frecentese, F.; Perissutti, E.; Fiorino, F.; Severino, B.; Caliendo, G., Microwave assisted synthesis: a new technology in drug discovery. *Mini Rev Med Chem* **2009**, *9*, (3), 340-358.
- 212 Bacsa, B.; Horváti, K.; Bosze, S.; Andreae, F.; Kappe, C. O., Solid-Phase Synthesis of Difficult Peptide Sequences at Elevated Temperatures: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Technologies. *J Org Chem* **2008**, *73*, (19), 7532-7542.
- 213 Dwek, R. A., Glycobiology - Towards understanding the function of sugars. *Biochem Soc Trans* **1995**, *23*, (1), 1-25.
- 214 Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G., Glycoprotein synthesis: an update. *Chem Rev* **2009**, *109*, (1), 131-163.
- 215 Vetter, D.; Tumeltyl, D.; Singh, S. K.; Gallop, M. A., A versatile solid-phase synthesis of N-linked glycopeptides. *Angew Chem Int Ed* **1995**, *107*, 94-97.
- 216 Guo, Z. W.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T., Solid-phase synthesis of CD52 glycopeptide and an efficient route to Asn-core pentasaccharide conjugate. *Bioorg Med Chem* **1997**, *5*, (10), 1917-1924.
- 217 Cohen-Anisfeld, S. T.; Lansbury Jr., P. T., A Practical, Convergent Method for Glycopeptide Synthesis. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 10531-10537.
- 218 Bodanszky, M.; Kwei, J. Z., Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependence in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides. *Int J Pept Protein Res* **1978**, *12*, (2), 69-74.
- 219 Anisfeld, S. T.; Lansbury, P. T., A convergent approach to the chemical synthesis of asparagine-linked glycopeptides. *J Org Chem* **1990**, *55*, (21), 5560-5562.
- 220 Dolling, R.; Beyermann, M.; Haenel, J.; Kernchen, F.; Krause, E.; Franke, P.; Brudel, M.; Bienert, M., Piperidine-mediated side product formation for Asp(OBut)-containing peptides. *J Chem Soc, Chem Comm* **1994**, (7), 853-854.
- 221 Wade, J. D.; Mathieu, M. N.; Macris, M.; Tregear, G. W., Base-induced side reactions in Fmoc-solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as Nalpha-deprotection reagent. *Lett Pept Sci* **2000**, *7*, 107-112.

- 222 Annis, I.; Hargittai, B.; Barany, G., Disulfide bond formation in peptides. *Meth Enzymol* **1997**, *289*, 198-221.
- 223 Darlak, K.; Wiegandt Long, D.; Czerwinski, A.; Darlak, M.; Valenzuela, F.; Spatola, A. F.; Barany, G., Facile preparation of disulfide-bridged peptides using the polymer-supported oxidant CLEAR-OX. *J Pept Res* **2004**, *63*, (3), 303-312.
- 224 Kellenberger, C.; Hietter, H.; Luu, B., Regioselective formation of the three disulfide bonds of a 35-residue insect peptide. *Pept Res* **1995**, *8*, (6), 321-327.
- 225 Munson, M. C.; Barany, G., Synthesis of .alpha.-conotoxin SI, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, (22), 10203-10210.
- 226 Galande, A. K.; Weissleder, R.; Tung, C.-H., An Effective Method of On-Resin Disulfide Bond Formation in Peptides. *J Combin Chem* **2005**, *7*, (2), 174-177.
- 227 Bulheller, B. M.; Rodger, A.; Hirst, J. D., Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* **2007**, *9*, 2020-2035.
- 228 Galla, H. J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1988**.
- 229 Cantor, C. R.; Schimmel, P. R., *Biophysical Chemistry*. 1st ed.; W. H. Freeman **1980**.
- 230 Lottspeich, F.; Zorbas, H., *Bioanalytik*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg **1998**.
- 231 Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta - Proteins & Proteomics* **2005**, *1751*, (2), 119-139.
- 232 Lee, W.; Wallace, B. A., Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **2008**, *89*, (5), 392-400.
- 233 Winter, R.; Noll, F., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner, Stuttgart **1998**.
- 234 Rodger, A.; Marrington, R.; Roper, D.; Windsor, S., Circular Dichroism Spectroscopy for the Study of Protein-Ligand Interactions. *Meth Mol Biol* **2005**, *305*, 343-363.
- 235 Kelly, S. M.; Price, N. C., Circular Dichroism to Study Protein Interactions. *Curr Protocols Prot Sci* **2006**, *20.10*.
- 236 Greenfield, N. J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* **2007**, *1*, (6), 2876-2890.
- 237 Fändrich, M.; Dobson, C. M., The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J* **2002**, *21*, (21), 5682-5690.
- 238 Perez-Iratxeta, C.; Andrade-Navarro, M., K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol* **2008**, *8*, (1), 25.
- 239 Lees, J. G.; Smith, B. R.; Wien, F.; Miles, A. J.; and Wallace, B. A., CDtool - An Integrated Software Package for Circular Dichroism Spectroscopic Data Processing, Analysis and Archiving *Anal Biochem* **2004**, *332*, (2).
- 240 Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* **1999**, *38*, 1784-1788.
- 241 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. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 6108-6117.
- 242 Meyer, B.; Peters, T., NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew Chem Int Ed* **2003**, *42*, 864-890.

- 243 Kalk, A.; Berendsen, H. J. C., Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins. *J Magn Reson* **1976**, *24*, (3), 343-366.
- 244 Scherf, T.; Anglister, J., A T1 rho-filtered two-dimensional transferred NOE spectrum for studying antibody interactions with peptide antigens. *Biophys J* **1993**, *64*, (3), 754-761.
- 245 Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B., Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR. *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 5336-5337.
- 246 Benie, A. J.; Moser, R.; Bäuml, E.; Blaas, D.; Peters, T., Virus-Ligand Interactions: Identification and Characterization of Ligand Binding by NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc* **2002**, *125*, (1), 14-15.
- 247 Meinecke, R.; Meyer, B., Determination of the binding specificity of an integral membrane protein by saturation transfer difference NMR: RGD peptide ligands binding to integrin alphaIIb beta3. *J Med Chem* **2001**, *44*, (19), 3059-3065.
- 248 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 alpha(IIb)beta3 in native platelets than in liposomes. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, (3), 916-919.
- 249 Zheng, G.; Price, W. S., Solvent signal suppression in NMR. *Progr NMR Spectrosc* **2010**, *56*, (3), 267-288.
- 250 Hoult, D. I., Solvent peak saturation with single phase and quadrature fourier transformation. *J Magn Reson* **1976**, *21*, (2), 337-347.
- 251 Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenář, V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **1992**, *2*, (6), 661-665.
- 252 Hwang, T. L.; Shaka, A. J., Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J Magn Reson* **1995**, *112*, (2), 275-279.
- 253 Devesa, F.; Chams, V.; Dinadayala, P.; Stella, A.; Ragas, A.; Auboiroux, H.; Stegmann, T.; Poquet, Y., Functional reconstitution of the HIV receptors CCR5 and CD4 in liposomes. *Eur J Biochem* **2002**, *269*, (21), 5163-5174.
- 254 Haselhorst, T.; Münster-Kühnel, A. K.; Oshlies, M.; Tiralongo, J.; Gerardy-Schahn, R.; Itzstein, M. v., Direct detection of ligand binding to Sepharose-immobilised protein using saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *359*, (4), 866-870.
- 255 Pereira, A.; Pfeifer, T. A.; Grigliatti, T. A.; Andersen, R. J., Functional Cell-Based Screening and Saturation Transfer Double-Difference NMR Have Identified Haplosamate A as a Cannabinoid Receptor Agonist. *ACS Chemical Biology* **2009**, *4*, (2), 139-144.
- 256 Huang, C.-H., Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* **1969**, *8*, (1), 344-352.
- 257 Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **1965**, *13*, (1), 238-252, IN226-IN227.
- 258 Zhang, L.; Gu, F. X.; Chan, J. M.; Wang, A. Z.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C., Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther* **2007**, *83*, (5), 761-769.
- 259 Papahadjopoulos, D., *Liposomes and their uses in biology and medicine* New York Academy of Science **1978**; Vol. 308.
- 260 Lee, A. G., Lipid phase transitions and phase diagrams I. Lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta - Reviews on Biomembranes* **1977**, *472*, (2), 237-281.

- 261 Lee, B.-S.; Mabry, S. A.; Jonas, A.; Jonas, J., High-pressure proton NMR study of lateral self-diffusion of phosphatidylcholines in sonicated unilamellar vesicles. *Chem Phys Lipids* **1995**, *78*, (2), 103-117.
- 262 Knowles, P.; Marsh, D., Magnetic resonance of membranes. *Biochem J* **1991**, *274*, 625-641.
- 263 Ladbroke, B. D.; Chapman, D., Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. *Chem Phys Lipids* **1969**, *3*, (4), 304-356.
- 264 Papahadjopoulos, D.; Poste, G.; Schaeffer, B. E.; Vail, W. J., Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* **1974**, *352*, (1), 10-28.
- 265 Fritze, A., Präparation und Charakterisierung von Liposomen zum passiven und aktiven Targeting. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., **2005**.
- 266 MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P. M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L.-r., Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* **1991**, *1061*, (2), 297-303.
- 267 Devesa, F.; Chams, V.; Dinadayala, P.; Stella, A.; Ragas, A.; Auboiroux, H.; Stegmann, T.; Poquet, Y., Functional reconstitution of the HIV receptors CCR5 and CD4 in liposomes. *Eur J Biochem* **2002**, *269*, (21), 5163-5174.
- 268 Cooper, M. A.; Hansson, A.; Löfås, S.; Williams, D. H., A Vesicle Capture Sensor Chip for Kinetic Analysis of Interactions with Membrane-Bound Receptors. *Anal Biochem* **2000**, *277*, (2), 196-205.
- 269 Masson, L.; Mazza, A.; Brousseau, R., Stable Immobilization of Lipid Vesicles for Kinetic Studies Using Surface Plasmon Resonance. *Anal Biochem* **1994**, *218*, (2), 405-412.
- 270 Richard, P.; Rigaud, J.-L.; GrÄBer, P., Reconstitution of CF0F1 into liposomes using a new reconstitution procedure. *Eur J Biochem* **1990**, *193*, (3), 921-925.
- 271 Niu, L.; Kim, J.-M.; Khorana, H. G., Structure and function in rhodopsin: Asymmetric reconstitution of rhodopsin in liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*, (21), 13409-13412.
- 272 Berger, N.; Sachse, A.; Bender, J.; Schubert, R.; Brandl, M., Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *Int J Pharm* **2001**, *223*, (1-2), 55-68.
- 273 Torchilin, V. P.; Weissig, V., *Liposomes: a practical approach*. Oxford, Oxford University Press., **2003**.
- 274 Huennefeld, B., Analyse der Bindung von Peptiden und Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-1 Glycoproteins gp120 mit dem humanen Korezeptor CCR5. Dissertation, Universität Hamburg Hamburg, **2006**.
- 275 Jonsson, U.; Fagerstam, L.; Ivarsson, B.; Johnsson, B.; Karlsson, R.; Lundh, K.; Lofas, S.; Persson, B.; Roos, H.; Ronnberg, I.; et, a. l., Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **1991**, *11*, (5), 620-627.
- 276 Holmes, S. D.; May, K.; Johansson, V.; Markey, F.; Critchley, I. A., Studies on the interaction of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore). *J Micro Meth* **1997**, *28*, 77-84.
- 277 Xing, L.; Tjarnlund, K.; Lindqvist, B.; Kaplan, G. G.; Feigelstock, D.; Cheng, R. H.; Casasnovas, J. M., Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J* **2000**, *19*, (6), 1207-1216.
- 278 Quinn, J. G.; O'Neill, S.; Doyle, A.; McAtamney, C.; Diamond, D.; MacCraith, B. D.; O'Kennedy, R., Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem* **2000**, *281*, (2), 135-143.
- 279 Turbadar, T., Complete Absorbtion of Light by Thin Metal Films. *Proc Phys Soc* **1959**, *73*, 40.

- 280 Kretschmann, E.; Rather, H., Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch* **1968**, *230*, 2135-2136.
- 281 Otto, A., Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys* **1968**, *216*, 398-410.
- 282 Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, (7), 515-528.
- 283 Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C., Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Coll Interf Sci* **1991**, *143*, 513-526.
- 284 Weimar, T., Recent Trends in the Application of Evanescent Wave Biosensors. *Angew Chem Int Ed* **2000**, *39*, (7), 1219-1221.
- 285 Biacore, <http://www.biacore.com/lifesciences/index.html>. Webseite: aufgerufen 25.5.2011.
- 286 Karlsson, R.; Stahlberg, R., Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal Biochem* **1995**, *228*, (2), 274-280.
- 287 Nagata, K.; Handa, H., *Real-time analysis of biomolecular interactions: Applications of Biacore*. Springer Verlag, Berlin, **2000**.
- 288 Rich, R. L.; Myszka, D. G., Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* **2000**, *11*, (1), 54-61.
- 289 Nieba, L.; Krebber, A.; Pluckthun, A., Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **1996**, *234*, (2), 155-165.
- 290 Myszka, D. G.; Morton, T. A.; Doyle, M. L.; Chaiken, I. M., Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophys Chem* **1997**, *64*, (1-3), 127-137.
- 291 Sirois, S.; Touaibia, M.; Chou, K. C.; Roy, R., Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine. *Curr Med Chem* **2007**, *14*, (30), 3232-3242.
- 292 Meyer, S., Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des GP120 aus dem HIV. Dissertation, Universität Hamburg **1999**.
- 293 Flügge, C., Einfluss der Glycosylierung auf Struktur und Bindungsverhalten der dritten variablen Loop des HIV-1 Glycoproteins GP120. Dissertation, Universität Hamburg, **2008**.
- 294 Barker, S. A.; Foster, A. B.; Siddiqui, I. R.; Stacey, M., Structure of an acidic polysaccharide elaborated by *Aerobacter aerogenes*. *Nature* **1958**, *181*, (4614), 999.
- 295 Zemplén, G.; Kunz, A., Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker. *Ber. deutsch. chem. Gesellsch.* **1923**, *56*, (7), 1705-1710.
- 296 Likhoshesterov, L. M.; Novikova, O. S.; Derevitskaja, V. A.; Kochetkov, N. K., A new simple synthesis of amino sugar [beta]-glycosylamines. *Carbohydr Res* **1986**, *146*, (1), C1-C5.
- 297 Hackenberger, C. P.; O'Reilly, M. K.; Imperiali, B., Improving glycopeptide synthesis: a convenient protocol for the preparation of beta-glycosylamines and the synthesis of glycopeptides. *J Org Chem* **2005**, *70*, (9), 3574-3578.
- 298 Freeze, H. H., Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* **2006**, *7*, (7), 537-551.
- 299 Murata, T.; Usui, T., Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. *Biosci Biotechnol Biochem* **2006**, *70*, (5), 1049-1059.

- 300 Rastall, R. A.; Bucke, C., Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Biotechnol Genet Eng Rev* **1992**, *10*, 253-281.
- 301 Tanabe, T.; Kawase, T.; Watanabe, T.; Uchida, Y.; Mitsutomi, M., Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Biosci Bioengin* **2000**, *89*, (1), 27-32.
- 302 Terayama, H.; Takahashi, S.; Kuzuhara, H., Large-Scale Preparation of N, N'-Diacetylchitobiose by Enzymic Degradation of Chitin and its Chemical Modifications. *J Carbohydr Chem* **1993**, *12*, (1), 81 - 93.
- 303 Nishimura, S.-I.; Kuzuhara, H.; Takiguchi, Y.; Shimahara, K., Peracetylated chitobiose: Preparation by specific degradations of chitin, and chemical manipulations. *Carbohydr Res* **1989**, *194*, 223-231.
- 304 Likhoshesterov, L. M.; Novikova, O. S.; Shibaev, V. N., New Efficient Synthesis of β -Glucosylamines of Mono- and Disaccharides with the Use of Ammonium Carbamate. *Dokl Chem* **2002**, *383*, (4), 89-92.
- 305 Lauer, J. L.; Fields, C. G.; Fields, G. B., Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis. *Lett Pept Sci* **1995**, *1*, (4), 197-205.
- 306 Nilsson, M. R.; Nguyen, L. L.; Raleigh, D. P., Synthesis and Purification of Amyloidogenic Peptides. *Anal Biochem* **2001**, *288*, (1), 76-82.
- 307 Moroder, L.; Musiol, H. J.; Gotz, M.; Renner, C., Synthesis of single- and multiple-stranded cysteine-rich peptides. *Biopolymers* **2005**, *80*, (2-3), 85-97.
- 308 Galanis, A. S.; Albericio, F.; Grøtli, M., Enhanced microwave-assisted method for on-bead disulfide bond formation: Synthesis of alpha-conotoxin MII. *Pept Sci* **2009**, *92*, (1), 23-34.
- 309 Watanabe, K.; Matsuda, T.; Sato, Y., The secondary structure of ovomucoid and its domains as studied by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta - Protein Structure* **1981**, *667*, (2), 242-250.
- 310 Schuster, O.; Klich, G.; Sinnwell, V.; Kränz, H.; Paulsen, H.; Meyer, B., 'Wave-type' structure of a synthetic hexaglycosylated decapeptide: A part of the extracellular domain of human glycoporphin A. *J Biomol NMR* **1999**, *14*, (1), 33-45.
- 311 Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- 312 Kessler, H.; Gehrke, M.; Griesinger, C., Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente. *Angew Chem* **1988**, *100*, (4), 507-554.
- 313 Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R., Investigation of exchange process by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys* **1979**, *71*, 4546-4553.
- 314 Atkins, P.; De Paul, J., *Physical Chemistry*. 9.; Oxford University Press, **2009**.
- 315 Rademacher, C.; Krishna, N. R.; Palcic, M.; Parra, F.; Peters, T., NMR Experiments Reveal the Molecular Basis of Receptor Recognition by a Calicivirus. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, (11), 3669-3675.
- 316 Neffe, A., Design, Synthese und Analyse CD4-bindender Peptidomimetika. Dissertation, Universität Hamburg **2004**.
- 317 Wallach, K., Synthese von alaninsubstituierten V3-Glycopeptiden aus dem HIV-1-Glycoprotein GP120 und Untersuchung ihrer CCR5-Corezeptorspezifität. Diplomarbeit, Universität Hamburg **2006**.
- 318 Lindner, M., Synthese und Analyse von V3-Peptiden aus dem gp120 des HIV-1. Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2003**.
- 319 Clevestig, P.; Pramanik, L.; Leitner, T.; Ehrnst, A., CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol* **2006**, *87*, (3), 607-612.

- 320 Polzer, S.; Müller, H.; Schreiber, M., Effects of mutations on HIV-1 infectivity and neutralization involving the conserved NNNT amino acid sequence in the gp120 V3 loop. *FEBS Lett* **2009**, *583*, (7), 1201-1206.
- 321 Nolan, K. M.; Jordan, A. P.; Hoxie, J. A., Effects of partial deletions within the human immunodeficiency virus type 1 V3 loop on coreceptor tropism and sensitivity to entry inhibitors. *J Virol* **2008**, *82*, (2), 664-673.
- 322 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.
- 323 Scherres, W., Modellierung der Interaktion des humanen Korezeptor CCR5 mit der V3-Loop des Glycoproteins gp120 aus dem HIV-1. Dissertation, Universität Hamburg **2009**.
- 324 Palczewski K; Kumasaka T; Hori T; Behnke CA; Motoshima H; Fox BA, T. I.; Teller DC; Okada T; Stenkamp RE; Yamamoto M; M., M., Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, (6), 739-745.
- 325 Kühnemund, T., Synthese von Peptiden aus dem N-terminalen Bereich des humanen CCR5 unter Verwendung von Sulfotyrosinen und deren Bindung an das HIV-1 Glycoprotein GP120. Dissertation, Universität Hamburg **2005**.
- 326 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.
- 327 Isaka, Y.; Sato, A.; Miki, S.; Kawauchi, S.; Sakaida, H.; Hori, T.; Uchiyama, T.; Adachi, A.; Hayami, M.; Fujiwara, T.; Yoshie, O., Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology* **1999**, *264*, (1), 237-243.
- 328 Nabatov, A. A.; Pollakis, G.; Linnemann, T.; Kliphuis, A.; Chalaby, M. I.; Paxton, W. A., Inpatient alterations in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V1V2 and V3 regions differentially modulate coreceptor usage, virus inhibition by CC/CXC chemokines, soluble CD4, and the b12 and 2G12 monoclonal antibodies. *J Virol* **2004**, *78*, (1), 524-530.
- 329 Shi, Y.; Brandin, E.; Vincic, E.; Jansson, M.; Blaxhult, A.; Gyllensten, K.; Moberg, L.; Brostrom, C.; Fenyo, E. M.; Albert, J., Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *J Gen Virol* **2005**, *86*, (12), 3385-3396.
- 330 Da, L.-T.; Wu, Y.-D., Theoretical Studies on the Interactions and Interferences of HIV-1 Glycoprotein gp120 and Its Coreceptor CCR5. *J Chem Inform Model* **2011**, *51*, (2), 359-369.
- 331 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.
- 332 Eichler, J.; Bienert, M.; Stierandova, A.; Lebl, M., Evaluation of cotton as a carrier for solid-phase peptide synthesis. *Pept Res* **1991**, *4*, (5), 296-307.
- 333 Unverzagt, C.; Kunz, H., Synthesis of glycopeptides and neoglycoproteins containing the fucosylated linkage region of N-glycoproteins. *Bioorg Med Chem* **1994**, *2*, (11), 1189-1201.
- 334 Zilliken, F.; Braun, G. A.; Rose, C. S.; György, P., Crystallized N,N'-Diacetylchitobiose1. *J Am Chem Soc* **1955**, *77*, (5), 1296-1297.

Abkürzungsverzeichnis

1D-, 2D-	ein-, zweidimensional
7TM	Sieben- α -Helix-Transmembranrezeptor
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Äq	Äquivalent
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCR	C-Typ-Chemokinrezeptor
CD	Circulardichroismus
CDx	<i>cluster of differentiation</i>
Chi	Chitobiose (<i>N</i> -Acetyl-D-glucosaminyl- β 1,4- <i>N</i> -acetyl-D-glucosamin)
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CV	<i>column volume</i>
CXCR	CX-Typ-Chemokinrezeptor
<i>d</i>	Dublett
<i>d</i>	Dauer x eines NMR-Delays
δ	chemische Verschiebung
- <i>d_n</i>	n-fach deuteriert
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
<i>dd</i>	Dublett von einem Dublett
ddH ₂ O	bdestilliertes Wasser (18.8 M Ω)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<i>ds</i> DNA	<i>double stranded DNA</i>
EA	Ethanolamin
EC	<i>extracellular</i>
ECL	Extrazellulärer Loop
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetat
EE	Essigsäureethylester (Ethylacetat)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
FA	Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure)
F _{ab}	<i>Fragment antigen binding</i> , Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
Fc	<i>flow cell</i> , Biacore-Flusszelle
FID	<i>free induction decay</i>
FKS	Fötale Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	Fucose
FT	Fourier-Transformation
Gal	Galactose

ges.	gesättigt
GHOST	<i>green fluorescent human osteosarcoma</i>
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose
GP	Glycoprotein
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HR-MAS	<i>high resolution magic angle spinning</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOS	<i>human osteosarcoma</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC	<i>intracellular</i>
ICL	Innerzellulärer Loop
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
k	1k entspricht 1024 Einheiten
K_D	thermodynamische Dissoziationskonstante [mol/L]
kDa	Kilodalton
k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante [s^{-1}]
k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]
LB	<i>line broadening</i> - Faktor für exponentielle Multiplikation
LC	<i>liquid chromatography</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
<i>m</i>	Multipllett
M	Stoffmengenkonzentration [mol/L]
Man	Mannose
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MIP	<i>macrophage inhibitory protein</i>
MLV	<i>multilamellar vesicles</i>
Mmt	4-Monomethoxytrityl-
MS	Massenspektrometrie
MVV	<i>multivesicular vesicles</i>
M_w	Molmasse [g/mol]
MWCO	Molmassenausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>)
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
NaOAc	Natriumacetat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht detektiert
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NNRTI	nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase-Inhibitor
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
NRTI	nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
ns	<i>number of scans</i>
NtRTI	Nukleotid-analoger Reverse Transkriptase-Inhibitor
OD _x	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
OtBu	<i>tert</i> -Butyloxy

P	Protein
PAL	5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeriansäure (Peptidamid-Linker)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PFG	<i>pulsed field gradient</i>
PG	<i>protecting group</i>
Pip	Piperidin
<i>pl</i>	<i>power level</i> eines NMR-Pulses
PND	<i>principal neutralizing domain</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
Py	Pyridin
RANTES	<i>regulated upon activation T-cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROESY	<i>rotating frame nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
R_f	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
R_t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RU	Einheit der SPR-Antwort (<i>response unit</i>)
<i>s</i>	Singulett
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
Sia	Sialinsäure
<i>sp</i>	<i>shaped pulse</i> eines NMR-Experiments
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid phase peptide synthesis</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butylthio
STD	Sättigungstransfer-Differenz
STDD	Sättigungstransfer-Doppeldifferenz
Strep	Streptomycin
SUV	<i>Small Unilamellar vesicles</i>
<i>t</i>	Triplett
T	Temperatur [K, °C]
T_c	Phasenübergangstemperatur [K, °C]
T_1, T_2	longitudinale bzw. transversale Relaxationszeit
T_{1p}	Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden Koordinatensystem
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
<i>v/v</i>	Volumen per Volumen
<i>x g</i>	<i>x</i> -faches der Gravitation

Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Seitenkettenschutz- gruppe(n)
Alanin	Ala	A	-
Arginin	Arg	R	Pbf
Asparagin	Asn	N	Trt
Asparaginsäure	Asp	D	<i>t</i> Bu
Cystein	Cys	C	Trt, <i>S</i> <i>t</i> Bu, Mmt
Glutaminsäure	Gln	Q	Trt
Glutamin	Glu	E	<i>t</i> Bu
Glycin	Gly	G	-
Histidin	His	H	Trt
Isoleucin	Ile	I	-
Leucin	Leu	L	-
Lysin	Lys	K	Boc
Methionin	Met	M	-
Phenylalanin	Phe	F	-
Prolin	Pro	P	-
Serin	Ser	S	<i>t</i> Bu
Threonin	Thr	T	<i>t</i> Bu
Tryptophan	Trp	W	Boc
Tyrosin	Tyr	Y	<i>t</i> Bu
Valin	Val	V	-

Anhang

Daten der STD-NMR-Messungen

Tabelle 30: STD-Amplifikationsfaktoren und K_D -Werte der STD-NMR-Messungen mit dem Peptid *v3ct15*.

Die mit (*) gekennzeichneten Werte liegen im Bereich unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Rezeptor und wurden nicht in die Berechnung des K_D -Wertes mit einbezogen.

Konz. Peptid <i>v3ct15</i> [μM]	STD-Amplifikationsfaktor			
	H δ , Tyr316	H ϵ , Tyr316	H γ , Gln327	H γ' , Ile325
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
3.6	-	0.028	0.038	0.016
7.0	-	-	0.069	0.032
14.9	0.161	0.462	0.318	-
37.0	0.354	2.022	0.386	0.259
74.1	1.948	1.185	0.470	0.248
148.0	2.193	3.836	1.020	0.849
222.0	3.521	4.756	-	0.871
296.0	1.511	4.433	2.989	0.844
519.0	5.073	9.254	3.430	2.502
667.0	13.030	18.660	4.030	5.746
K_D -Wert [μM]	492.1	194.3	813.7	200.8

Tabelle 31: STD-Amplifikationsfaktoren und K_D -Werte (> 500 μM) der STD-NMR-Messungen mit dem Peptid *v3ct21*.

Die mit (*) gekennzeichneten Werte liegen im Bereich unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Rezeptor und wurden nicht in die Berechnung des K_D -Wertes mit einbezogen.

Konz. Peptid <i>v3ct21</i> [μM]	STD-Amplifikationsfaktor				
	H4, H329	H α , D320/D324	H α , A317	H α , I322	H β , D324
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.4	0.113	0.056	0.225	0.216	-
4.8	0.225	0.669	0.171	-	0.613
12.1	0.281	-	0.807	0.152	1.353
24.1	3.255	0.670	0.123	-	6.407
48.0	-	-	5.350	2.567	3.378
71.9	5.384	-	4.413	-	4.481
96.2	6.985	3.706	6.232	3.356	-
120.0	-	-	-	-	8.447
168.0	-	-	-	-	-
232.0	11.988	9.775	13.508	-	13.368
304.0	22.820*	-	16.542	-	10.320

Konz. Peptid <i>v3ct21</i> [μM]	STD-Amplifikationsfaktor				
	H4, H329	H α , D320/D324	H α , A317	H α , I322	H β , D324
352.0	32.209*	11.045	-	10.751	21.911
400.0	52.824*	20.217*	18.492	34.068*	70.309*
K_D -Wert [μM]	551.7	583.7	574.7	881.8	877.3

Tabelle 32: STD-Amplifikationsfaktoren und K_D -Werte (< 500 μM) der STD-NMR-Messungen mit dem Peptid *v3ct21*.

Die mit (*) gekennzeichneten Werte liegen im Bereich unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Rezeptor und wurden nicht in die Berechnung des K_D -Wertes mit einbezogen.

Konz. Peptid <i>v3ct21</i> [μM]	STD-Amplifikationsfaktor							
	H δ , Y316	H ϵ , Y316	H α' , G312	H δ , R326	H β , Y316 / H β , F315	H β , I325	H β , A314 / H γ , T318	H γ' , I321/I322
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.4	-	-	-	0.054	0.035	0.089	-	0.112
4.8	1.095	4.067	0.125	0.258	-	0.240	0.025	0.139
12.1	-	4.878	0.393	0.409	1.152	0.571	0.291	0.768
24.1	-	9.602	0.210	0.637	1.614	1.407	-	-
48.0	5.915	-	0.830	1.292	--	2.134	-	1.508
71.9	-	-	1.307	1.501	8.766	3.165	3.941	-
96.2	7.885	-	1.228	1.780	10.220	4.390	-	-
120.0	-	-	-	2.419	-	-	-	-
168.0	-	-	-	-	-	-	-	-
232.0	-	26.658	4.949*	3.905	10.963	6.057	-	7.511
304.0	9.072	37.999	5.931*	9.621*	8.898	-	-	6.404
352.0	9.283	45.118	-	-	19.883*	-	4.555	-
400.0	51.052*	37.769	-	14.219*	55.520*	8.781	7.141	19.473*
K_D -Wert [μM]	33.4	191.8	173.1	470.4	55.5	235.6	82.3	245.8

Daten der SPR-Messungen

Tabelle 33: Auf 100 fmol Belegung normierte Messdaten der SPR-Untersuchungen des Glycopeptids *v3cong*.

angenommene Rezeptorkonz. [nM]	Messung 1 [RU]	Messung 2 [RU]	Messung 3 [RU]	Messung 4 [RU]	Mittelw. [RU]	Standardabw.
0.00	0.0				0.00	-
0.60	73.6	77.5			75.55	2.76
5.98	118.8	113.1	116.4		116.10	2.86
14.95	148.3	149.8	155.7	151.2	151.25	3.19
29.89	197.9	198.7			198.30	0.57
59.78	212.6	195.0			203.80	12.45

Tabelle 34: Auf 100 fmol Belegung normierte Messdaten der SPR-Untersuchungen des Peptids *v3ct15*.

angenommene Rezeptorkonz. [nM]	Messung 1 [RU]	Messung 2 [RU]	Messung 3 [RU]	Messung 4 [RU]	Mittelw. [RU]	Standardabw.
0.00	0.0				0	-
0.60	22.3	17.1	16.0		18.47	3.37
5.98	88.7	94.8	84.8		89.43	5.04
14.95	114.3	112.4	117.2		114.63	2.42
29.89	132.6	134.7	127.4	128.8	130.88	3.37
59.78	150.9	143.7	155.4	142.5	148.13	6.11

Tabelle 35: Auf 100 fmol Belegung normierte Messdaten der SPR-Untersuchungen des Peptids *v3ct21*.

angenommene Rezeptorkonz. [nM]	Messung 1 [RU]	Messung 2 [RU]	Messung 3 [RU]	Messung 4 [RU]	Messung 5 [RU]	Mittelw. [RU]	Standardabw.
0.00	0.0					0.00	-
0.60	9.3	7.1	7.0	7.1	9.1	7.92	1.17
5.98	23.4	22.3	21.1	22.5		22.33	0.95
14.95	28.0	28.1	27.5			27.87	0.32
29.89	34.3	30.3	34.7			33.10	2.43
59.78	36.7	37.2	36.3			36.73	0.45

Tabelle 36: Auf 100 fmol Belegung normierte Messdaten der SPR-Untersuchungen des Peptids *v3o*.

angenommene Rezeptorkonz. [nM]	Messung 1 [RU]	Messung 2 [RU]	Messung 3 [RU]	Mittelw. [RU]	Standardabw.
0.00	0.0	-	-	0.00	-
0.60	34.8	34.5	32.1	33.80	1.48
5.98	43.8	42.8	50.3	45.63	4.07
14.95	71.4	64.5	65.9	67.27	3.65
29.89	80.9	78.8	78.7	79.47	1.24
59.78	102.2	104.1	113.6	106.63	6.11

Tabelle 37: Auf 100 fmol Belegung normierte Messdaten der SPR-Untersuchungen des Glycopeptids *v3og*.

angenommene Rezeptorkonz. [nM]	Messung 1 [RU]	Messung 2 [RU]	Messung 3 [RU]	Mittelw. [RU]	Standardabw.
0.00	0.0	-	-	0.00	-
0.60	74.4	69.9	72.3	72.20	2.25
5.98	129.0	150.7	129.7	136.47	12.33
14.95	180.6	188.2	185.5	184.77	3.85
29.89	269.0	271.0	248.2	262.73	12.63
59.78	275.7	283.0	280.8	279.83	3.75

Wissenschaftliche Beiträge

Veröffentlichungen

M. Plum, Y. Michel, K. Wallach, T. Raiber, S. Blank, F. I. Bantleon, A. Diethers, K. Greunke, I. Braren, T. Hackl, B. Meyer, E. Spillner, *Close-up of the alpha-Gal epitope as defined by a monoclonal chimeric IgE and human serum using saturation transfer difference (STD) NMR*, J Bio Chem **2011**, Status: accepted. Der Abdruck der Veröffentlichung erfolgt im Dezember 2011.

Vorträge

Characterization of the interaction of V3 glycopeptides of the HIV-1 GP120 and the human coreceptor CCR5 by Saturation Transfer Double Difference NMR Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance; 3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences, Frankfurt/Main, September 5, **2009**.

Posterpräsentationen

M. Axmann, B. Claasen, J. Dojahn, M. Hollinger, B. Hünnefeld, T. Kühnemund, M. Lindner, W. Scherres, J. Tost, K. Wallach, D. Wilhelm; *Die Rolle der Glycosylierung bei der Erkennung von HIV Epitopen durch die Chemokin Rezeptoren CCR5 und CXCR4 und durch den CD4 Rezeptor*; Begutachtung des SFB 470 „Glycostrukturen und Biomoleküle“, Hamburg, Deutschland, Februar 3-5, **2006**.

K. Wallach, B. Huennefeld, B. Meyer; *Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR to characterize the binding of HIV glycopeptides to the human seven helix transmembrane coreceptor CCR5*; EUROMAR – Magnetic Resonance Conference, Tarragona, Spanien, Juli 1-5, **2007**.

K. Wallach, B. Huennefeld, B. Meyer; *Assignment of the binding epitope of V3-glycopeptides of the HIV-1 GP120 and the human coreceptor CCR5 by Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR and Surface Plasmon Resonance (SPR)*; 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finnland, August 31 - September 5, **2008**.

K. Wallach, B. Huennefeld, B. Meyer; *Characterization of the interaction of V3 glycopeptides of the HIV-1 GP120 and the human coreceptor CCR5 by Saturation Transfer Double Difference NMR Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance*; 3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences, Frankfurt/Main, September 2 - September 5, **2009**.

Poster

J. O. Thomann, K. B. Wallach, J. Schellenberg, C. Meier; *A possible synthetic strategy to diastereomerically pure cycloSal Prodrugs using chiral Dichlorothiophosphorus Amidates*; 2nd Summer School “Medicinal Chemistry”, University of Regensburg, Deutschland, **2004**.

J. O. Thomann, K. B. Wallach, E. H. Rios Morales, C. Meier; *A Possible Synthetic Strategy to Diastereomerically Pure cycloSal Prodrugs*; 18th International Conference on Antiviral Research, Barcelona, Spanien, **2005**.

Danksagung

Danke an folgende Personen, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben:

Alex Prenzel, der mir immer den Rücken frei hält, eine Ablenkung oder Aufmunterung gefunden hat und unendlich viel Geduld mit mir hatte und hat.

Maja Wallach, die mir alle Freiheiten gelassen hat und mich immer einfach meinen Weg hat gehen lassen.

Brigitte und Peter Prenzel, die die Zeit meiner Promotion mit großem Interesse verfolgt haben.

Christian Flügge, der mir immer wieder aufgezeigt hat, dass es ein Leben nach der Uni gibt, für die schöne gemeinsame Zeit im AK und dafür, dass daraus eine enge Freundschaft entstanden ist.

Nino Papukashvili für unsere stetig gewachsene Freundschaft, das Zuhören bei den vielen Unigeschichten und ihre aufmunternden Worte.

Jens-Oliver Thomann, der mich während des Schwerpunktpraktikums restlos überzeugt hat, dass die OC doch der Bereich der Chemie ist, der am meisten Spaß macht.

Den aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises, im Besonderen:

Alex Stark, Felix Niemeyer, Karsten Winkel, Katrin Schaefer, Martin Wienke und Moritz Waldmann für das zügige und vor allem kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ilona (die Labormaus) Grüneberg, die mir im Labor immer eine riesige Unterstützung und Hilfe war, für ihr immer offenes Ohr.

Moritz, der bedingungslos immer mit Rat und Tat zur Seite steht, für seine Hilfe in praktischen Dingen und die gute Stimmung, für die er immer sorgt.

Karsten für seine unglaubliche Hilfsbereitschaft und sein ansteckendes Lachen, das jeden Anflug von schlechter Laune vertreibt.

Alex, der immer mit anpackt, für seine Ausgeglichenheit und seine hervorragende Arbeit als Administrator des AK.

Felix, der nach seiner Zeit als Superpraktikant bei mir zum Glück den Weg in den AK gefunden hat, für seine tiefenentspannte Art, die spannenden Gespräche und den wohl besten Kaffee, den eine Arbeitsgruppe zur Verfügung haben kann.

Alex und der kalthof (Kathrin Althof) für die Einführung und besonders die konsequente Durchführung des „freaky fridays“.

Martin, für den vernünftigen Gesprächsanteil an den AK-Unterhaltungen ☺.

Brita Werner, die im Laufe der Zeit mehr und mehr in unseren AK integriert wurde, für die vielen hilfreichen Ratschläge und immer wieder motivierende Worte.

Katrin für die angenehme Zusammenarbeit und die abwechslungsreiche musikalische Unterma- lung in Labor 13a.

Meinen ISP- und OC-F-Praktikanten, die mich tatkräftig unterstützt haben.

Den ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises:

An allererster Stelle hier natürlich Dennis Wilhelm, der wie kein zweiter sowohl fachlich als auch persönlich den AKBM geprägt hat, dafür, dass er für den Zusammenhalt des AK gesorgt hat und für die zahlreichen lustigen oder auch mal ernsthaften Gespräche über den Sinn und Unsinn des Lebens.

Robin Job für seine unkonventionelle Art, Probleme zu lösen bzw. Geräte zu reparieren.

Kolja Klein, der sich durch nichts aus der Ruhe bringen lässt, für die vielen schönen Kaffeepausen und die gemeinsamen Mediziner- und HoWi-Praktika.

Mirko Lindner, bei dem ich bis heute nicht Ernst von Scherz unterscheiden kann, für die vielen Anregungen und Hilfen während der Diss und dafür, dass unser Kontakt noch weiterhin besteht.

Dirk Rehders, für die unterhaltsame Zeit während des gemeinsamen Studiums und die gute Labornachbarschaft in Labor 13a.

Britta Hünnefeld, die mir beim Einstieg zur Weiterführung des STDD-NMR-Themas geholfen hat.

Sowie: Atilla Çoksezen, Boris Kröplin, Jan-Christoph Westermann, Marco Axmann, Martin Hollinger, Svenja Stolzenburg, Thomas Hackl und Winni Scherres für die schöne Zeit während den ersten Jahren der Diss.

Des Weiteren den übrigen AK-Mitgliedern: Anna Struck, Beatrice Jürs, Henning Behnken, Meike Fellenberg, Miriam Kötzler, Nadja Haberz, Patrizia Leccese, Tobi Gloe und Wei-Nien Liao für die nette Zeit.

Allen Institutsmitgliedern der Organischen Chemie für die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft.

Der Massenabteilung für die Messung zahlreicher Proben.

Dem NMR-Service für die Messung noch zahlreicherer Proben, sowie Volker Sinnwell und Thomas Hackl für die unkomplizierte Unterstützung in allen Fragen rund um NMR.

Edzard Spillner, für die hervorragende langjährige Zusammenarbeit und seine Unterstützung besonders zum Ende dieser Arbeit.

Den BC-Arbeitskreisen Bredehorst und Spillner für die tolle Arbeitsatmosphäre, das geduldige Erläutern von biochemischen Sachverhalten speziell für Chemiker sowie die produktive Kooperation.

Meinen Kommilitoninnen Svenja Warnecke und Svea Fahrenholtz, dafür dass der Kontakt während der Diss weiter bestanden hat und hoffentlich auch noch lange weiter bestehen wird.

Curriculum Vitae

Name	Katharina Barbara Wallach
Geburtsdatum/-ort	18. September 1980, Darmstadt
Familienstand	ledig
Ausbildung	
04/2006 – 01/2012	<p>Doktorarbeit</p> <p>“Charakterisierung der Wechselwirkung von V3-Peptiden aus dem HIV-1 GP120 mit dem humanen Corezeptor CCR5 mittels SPR und STDD-NMR“ – in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Meyer am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.</p>
04/2005 – 01/2006	<p>Diplomarbeit</p> <p>“Synthese von Alanin-substituierten V3-Glycopeptiden aus dem HIV-Glycoprotein GP120 und Untersuchung ihrer CCR5-Corezeptorspezifität“ - in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Meyer am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.</p>
10/2000 – 04/2005	<p>Studium der Chemie, Universität Hamburg</p> <p>Schwerpunktfach: Organische Chemie, Wahlpflichtfach: Biochemie.</p>
04/2005	Diplomhauptprüfungen
10/2002	Diplomvorprüfungen
08/1991 – 06/2000	Altes Kurfürstliches Gymnasium, Bensheim – Abschluss: Abitur (Leistungsfächer Englisch und Mathematik).
08/1997 – 11/1997	Studienaufenthalt in Recife, Brasilien.

Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, den 31.01.2012

Katharina Wallach