

Synthese von *N*-Typ-Glycopeptiden
aus dem V3-Bereich des HIV-1
Glycoproteins GP120 und Untersuchung
ihrer CCR5 Korezeptorspezifität

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jutta Tost

aus Hamburg

Hamburg, 2004



Universität Hamburg

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

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Dezember 2003 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Wittko Francke, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die interessante Themenstellung sowie für die stets freundliche und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	Die Krankheit AIDS.....	11
1.2	Beschreibung des Erregers	12
1.3	Mechanismus der HIV-Infektion.....	14
1.4	Die HIV-1 Korezeptoren CCR5 und CXCR4.....	17
1.5	Das virale Glycoprotein gp120.....	19
1.6	Die V3-Loop des gp120.....	24
1.7	Therapieansätze zur HIV-Bekämpfung.....	25
2	Methoden	28
2.1	Synthese von Peptiden und <i>N</i> -Typ-Glycopeptiden	28
2.2	Analytik.....	35
2.2.1	Massenspektrometrische Methoden.....	35
2.2.2	NMR-spektroskopische Methoden.....	36
2.3	Surface Plasmon Resonance (SPR)	39
2.3.1	Theorie	39
2.3.2	SPR-Experimente mit Zellen	44
3	Problemstellung.....	45
4	Ergebnisse und Diskussion.....	46
4.1	Darstellung des <i>N</i> _γ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines 6	46
4.2	Synthese von Peptiden und Glycopeptiden	49
4.2.1	Übersicht über die synthetisierten Peptide und Glycopeptide.....	53
4.2.2	Versuche zur Synthese in Nachbarschaft zum Cystein glycosylierter zyklisierter V3-Verbindungen.....	54
4.2.3	Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen verkürzten V3-Peptides 9 ..	60

4.2.4	Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptides 10	63
4.2.5	Versuche zur Zyklisierung des Cys(S <i>t</i> Bu)-geschützten verkürzten V3-Peptides 9	66
4.2.6	Synthese des diglycosylierten offenkettigen V3-Peptides 11	69
4.2.7	Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten verkürzten V3-Peptides 12 ...	73
4.2.8	Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten V3-Peptides 13	76
4.2.9	Synthese des diglycosylierten zyklisierten V3-Peptides 14	79
4.3	NMR-spektroskopischer Vergleich und konformative Untersuchung der synthetisierten V3-Verbindungen.....	84
4.3.1	Vergleich des offenkettigen V3-Glycopeptides 11 und des offenkettigen V3-Peptides 10	84
4.3.2	Vergleich des zyklisierten V3-Glycopeptides 14 und des zyklisierten V3-Peptides 13	86
4.3.3	Vergleich des zyklisierten V3-Glycopeptides 14 und des offenkettigen V3-Glycopeptides 11	88
4.3.4	Vergleich der verkürzten V3-Peptide 9 und 12 mit den V3-Peptiden 10 und 13	90
4.4	SPR-Bindungsstudien.....	93
4.4.1	Biacore-Ergebnisse der V3-Verbindungen 15 bis 18	93
4.4.2	Biacore-Ergebnisse der V3-Verbindungen 9 , 10 , 11 , 13 und 14	99
5	Zusammenfassung	107
6	Summary	111
7	Experimenteller Teil	114
7.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften und verwendete Materialien für die Peptid- und Glycopeptidsynthese	114
7.2	Darstellung des <i>N</i> _γ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins 6	120
7.3	Synthese der Peptide und Glycopeptide	124

7.3.1	Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen verkürzten V3-Peptides 9	124
7.3.2	Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptides 10	126
7.3.3	Versuche zur Zyklisierung des Cys(S β Bu)-geschützten verkürzten V3-Peptides 9	128
7.3.4	Synthese des diglycosylierten offenkettigen V3-Peptides 11	128
7.3.5	Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten verkürzten V3-Peptids 12	132
7.3.6	Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten V3-Peptides 13	134
7.3.7	Synthese des diglycosylierten zyklisierten V3-Peptides 14	136
7.4	SPR-Experimente	139
7.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zu SPR-Messungen	139
7.4.2	SPR-Bindungsstudien	141
8	Sicherheitshinweise	142
9	Literatur	143

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-, zweidimensional
abs	absolutiert
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCA	α-Cyano-4-hydroxycimtsäure
Chi	Chitobiose
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CV	<i>column volume</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
DQF-COSY	<i>double quantum filtered correlation spectroscopy</i>
E.COSY	<i>exclusive correlation spectroscopy</i>
EA	Ethanolamin
EC	<i>extracellular</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid
ESI	<i>elektrospray ionisation</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
Fuc	Fucose
ges	gesättigt
GHOST	<i>green fluorescent human osteosarcoma</i>
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose
gp	Glycoprotein
GPC	<i>Gelpermeationschromatographie</i>
HAART	highly active antiretroviral therapy
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOS	<i>human osteosarcoma</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>

Abkürzungsverzeichnis

HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
M	Molar, mol/L
m/z	Masse/Ladung
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
Man	Mannose
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
NaOAc	Natriumacetat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
NRTI	nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren
<i>Ot</i> Bu	<i>tert</i> -Butyloxy
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PND	<i>principal neutralizing domain</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PS	<i>polystyrene support</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
RU	<i>resonance unit</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>

Abkürzungsverzeichnis

ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
S <i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butylthio
T	Temperatur
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TM	transmembran
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase increment</i>
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
WATERGATE	<i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WHO	<i>world health organization</i>

Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 Die Krankheit AIDS

Das humane Immunschwäche Virus (*human immunodeficiency virus*, HIV) wurde zu Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts erstmals als Erreger einer neuen Krankheit beschrieben, die heute als erworbene Immunschwäche AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) bekannt ist.¹ Im Allgemeinen führt die HIV-Infektion nach mehreren symptomfreien Jahren zum Ausbruch von AIDS, welches mit einer schrittweisen Zerstörung des Immunsystems einhergeht.² Die Erregerübertragung erfolgt sowohl durch Intim- als auch durch Blutkontakte.³ Vom vereinzelt Auftreten in der homosexuellen Szene vor 20 Jahren, hat heute die Krankheit das Ausmaß einer Pandemie erreicht. Zum Ende des Jahres 2003 waren weltweit bis zu 46 Millionen Menschen mit HIV infiziert.⁴ Abbildung 1 zeigt die globale Ausbreitung der Immunschwächekrankheit. Am stärksten betroffen sind das südliche Afrika und Süd-Ost-Asien. Dort liegt die Anzahl von HIV-Infizierten insgesamt bei bis zu 36 Millionen Menschen und macht damit mehr als 75 % aller weltweit Infizierten aus. Allein innerhalb des Jahres 2003 starben etwa 3 Millionen Menschen an den Folgen der HIV-Infektion, während sich schätzungsweise 5 Millionen Menschen neu infizierten.

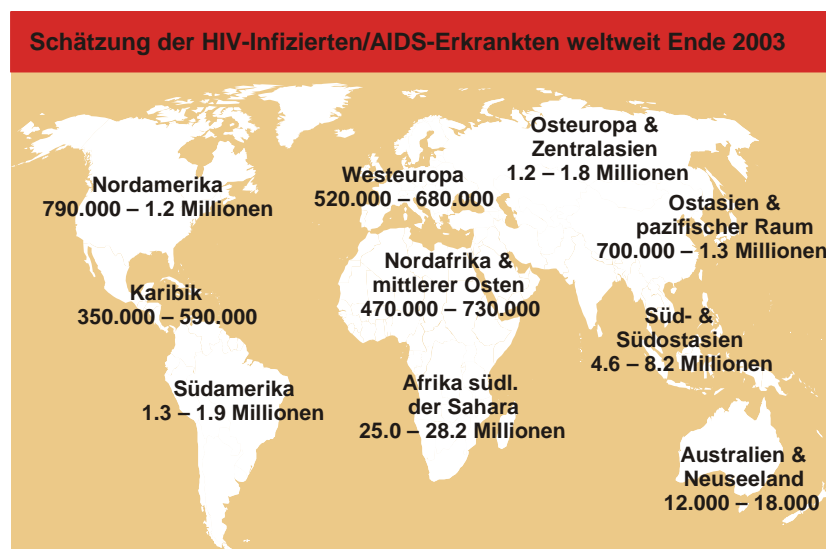


Abbildung 1: Globale Ausbreitung der mit HIV infizierten bzw. an AIDS erkrankten Menschen zum Ende des Jahres 2003.⁴

Binnen 20 Jahren hat sich die Infektion mit dem HI-Virus zu der bedeutendsten Infektionskrankung entwickelt und ist zu einem weltweiten Problem geworden, das nicht nur die Gesundheit der Menschheit bedroht, sondern auch soziale und volkswirtschaftliche Strukturen gefährdet.⁵ Ein intensives Vorgehen gegen AIDS ist dringend erforderlich, ist jedoch aufgrund der hohen therapeutischen Kosten von den überwiegend betroffenen

Entwicklungsländern nicht tragbar. Die bis heute zur Verfügung stehenden antiretroviralen Therapeutika sind Inhibitoren viraler Enzyme, die lediglich in der Lage sind den Fortschritt der Krankheit zu verlangsamen.⁶ So kommt der Epidemiebekämpfung durch präventive Maßnahmen eine zentrale Bedeutung zu.

1.2 Beschreibung des Erregers

Unabhängig voneinander entdeckten Luc Montagnier¹ und Robert Gallo⁷ 1983 den Erreger der bis dahin relativ unerforschten Krankheit AIDS. Das verantwortliche HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren, die durch das Vorhandensein eines speziellen viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (RT), gekennzeichnet ist. Mit Hilfe dieses Enzyms ist das Virus in der Lage, sein RNA-Genom in DNA umzuschreiben.⁸ Als „langsamer“ Virus mit einer ungewöhnlich langen Inkubationszeit von mehreren Jahren gehört das HIV zur Gattung der Lentiviren.⁹ Die Besonderheit ist seine Vielfalt und Variabilität. Die Gruppe der HI-Viren unterteilt sich in zwei Virusstämme, die als HIV-1 und HIV-2 bezeichnet werden, wobei sich das Genom des HIV-1 zu 40 % von dem des HIV-2 unterscheidet. Aufgrund genetischer Vergleiche wird vermutet, dass sich das HIV von den Immundefizienzviren der Affen (SIV, *simian immunodeficiency virus*) herleitet und Anfang des 20. Jahrhunderts in Zentralafrika von den Affen auf den Menschen übertragen wurde.¹⁰ HIV-1 ähnelt auf molekularer Ebene dem SIV der Schimpansen¹¹ (SIV_{CPZ}), das zuvor aus zwei weiteren SI-Viren entstanden war, das HIV-2 steht in naher Relation zum SIV der Sooty Mangaben (SIV_{SM}) aus Westafrika.¹² Der überwiegende Teil der HIV-Infektionen ist auf das HIV-1 zurückzuführen, das sich im Laufe der Zeit in zahlreiche Subtypen mit unterschiedlicher geographischer Prävalenz diversifizierte.¹³ Dieser Virusstamm ist weltweit verbreitet und wird aufgrund von Sequenzvariationen in drei Gruppen eingestuft: in die M (*main*)-, O (*outlier*)- und die N (*new*)-Gruppe. Die M-Gruppe findet man auf allen Kontinenten, während die O- und N-Gruppen vor allem in Westafrika auftreten.^{14,15} Die M-Gruppe ist für das Auftreten von AIDS als Pandemie verantwortlich, denn 99 % aller HIV-1-Infektionen sind Subtypen der M-Gruppe zuzuordnen.¹⁶ Aufgrund des Vergleiches ihrer Genome lässt sie sich in elf weitere Subtypen (A-K) unterteilen.¹⁷ Die Sequenzvariation innerhalb eines Subtyps selbst liegt im Allgemeinen zwischen 5 und 20 %, die Subtypen untereinander divergieren zwischen 25 und 35 %. Die Subtypen treten jeweils bevorzugt in bestimmten geographischen Regionen auf. In Afrika dominieren beispielsweise die Typen A und C¹⁸, während im nordeuropäischen und amerikanischen Raum der Subtyp B¹⁹ weit verbreitet ist. HIV-2 kann in die Subtypen A bis E unterteilt werden und findet sich in erster Linie bei Patienten in Westafrika. Es hat weniger pathogenes Potential und verbreitet sich langsamer.¹² HIV-2 kommt im Vergleich zu HIV-1 sehr selten vor.

Einleitung

Das HIV bildet etwa 100 nm große Viruspartikel (s. Abbildung 2).^{20,21} Im Inneren des Virus befindet sich ein Capsid, welches aus ungefähr 2000 Molekülen des Capsidproteins p24 gebildet wird. Das Capsid enthält das virale Genom, das in Form zweier Kopien einzelsträngiger positiv-Strang RNA (ssRNA) vorliegt, die durch direkte Assoziation mit dem Nucleocapsidprotein p7 stabilisiert werden. Wie bei allen Retroviren wird die Erbinformation durch die im Capsid integrierte viruseigene Reverse Transkriptase zu Beginn des Replikationszyklus in DNA transkribiert. Die Reverse Transkriptase arbeitet dabei etwa zehnmal ungenauer als vergleichbare Enzyme dieser Art und verursacht eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate des viralen Erbguts.²² Auf diese Weise werden permanent neue Varianten des Erregers exprimiert, wodurch die Entwicklung geeigneter Impfstoffe oder anti-HIV-Therapeutika erheblich erschwert wird.^{23,24} Im Capsid der Viruspartikel befinden sich zusätzlich die Enzyme Integrase und Protease. Das virale Protein p6 wird aufgrund seiner Funktion als Linkprotein bezeichnet und verbindet das Viruscapsid mit der Hüllmembran. An der Innenseite der Virusmembran bildet ein Grundgerüst aus etwa 2000 Molekülen des Matrixproteins p17 die innere Oberfläche der Virusmembran. Das Matrixprotein ist mit der Virusmembran assoziiert und für die Form und Stabilität des Viruspartikels verantwortlich.

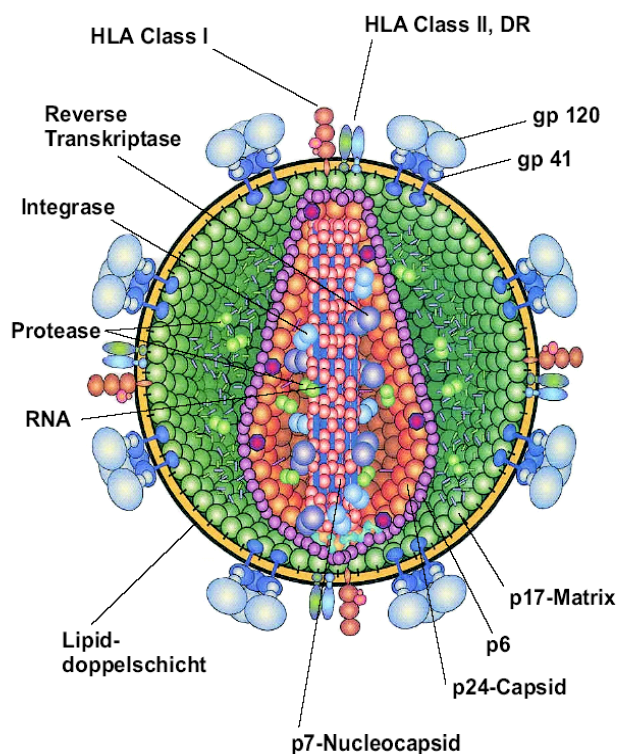


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Virions von HIV-1.²⁵

In die Membran des Virus sind Komplexe der Glycoproteine gp41 und gp120 eingelagert. Diese werden als gp160 exprimiert und durch proteolytische Spaltung mittels einer virus-eigenen Protease gebildet.^{21,26} Das transmembrane gp41 ist in der Virusmembran verankert. Das extrazelluläre gp120 ist nicht kovalent mit der Ektodomäne des gp41 assoziiert.^{27,28} Der

gp41/gp120-Komplex ist aus Trimeren von Heterodimeren aufgebaut, wobei pro Virion etwa 72 dieser Komplexe (*spikes*) auf der viralen Oberfläche vorhanden sind.^{29,30} Diese sind für die Bindung an die Zielzellen verantwortlich und werden für die Infektion humaner Wirtszellen benötigt.³¹ Darüber hinaus befinden sich mehrere zelluläre Proteine der Wirtszelle, sogenannte HLA's, in der Virusmembran.

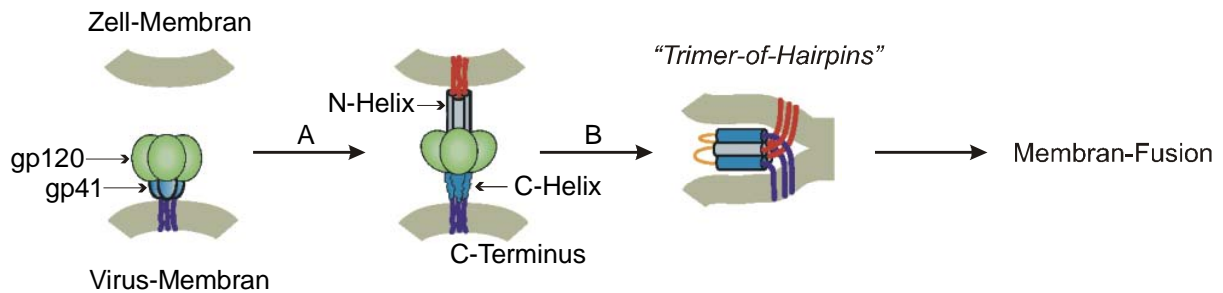
1.3 Mechanismus der HIV-Infektion

Das humanpathogene HI-Virus infiziert in erster Linie Lymphozytenzellen des menschlichen Immunsystems, vor allem T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.³² Um eine Zelle zu infizieren, ist die Interaktion des HIV-1 mit zwei Rezeptoren auf der Zelloberfläche erforderlich. Bei dem primären Rezeptor handelt es sich um das CD4-Protein.^{33,34} Dieses Membranprotein befindet sich auf T-Helferzellen (T_H-Zellen)³⁵ und hat als Oberflächenmarker der T-Helferzellen aktivierende Funktion und ist von essentieller Bedeutung für das Immunsystem (CD = *cluster of differentiation*). Der natürliche Bindungspartner des CD4 sind die MHC Klasse II-Proteine.³⁶ CD4 ist ein stabförmiges Glycoprotein von 55 kDa, welches zu der Immunglobulin-Superfamilie gehört und sich aus vier immunglobulinartigen Domänen (D1-D4) zusammensetzt. CD4 fungiert als Rezeptor für HIV-1, HIV-2 und auch für SIV.³⁷ Das HIV benötigt zur erfolgreichen Penetration zusätzlich zu CD4 einen Korezeptor auf der Membranoberfläche der Zelle. Als sekundärer Rezeptor dient dabei eine Gruppe von Chemokinrezeptoren (CCR5 oder CXCR4), die zur Familie der 7-Helixtransmembranproteine gehören (s. 1.4).^{38,39}

Ein entscheidender Schritt bei der HIV-Infektion ist die Anbindung des Virus an die humane Zelle (s. Abbildung 4). Dies wird über das virale Glycoprotein gp120 bewirkt.⁴⁰ Es sind dabei zwei Arten von Wechselwirkungen zwischen dem Virus und der Zielzelle erforderlich, damit es zur Internalisierung kommen kann. Es erfolgt zunächst die Bindung des extrazellulären gp120 mit dem CD4-Rezeptorprotein. Anhand von Röntgenstrukturdaten^{29,41,42} wurde festgestellt, dass das CD4-Bindungsepitop diskontinuierlich ist und auf sechs Peptidabschnitte des gp120 verteilt ist.⁴³ Es resultieren konformationelle Änderungen im gp120, die eine Exposition der V3-Bindungsepitope zur Folge hat, wodurch die Bindung an einen Chemokinrezeptor ermöglicht wird.⁴⁴⁻⁴⁹ Aufgrund dieser Interaktionen kommt es zu einer Destabilisierung des gp120/gp41-Komplexes. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des gp41, wodurch die aminoternale hydrophobe Fusionsdomäne des Transmembranproteins präsentiert wird. Dieses Fusionspeptid am N-Terminus des gp41 kann dann in die Membran der Zielzelle insertieren und es erfolgt die Fusion von Virus- und Zellmembran (s. Abbildung 3).^{50,51} Jedes der drei gp41 besitzt zwei helicale Bereiche (N-Helix und C-Helix), wobei drei N-Helices eine *Coiled-Coil*-Struktur bilden, um die sich die drei C-Helices antiparallel gruppieren und ein Bündel bilden. Diese als *Trimer-of-*

Einleitung

Hairpins bezeichnete Zwischenstufe führt so zur noch nicht vollständig aufgeklärten Membranverschmelzung.^{30,52}



- A: Bindung an CD4 und Corezeptor mit Konformationsänderung von gp41.
Das hydrophobe Fusionspeptid (rot) wird freigelegt und inseriert in die Zielmembran.
- B: Gp120 wird abgegeben und es bildet sich ein "Trimer-of-Hairpins".

Abbildung 3: Postulierter Mechanismus der Membranfusion.^{50,51}

Nach Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran gelangen die Virus-ssRNA-Kopien und die Virusproteine Reverse Transkriptase, Integrase und Protease in das Zytoplasma der Zelle (s. Abbildung 4). Dort wird das virale RNA-Genom mit Hilfe der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA transkribiert. Nach Transport in den Zellkern, wird die DNA-Kopie dort durch die mitgeführte HIV-Integrase in das Genom der Wirtszelle inseriert, um sich durch den Replikationsapparat der Zelle vermehren zu lassen.⁵³ In integriertem Zustand kann das Virus unerkannt im Wirt persistieren.

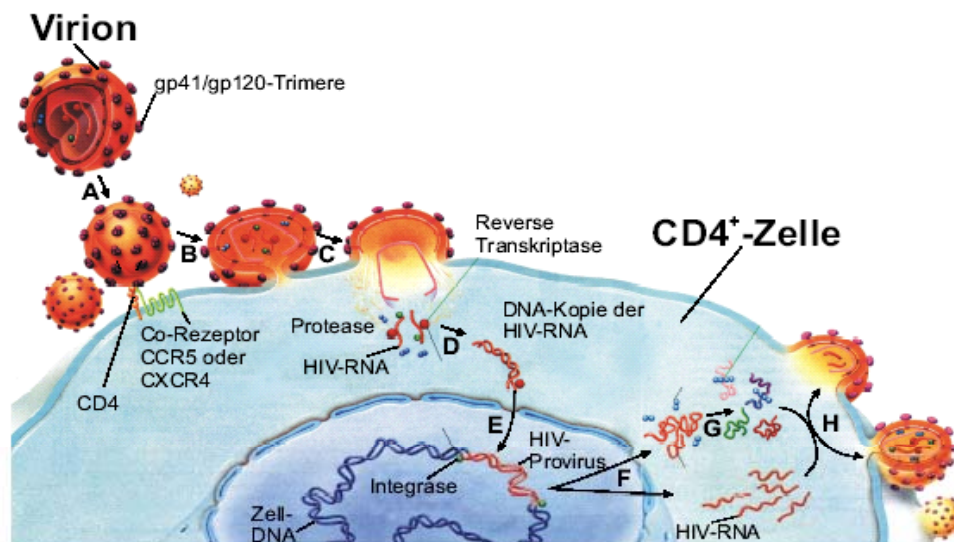


Abbildung 4: Lebenszyklus des HIV. A: Das Virion bindet mit dem gp120/gp41-Komplex an die Wirtszelle unter Beteiligung von CD4 und einem Chemokinrezeptor (CCR5 oder CXCR4). B: Membranfusion. C: Einbringen des Capsids in das Zytoplasma der Zielzelle. D: Reverse Transkription der ssRNA in DNA. E: Insertion der DNA in das Genom der Zelle durch Integrase. F: Expression des Provirus, es werden virale ssRNA und Virusproteine gebildet. G: Proteaseaktivität und Assembly. H: Knospung neuer Virionen.⁵³

Einleitung

Die Replikation und Expression der insertierten Virus-DNA, sowie posttranslationale Modifikationen, wie z.B. der Glycosylierung des gp120, erfolgt jeweils durch die entsprechende Maschinerie der Wirtszelle. Dabei sorgen virale Helferproteine für eine geregelte Produktion aller zur Erzeugung neuer Virionen benötigten Bestandteile. Nach Zusammenlagerung der Viruskomponenten (*Assembly*), schnüren sich diese aus der Zellmembran ihrer Wirtszelle ab und reifen zu neuen infektiösen Viruspartikeln. Die Virusmembran stammt also von der Wirtszelle und enthält daher diverse wirtseigene Strukturen (HLA's). Dies erschwert die Erkennung des Virus durch das Immunsystem des infizierten Menschen. HI-Virionen haben eine Halbwertszeit im Blut von weniger als 6 Stunden. Die infizierten CD4⁺-Lymphozyten haben eine Halbwertszeit von weniger als 2 Tagen, wobei täglich mindestens 10¹⁰ Virionen produziert werden.⁵⁴ Früher oder später führt die Virusproduktion zum Absterben der Wirtszelle, so dass diese ihre Aufgaben im Immunsystem nicht mehr wahrnehmen kann.

In den ersten Wochen einer HIV-Infektion kann es zum Auftreten grippeähnlicher unspezifischer Symptome kommen. Dabei steigt der Virus-Titer zunächst stark an, während die Anzahl an CD4⁺-T-Zellen (T_H-Zellen) im Blut entsprechend sinkt. Nach dieser akuten Phase bekommt das Immunsystem die Infektion zunächst unter Kontrolle, wobei sich der Titer der CD4⁺-T-Zellen nahezu normalisiert. In den infizierten Zellen kann das Virus jedoch jahrelang persistieren, ohne schwere Krankheitssymptome zu verursachen. Diesen Zeitraum der Erkrankung bezeichnet man als die asymptomatische Phase, die einen Zeitraum von 2 bis 15 Jahren in Anspruch nehmen kann. Während dieser Zeit sind direkt im Blut keine Viruspartikel nachweisbar, dabei besteht auch hier eine dynamische Interaktion zwischen Infektion, Produktion neuer Viren und deren Bekämpfung durch das Immunsystem. Im weiteren Verlauf der HIV-Infektion kommt es dann von einem normalen Wert von 600 bis 1200 Zellen pro µL Blut zu einer rapiden Abnahme der CD4⁺-T-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der Viruslast. Durch den kontinuierlichen Verlust der CD4⁺-T-Zellen wird das Immunsystem stark geschwächt, bis schließlich ein Schwellenwert von 200 T_H-Zellen pro µL Blut unterschritten wird. Die Folgen sind das Auftreten opportunistischer Infektionen, deren Erreger für den gesunden Menschen ungefährlich sind, aber für den immungeschwächten HIV-Infizierten ein großes gesundheitliches Problem darstellen. Diese Phase opportunistischer Infektionen ist kennzeichnend für das symptomatische Stadium der Erkrankung, welches das Krankheitsbild AIDS definiert und letztendlich zum Tode des HIV-Infizierten führt. Unbehandelt versterben innerhalb von 15 Jahren etwa zwei Drittel der Patienten an den Folgen der HIV-Infektion.⁵⁵

1.4 Die HIV-1 Korezeptoren CCR5 und CXCR4

Die vom HI-Virus genutzten Korezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR's) aus der Familie der 7-Helixtransmembranproteine.³⁹ Dabei handelt es sich um Chemokinrezeptoren, die mit sieben transmembranen α -Helices in der Membran verankert sind (7TM). Diese Familie besteht aus über 200 verschiedenen Membranproteinen, deren natürliche Funktion darin besteht, Leukozyten zu Entzündungsschauplätzen zu führen, indem sie Chemotaxis in Richtung der am Ort der Entzündung ausgeschütteten Chemokine bewirken (*chemoattractant cytokines*).^{56,57} Diese kleinen aus 60-75 Aminosäuren bestehenden Proteine gehören zur Familie der Cytokine. Die Nomenklatur der Chemokine leitet sich aus der Aminosäuresequenz ab (s. Abbildung 5A), in der zwei Cysteinreste entweder direkt nebeneinander (CC-Chemokine, auch β -Chemokine) oder durch eine beliebige Aminosäure voneinander separiert liegen (CXC-Chemokine, auch α -Chemokine).^{3,58}

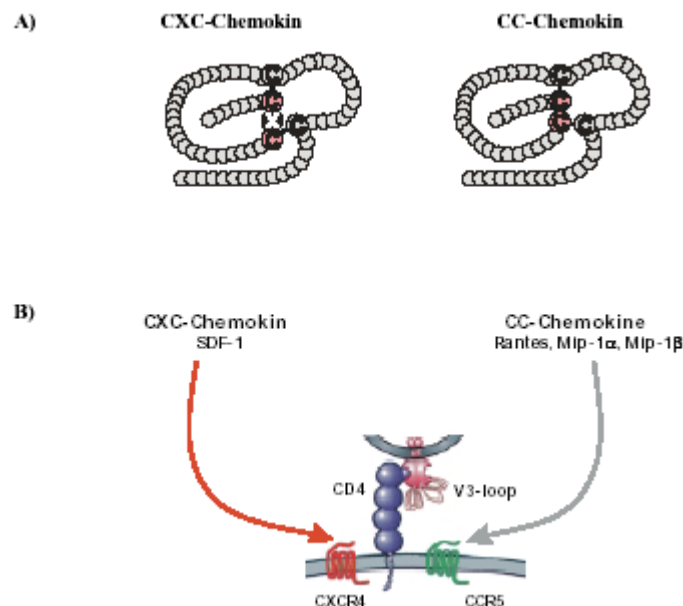


Abbildung 5: HIV-Korezeptoren und deren Liganden. A: Die Chemokine werden aufgrund der Aminosäuresequenz in CXC- oder CC-Chemokine unterteilt. B: Das CXC-Chemokin SDF-1 ist der natürliche Ligand von CXCR4. Die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β sind natürliche Liganden von CCR5. Die Chemokinrezeptoren werden analog hierzu als CXC- und CC-Rezeptoren bezeichnet. Die beiden Haupt-Korezeptoren für HIV-1 sind der CXC-Rezeptor CXCR4 und der CC-Rezeptor CCR5.

Die Chemokinrezeptoren werden analog zu den von ihnen gebundenen Chemokinen als CXC- und CC-Rezeptoren bezeichnet (s. Abbildung 5B). Der erste Chemokinrezeptor, der im Jahre 1996 als HIV-1 Korezeptor identifiziert wurde, ist CXCR4, der auf T-Lymphozyten lokalisiert ist.^{38,59} Der natürliche Ligand des CXCR4 ist das CXC-Chemokin SDF-1. Bald darauf wurde CCR5 als weiterer HIV-1 Korezeptor identifiziert, der auf Makrophagen exprimiert wird und dessen natürliche Liganden die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β sind.^{46,60,61}

Einleitung

Für die HIV-Infektion sind *in vivo* nur die Korezeptoren CXCR4 und CCR5 von Bedeutung, die von jedem bislang bekanntem HIV-1 Isolat genutzt werden können.⁵⁶ Darüber hinaus wurden weitere Vertreter dieser Proteinklasse identifiziert, die als zusätzliche HIV-Korezeptoren fungieren können.⁶²⁻⁶⁴ Die *in vivo* Funktion und Bedeutung dieser Chemokinrezeptoren ist bislang allerdings noch nicht bekannt.

Bereits früh nach Entdeckung des HIV-1 wurde beobachtet, dass aus dem Blut von Patienten isolierte HI-Viren *in vitro* unterschiedliche Replikationseigenschaften aufwiesen. So zeigten Viren, die von Makrophagen exprimiert wurden langsame Replikationskinetiken. Sie unterschieden sich von schnell wachsenden Viren, die nur in T-Zellkulturen replizieren konnten. Es wurde daher zunächst zwischen M-tropen und T-tropen Virusvarianten unterschieden.^{65,66} Später wurde eine Korrelation beobachtet zwischen dem Fortschritt der Erkrankung und der Eigenschaft von HIV verschiedene Korezeptoren für die Infektion von Zellen nutzen zu können. Zu Beginn der HIV-Infektion dominieren die M-tropen Virustypen, die CCR5 als Korezeptor verwenden und Makrophagen befallen.⁶⁷ Nach der asymptomatischen Phase findet jedoch ein Wechsel des viralen Phänotyps statt, und es treten vermehrt T-trope Viren auf, die CXCR4 als sekundären Rezeptor nutzen, so dass zunehmend T-Helferzellen angegriffen werden.^{68,69} Dies korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung und dem Ausbruch von AIDS. Der Tropismuswechsel ist eng mit der Glycosylierung des gp120 verbunden. Die T-tropen Virusstämme tragen weniger Kohlenhydratstrukturen als die M-tropen. Offensichtlich sind die M-tropen Stämme weniger infektiös, sind aber nicht so leicht durch das Immunsystem zu erkennen, da die Zucker offenbar die antigenen peptidischen Epitope abschirmen. Die schwächer glycosylierten T-tropen Stämme sind viel virulenter, werden jedoch zunächst besser vom Immunsystem neutralisiert und können sich vermutlich erst bei einem stark vorgeschädigten Immunsystem in fortgeschrittener Phase der Infektion durchsetzen.⁷⁰ Die Art des Chemokinrezeptors bestimmt also den Tropismus des Virus, wobei heute HI-Viren, die nur CCR5 nutzen können, als R5-trop und Viren, die ausschließlich CXCR4 verwenden können, als X4-trope Virusvarianten bezeichnet werden. Daneben existieren sogenannte Dual- oder R5X4-trope Virenstämme, die beide Korezeptoren nutzen können.⁶² Zusätzlich sind multitrope Viren bekannt, die noch weitere Chemokinrezeptoren verwenden können.

Die Relevanz des CCR5 als wichtigster Korezeptor für M-trope HIV-1 Stämme zeigte sich anhand von Untersuchungen an Menschen, die dem Virus mehrfach ausgesetzt waren, ohne jedoch infiziert zu werden.^{71,72} Es wurde in einem der CCR5-Allele eine 32-Basenpaare-Deletion festgestellt ($\Delta 32$ -Deletion), wodurch diese Menschen einen verkürzten Korezeptor exprimieren, der nicht auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Den im Anfangsstadium der Infektion vorherrschenden M-tropen Viren fehlt somit der notwendige Korezeptor, was erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat.

Die Abbildung 6 zeigt die schematische Darstellung des humanen CCR5, der aus sieben transmembranständigen Helices (TM1-7), drei extrazellulären Loops (EL1-3), drei intrazellulären Loops (IL1-3) sowie dem extrazellulären N-Terminus und dem cytosolischen C-Terminus aufgebaut ist.⁷³ Wie Substitutionsstudien ergeben haben, scheint der negativ geladene Sulfotyrosin-haltige N-terminale Bereich des CCR5 für die Interaktion mit dem HI-Virus von essentieller Bedeutung zu sein, da die Rezeptoraktivität durch Mutationen bzw. Substitutionen in dieser Region empfindlich gestört wurde.^{71,74} Aber auch verschiedene Aminosäuren der extrazellulären Domänen sind wahrscheinlich für die Bindung an das virale gp120 relevant, wobei insbesondere der zweiten extrazellulären Loop (EL2) große Bedeutung zugeschrieben wird. Dabei wird vermutet, dass einige dieser essentiellen Aminosäuren für die Ausbildung der bindungsaktiven Konformation des CCR5 verantwortlich sind, während andere das Bindungsepitop bilden. Die Unterdrückung der Sulfonierung der Tyrosinreste des N-terminalen Bereichs zeigte nachweislich eine Schwächung der gp120/CCR5-Interaktion, wobei die natürliche Funktion der Sulfonierung nicht geklärt ist.⁷⁵

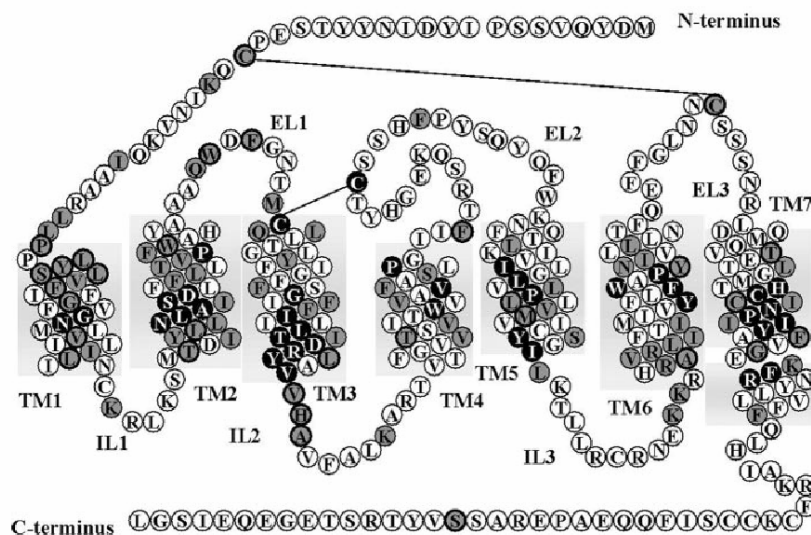


Abbildung 6: Schematische Darstellung der CCR5-Struktur. TM1-7 bezeichnen die transmembranen Domänen, EL1-3 die extrazellulären Domänen und IL1-3 die intrazellulären Domänen. Grau unterlegte Aminosäuren sind stark konserviert in der Gruppe der CC-Chemokinrezeptoren. Schwarz unterlegte Aminosäuren sind stark konserviert in der Familie der GPCR's im Allgemeinen.⁷³

1.5 Das virale Glycoprotein gp120

Das Glycoprotein gp120 ist an der äußeren Virushülle des HIV-1 durch nicht kovalente Bindungen an das membranständige gp41 koordiniert.²⁷ Dieses Heterodimer liegt als Trimer auf der Virusoberfläche vor. Die Glycoproteine gp120 und gp41 werden durch eine virus-eigene Protease aus dem Vorläuferprotein gp160 gebildet.^{21,26} Das gp120 ist ein hochglycosyliertes Protein mit einer molaren Masse von etwa 120 kDa und besitzt einen Glyco-

Einleitung

sylierungsanteil von ca. 50 %.^{76,77} In Abbildung 7 ist das HIV Oberflächenprotein gp120 schematisch dargestellt. Es besteht je nach HIV-Variante aus ca. 470-500 Aminosäuren und weist 24-26 potentielle *N*-Typ-Glycosylierungsstellen sowohl vom komplexen als auch vom hochmannosidischen Typ auf (s. Abbildung 8).⁷⁸ Aus der Aminosäuresequenz des peptidischen Teils resultiert eine Tertiärstruktur des gp120, die von neun Disulfidbrücken zwischen Cysteinen bestimmt wird. Es besteht aus fünf hypervariablen Loops (V1-V5), die über fünf relativ konservierte Sequenzbereiche (C1-C5) miteinander verbunden sind.⁷⁹ Besonders wichtig für die viralen Eigenschaften und die Virusneutralisation sind die hypervariablen Bereiche des gp120. Diese weisen neben einer replikationsbedingten Varianz in der Aminosäuresequenz auch Deletionen und Insertionen auf, was zu Differenzen von bis zu 25 % in der Sequenz der verschiedenen HIV-Stämme führt.

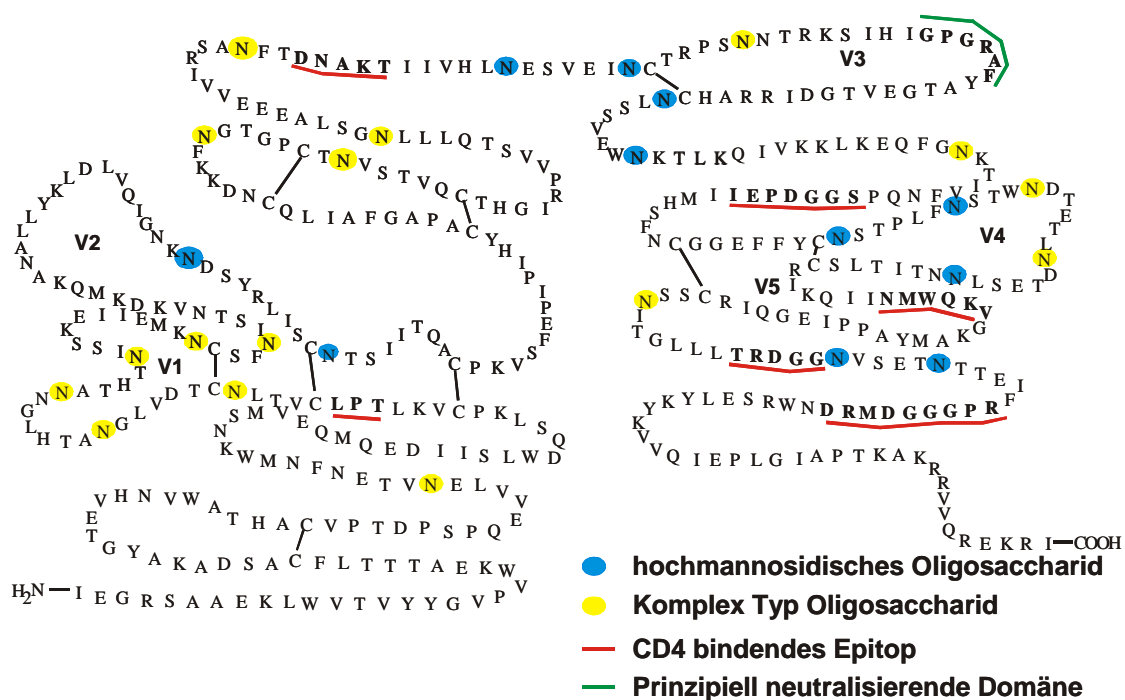


Abbildung 7: Schematische Darstellung des gp120 mit den potentiellen Glycosylierungsstellen, den hypervariablen Loops V1-V5, den CD4-Bindungsstellen sowie der prinzipiell neutralisierenden Domäne innerhalb der V3-Loop.

Aufgrund von Antikörperbindungsstudien wird davon ausgegangen, dass die variablen Bereiche des gp120 an der Oberfläche exponiert sind, während die konservierten Regionen einen zentralen Kern bilden.⁸⁰ Die exponierten Bereiche des gp120 werden dabei durch *N*-Glycane verdeckt, was die Zugänglichkeit der peptidischen Sequenzen durch Antikörper stark beeinträchtigt.⁴¹

Anhand von Röntgenstrukturdaten konnte die Kristallstruktur von gp120 teilweise aufgeklärt werden und ein detailliertes Verständnis über die Wechselwirkung von gp120 und CD4 erhalten werden.^{29,41,42} *Kwong et al.* gelang es 1998, einen ternären Komplex aus einem modifizierten gp120, dem D1-D2-Fragment des humanen CD4 und einem Antikörper-Fab-

Einleitung

Fragment zu kristallisieren. In der Röntgenstruktur waren N- und C-Terminus des gp120 um 52 bzw. 19 Aminosäuren verkürzt, die variablen Bereiche V1/V2 sowie V3 fehlten gänzlich und die *N*-Glycane waren enzymatisch mit Endo-H bis auf den ersten GlcNAc-Rest entfernt worden. In dieser, dem Kokristall zugeordneten Struktur bildet das modifizierte gp120 eine innere und eine äußere Domäne, die durch ein viersträngiges β -Faltblatt (*bridging sheet*) miteinander verbunden sind. Es wurde festgestellt, dass die für die Bindung an den CD4-Rezeptor verantwortlichen Aminosäuren ein diskontinuierliches Epitop bilden,^{29,41} das auf sechs Peptidabschnitte des gp120 verteilt ist.⁴³

Das Glycoprotein gp120 wird dem *N*-Typ der Glycoproteine zugeordnet, da die Kohlenhydratreste über den Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette *N*-glycosidisch gebunden vorliegen. Darüber hinaus findet im wesentlich häufiger auftretenden *O*-Typ die kovalente Verknüpfung des Zuckeranteiles über das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette statt. Es sind jedoch auch *O*-Typ-Bindungen zu den Hydroxylgruppen von Hydroxylysin und -prolin bekannt. Im seltener auftretenden *S*-Typ erfolgt die glycosidische Bindung am Schwefelatom einer Cysteinseitenkette.⁸¹

Die *N*-Typ-Glycoproteine weisen ein einheitliches Pentasaccharidgrundgerüst auf, das als *core*-Struktur bezeichnet wird.⁸² Diese ist aus zwei β -glycosidisch verknüpften *N*-Acetyl-D-glucosaminen (GlcNAc), einer β -glycosidisch verknüpften Mannose (Man) und zwei weiteren α -glycosidisch verbundenen Mannosen aufgebaut. Je nach Organismus und biologischer Funktion befinden sich an diesen Mannoseeinheiten zusätzliche Oligosaccharide, wobei das weitere Glycosylierungsmuster zwischen drei Haupttypen unterscheidet (s. Abbildung 8).

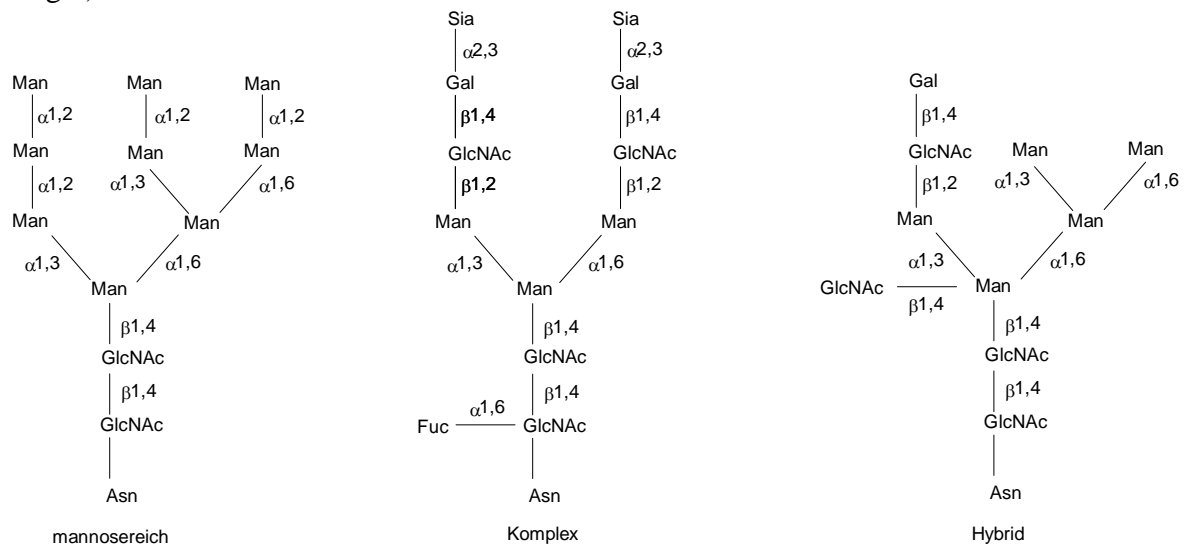


Abbildung 8: Repräsentative Strukturen für die drei Haupttypen der *N*-Typ-Glycoproteine.

Der hochmannosidische Typ zeichnet sich durch zwei bis drei Verzweigungen (Antennen) von weiteren α -glycosidisch gebundenen Mannosen aus. Der Komplex-Typ, welcher nur in höheren Organismen zu finden ist, besitzt zwei bis sechs Antennen aus Fucosyl-Lactosamin-

resten, die endständig Sialinsäuren tragen. Der Hybridtyp enthält Strukturmerkmale beider vorangegangener Typen.⁸² Im gp120 findet man dabei *N*-Glycosylierungen vom hochmannosidischen und vom komplexen Typ.

Die Glycosylierung der Proteine bei der Biosynthese erfolgt durch posttranslationale Modifikationen im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. Damit ein Asparagin glycosyliert werden kann, muss es Teil der Sequenz NXT/S sein, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt. Nicht nur durch die Art und Anzahl der Monosaccharideinheiten, sondern auch durch die unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten, tritt eine enorme Vielfalt von Glycanen auf einem Protein auf, weshalb es sich bei den Glycoproteinen um eine weit verbreitete Naturstoffklasse mit herausragender biologischer Bedeutung handelt.⁸³ Während die funktionelle Bedeutung der reinen Kohlenhydrate als Gerüst- und Speicher-substanzen sowie die der Proteine als Strukturbildner oder Träger spezifischer Funktionen (z.B. Enzyme) zumeist aufgeklärt sind, ist die spezielle Funktion der Glycoproteine weitgehend ungeklärt. Eine entscheidende Rolle liegt in der Einflussnahme der Kohlenhydratreste auf die 3D-Struktur des gesamten Glycoproteins. Die räumliche Struktur ist dabei maßgebend für die katalytische Aktivität von Enzymen. Glycoproteine haben einen großen Einfluss bei zellulären Erkennungsmechanismen an äußeren Zellmembranen, u.a. bei der Regulation des Zellwachstums und bei Infektionen. Daneben spielen sie auch bei der Wechselwirkung mit bioaktiven Molekülen bei der Steuerung von Regulationskaskaden und bei Prozessen der Signaltransduktion eine wichtige Rolle.^{84,85}

Die enorme Variabilität des gp120 in der Aminosäuresequenz, die die verschiedenen HIV-Varianten und Subtypen auszeichnet, wird durch die Komplexität der *N*-Glycosylierungen weiter gesteigert. Über die Funktion des Kohlenhydratanteils des gp120 wird seit langem kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten die Präsenz von Zuckerstrukturen bezüglich der Virusinfektivität als essentiell einschätzen, schreiben andere ihr überwiegend eine Beteiligung an der Proteinfaltung zu.⁸⁶ Wie erste Untersuchungen zeigten, führt die Expression der Proteinsequenz des gp120 in einem nicht glycosylierenden System zu einem Protein, das nicht in der Lage ist an CD4 zu binden.⁸⁷ Daraus wurde gefolgert, dass die Glycosylierungen für die Ausbildung und den Erhalt der Funktion des Proteins notwendig sind, und das Fehlen der Kohlenhydratstrukturen ein nicht funktionelles Protein zur Folge hat. Allerdings wurde berichtet, dass die meisten der *N*-Glycosylierungen für die virale Infektiosität entbehrlich sind, da vereinzelte Mutationen der potentiellen Glycosylierungsstellen des gp120 nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die virale Infektivität zeigten.^{88,89} Jedoch führte die Abspaltung der Neuraminsäuren des intakten gp120 zu einer reduzierten Antikörperbindung.⁹⁰ Darüber hinaus vermögen mannosespezifische Lektine, durch Wechselwirkung mit den Zuckern des hochmannosidischen Typs des gp120, die Infektion von CD4⁺-T-Zellen vollständig zu inhibieren.⁹¹ Enzymatisch deglycosyliertes gp120 hingegen bindet in gleichem Maße an CD4, wie die glycosylierte Form.⁹²

Während die Mehrzahl der Glycosylierungen entbehrlich bzw. von nur geringer Bedeutung für die Infektiösität des Virus sein soll, konnte der Einfluss einzelner *N*-Glycosylierungen des gp120 auf die Replikationsfähigkeit des Virus gezeigt werden. Die Eliminierung von *N*-Glycanen aus dem V1/V2- und V3-Bereich des gp120 CXCR4-troper HIV-1 Stämme führte zu einer verminderten Replikationsfähigkeit dieser Viren.⁹³ Das Fehlen dreier Glycosylierungsstellen innerhalb der CD4-bindenden Region hat eine Veränderung der Konformation des gp120 und eine verminderte Bindungsstärke zur Folge.⁹⁴ Das selektive Fehlen der V3-Glycosylierung erhöht die Neutralisation durch Antikörper um das 100fache.⁹⁵ Dies legt den Schluss nahe, dass der Kohlenhydratanteil in CD4- oder korezeptorbindenden Regionen essentiell für eine Bindung ist und die Glycosylierung der V3-Loop einen wesentlichen Einfluss auf den *Escape* des Virus vom Immunsystem hat. Aber auch für das Oberflächenprotein des SIV, welches neben CCR5 nicht CXCR4 als Korezeptor nutzt,⁷² konnte gezeigt werden, dass die Zuckerstrukturen eine wichtige Rolle für die Funktion der Immundefizienzviren haben. Die Entfernung der *N*-Glycosylierung aus der V3-Region führte zunächst zu einer drastischen Abnahme der Virämie im Affen.⁹⁶ Jedoch bildeten diese infizierten Tiere nach einiger Zeit eine Virusvariante, welche im Bereich des eliminierten *N*-Glycans wieder eine *N*-Glycosylierung besaßen. Ebenso zeigten neuere Untersuchungen, dass die selektive Entfernung der Glycosylierung innerhalb der V3-Loop des humanen gp120 für eine veränderte Infektiösität des Virus sorgt und auch die Nutzung der Korezeptoren beeinflusst.^{97,98} Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Glycosylierung in der V1/V2- sowie der V3-Loop den Korezeptortropismus beeinflusst. Durch Mutation von Asparagin 301 der V3-Loop zu Glutamin war keinerlei Affinität mehr für den CCR5-Korezeptor vorhanden und es wurde ein Tropismuswechsel beobachtet: nur noch der CXCR4-Korezeptor wurde benutzt.⁹⁹

Es wurde kürzlich postuliert,¹⁰⁰ dass das Virus die Glycosylierungen als ein dynamisches Kohlenhydrat-Schutzschild (*glycan shield*) nutzt, um antigene peptidische Epitope zu maskieren, um sich vor neutralisierenden Antikörpern zu schützen und auf diese Weise der humoralen Immunantwort zu entkommen.⁹⁶ Der Einfluss der reduzierten Glycosylierung des gp120 auf die virale Infektiösität resultiert dabei scheinbar aus einer Veränderung der Konformation, was eine Entmaskierung und somit eine günstigere Präsentation der konservierten Bereiche gegenüber dem Immunsystem zur Folge hat. Um eindeutige Aussagen über den Einfluss des Kohlenhydratanteiles im Protein auf dessen biologische Funktionalität machen zu können, sind weitere Informationen insbesondere im Bereich der Strukturaufklärung und der Bindungsstudien essentiell für ein detaillierteres Verständnis der HIV-Infektion. Hierzu sind Synthese und funktionale Untersuchungen von Peptiden und Glycopeptiden unerlässlich und leisten einen wichtigen Beitrag für zukünftige therapeutische und prophylaktische Strategien.

1.6 Die V3-Loop des gp120

Die V3-Loop des gp120 (s. Abbildung 7), der ein entscheidender Einfluss auf die Eigenschaften des Virus zugeschrieben wird, besteht überwiegend aus 33 Aminosäuren zwischen zwei Cysteinresten, die eine Disulfidbrücke bilden. Diese ist von großer Bedeutung für den Erhalt der Struktur des gp120 und der Infektiösität des Virus.¹⁰¹ Innerhalb der V3 befindet sich eine *N*-Glycosylierung vom komplexen Typ. Die flankierenden Glycosylierungen sind vom hochmannosidischen Typ. Darüber hinaus existieren V3-Sequenzen mit Deletionsstellen, aber auch solche mit Insertionen, die jedoch nur einen geringen Teil der Gesamtpopulation ausmachen.¹⁰² Aufgrund der hohen Fehlerquote der Reversen Transkriptase und der dadurch bedingten hohen Mutationsrate des HIV ist die Sequenz der V3-Loop hypervariabel.

Ausgenommen davon ist eine zentral gelegene kurze hochkonservierte Sequenz GPGRAF (HIV-1, Subtyp B), die je nach HIV-Subtyp nur geringfügig variiert.¹⁰³ Diese Region enthält einen signifikanten β -turn, welcher entscheidend zur Tertiärstruktur des gp120 beiträgt. Das GPGRAF-Motiv wird als prinzipiell neutralisierende Domäne (PND)¹⁰⁴ bezeichnet, da gegen diesen Sequenzbereich Antikörper gebildet werden, die entsprechende HIV-Stämme zu neutralisieren vermögen. Diese sind allerdings nicht in der Lage die Infektion langfristig zu inhibieren. Dennoch wird diesem Epitop eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit humanen Zellen zugeordnet, da es maßgeblich an der Korezeptorbindung beteiligt ist.⁹⁰ Wie NMR-Studien zeigten, erkennen anti-(PND)-Antikörper über das PND-Motiv hinaus weitere Sequenzen der V3-Region.¹⁰⁵ Ebenso blockieren neutralisierende Antikörper gegen die V3-Loop die Interaktion von gp120/CD4-Komplexen mit CCR5.⁴⁸

Innerhalb der V3-Loop ist ein zweiter hochkonservierter Bereich lokalisiert. Dieser befindet sich in der Nähe des N-Terminus und beinhaltet eine *N*-Glycosylierung des komplexen Typs (NNT), welche nahezu den gleichen Raum beansprucht, wie die Loop selber. Die Bedeutung dieser Region ist noch weitgehend unklar, jedoch zeigten Untersuchungen, dass die dortige Glycosylierung die Infektiösität des Virus und den Korezeptortropismus beeinflusst.⁹⁹ Auf SPR basierende Bindungsstudien mit synthetischen V3-Peptiden und Glycopeptiden zeigten eine erhöhte CCR5-Affinität der glycosylierten Verbindungen gegenüber den Peptiden gleicher Sequenz.^{106,107}

Die Struktur der V3-Loop konnte auf Basis der von *Kwong et al.* modellierten Röntgenstruktur nicht aufgeklärt werden, da dieser Bereich des gp120 im dortigen Modell fehlte.^{29,41} Aus diesen Arbeiten ergab sich jedoch, dass die Ladung im Bereich der V3-Loop (Gesamtladung +2 bis +10) einen nennenswerten Einfluss auf die Interaktion mit den Korezeptoren haben könnte.⁴² Es wird vermutet, dass das hohe elektrostatische Potential die direkte Interaktion mit humanen Zellmembranen verstärkt, denn Polyanionen konkurrieren effektiv mit Antikörpern um die Bindung an die V3-Region.¹⁰⁸

Die V3-Region ist von entscheidender Bedeutung für den HIV-Entry über die Korezeptoren CCR5 und CXCR4. HIV-Varianten, in deren gp120 die V3-Loop deletiert wurde, waren nicht replikationsfähig.¹⁰⁹ Die V3-Sequenz bestimmt, welcher Korezeptor genutzt werden kann.^{110,111} Wird die V3-Loop eines R5-tropen Virus gegen die eines X4-tropen ausgetauscht, so besitzt das resultierende Virus die X4-trope Eigenschaft des Virus, aus dem die V3-Loop stammt. Es lassen sich auch anstelle der V3-Loop die Sequenzen der Chemokinliganden SDF-1 und MIP-1 α insertieren, was zur Infektion entsprechender CXCR4- bzw. CCR5-exprimierender Zellen führt.¹¹² Die Interaktion zwischen HIV und Korezeptor wird erheblich durch einzelne Aminosäuren aus der V3-Region beeinflusst, was einen starken Effekt auf die Infektiosität und die Korezeptornutzung des Virus hat.¹¹³ Die Mutation des Arginins-298, das direkt neben der innerhalb der Loop liegenden Glycosylierungsstelle zu finden ist, führt zu einer drastischen Reduzierung der viralen Infektiosität.¹¹⁴

Die direkte Interaktion der V3-Region mit den Korezeptoren konnte durch Bindungsstudien von V3-Peptiden an CCR5^{106,107} bzw. CXCR4¹¹⁵ gezeigt werden. Untersuchungen mittels einer synthetischen V3-Bibliothek mit Permutationen an vier stark variablen Positionen (H308, R313, A317, D320) ließen dabei den Schluss zu, dass CCR5 an diesen Stellen der V3-Region keine ausgeprägte Sequenzspezifität besitzt.¹⁰⁷ Daneben konnte gezeigt werden, dass anti-CXCR4-Antikörper durch zyklische V3-Peptide in ihrer Interaktion mit dem Korezeptor inhibiert werden können. Diese Peptide enthielten über die V3-Loop hinaus weitere Segmente der Aminosäuresequenz.¹¹⁵ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kleine Moleküle nicht zur Inhibition der Korezeptoren ausreichen, da dann vermutlich das gp120 auch mit einem reduzierten Bindungsepitop des Korezeptors auskommt und die Infektion immer noch stattfinden kann.¹¹⁶

Wie anhand der Arbeiten der letzten Jahre deutlich wurde, beeinflusst die V3-Sequenz die Korezeptornutzung und stellt ein wichtiges immunogenes Epitop des gp120 dar, welches in Patienten eine starke Immunantwort induziert.

1.7 Therapieansätze zur HIV-Bekämpfung

Die hohe mutationsbedingte Variabilität der Aminosäuresequenz und die Glycane des gp120 verhindern eine erfolgreiche Bekämpfung durch das humane Immunsystem und gewährleisten eine langfristige Resistenz des Virus gegen neutralisierende Antikörper. Aufgrund der weltweiten Verbreitung des HIV ist die Entwicklung von Anti-HIV-Wirkstoffen Ziel zahlreicher Forschungsprojekte. Um der Infektion entgegen zu wirken, dienen verschiedene Stadien des HIV-Lebenszyklus als Angriffspunkt.

Die derzeit übliche Behandlungsform von HIV-Infektionen ist die hoch aktive antiretrovirale HAART-Therapie (*highly active antiretroviral therapy*).¹¹⁷ Bei den dort eingesetzten Medikamenten handelt es sich um Inhibitoren der viralen Enzyme Reverse Transkriptase und

Protease, die sich gegen die Replikation des Virus richten. Diese werden in Form einer Kombinationstherapie verabreicht, um durch gleichzeitigen Einsatz unterschiedlicher Virostatika einer Resistenzentwicklung des HIV entgegen zu wirken. Es stehen dabei drei Gruppen von Medikamenten zur Verfügung: Die Nukleosid- bzw. Nukleotid-analogen-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), die Nicht-Nukleosid- bzw. Nicht-Nukleotid-analogen-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) sowie die Protease Inhibitoren (PI).¹¹⁸ Eine vollständige Heilung nach einer HIV-Infektion kann auf diese Weise nicht erreicht werden, da diese Inhibitoren nur gegen aktiv replizierende Viren wirken. Jedoch kann sowohl die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung HIV-infizierter Menschen deutlich verbessert werden. Allerdings bedeutet dies für den Patienten eine lebenslange medikamentöse Behandlung mit teilweise erheblichen Nebenwirkungen, weshalb die Weiterentwicklung von HAART-Medikamenten von großer Bedeutung ist.

Auch an Inhibitoren des viralen Enzyms Integrase und des *Assembly* wird intensiv geforscht.^{118,119} Es konnte mit 1,3-Diketensäuren eine Verbindungsklasse identifiziert werden, die selektiv den *strand transfer* Schritt der Integraseaktivität blockieren. Diese bringen allerdings unerwünschte pharmakologische Eigenschaften mit sich und stehen derzeit noch nicht für die klinische Erprobung zur Verfügung.

Die Wirkstoffe der Klasse der Fusions- bzw. *Entry*-Inhibitoren wirken gegen den Eintritt von HIV in die Wirtszelle und verhindern damit die Infektion von Zellen. Dabei bieten sich grundsätzlich drei Ansatzpunkte an: Die Bindung an CD4, die CCR5- bzw. CXCR4-Korezeptorbindung und die Fusion der Membranen.¹²⁰ Den finalen Schritt des HIV-*Entry*, die Fusion von Virus- und Zellmembran, zu blockieren, konnte mit peptidischen Konstrukten erzielt werden, die sich vom gp41 ableiten. Diese Peptide substituieren die C- oder N-terminale Region des gp41 und verhindern dadurch konformationelle Änderungen, die für die Fusion notwendig sind.^{23,119} Mit Enfuvirtide/T20 (Handelsname *Fuzeon*) ist im Jahr 2002 der erste Vertreter der Klasse der Fusions-Inhibitoren zugelassen worden, der mit hoher antiviraler Aktivität nach diesem Prinzip wirkt.¹²¹ Dieser Wirkstoff muss allerdings zweimal täglich subkutan gespritzt werden, ist jedoch gut verträglich. Dabei handelt es sich um ein 36er-Peptid, welches dem C-terminalen Bereich des gp41 entspricht. Ein verwandtes Peptid mit einer *in vitro* höheren intrinsischen Potenz ist T1249, welches sich in klinischer Erprobung befindet. Ein weiteres 38er-Peptidderivat dieser Art (T21) entspricht der N-terminalen Region des gp41 und verhindert die Infektion in Zellkulturen, jedoch liegt die Inhibition nur im mikromolaren Bereich.¹²²

Eine weitere Alternative bieten die *Entry*-Inhibitoren, die das Andocken des HIV an die Zielzelle unterbinden.¹²³ Die gp120/CD4-Interaktion ist dabei attraktives Ziel für die Wirkstoffentwicklung. Da die Blockierung des CD4-Rezeptors vermutlich dessen bedeutende Funktion im menschlichen Organismus beeinträchtigt, konzentrieren sich zahlreiche Forschungsarbeiten auf die Blockierung des gp120. Grundsätzlich weist die Inhibierung eines humanen

Proteins ein erheblich größeres Nebenwirkungsrisiko auf als der relativ selektive Angriff auf Bestandteile eines Pathogens. Allerdings birgt dies Schwierigkeiten aufgrund der mutationsbedingt hohen Variabilität des HIV. Der Versuch, die lösliche Form des CD4-Rezeptors (sCD4) als gp120-Inhibitor einzusetzen, ist in klinischen Studien aufgrund nicht nennenswerter antiviraler Wirkung gescheitert.¹²⁴ Eine Weiterentwicklung in Form eines heterotetrameren CD4-IG2-Konstrukts (PRO542) ist wesentlich wirksamer, welches sich in Phase II Studien befindet.¹²⁵ Es existieren bereits Inhibitoren der gp120/CD4-Interaktion in Form von CD4-bindenden Antikörpern. Die monoklonalen Antikörper Leu3A oder OKT4A zeigen sich *in vitro* als sehr wirksam, führen allerdings zu einem Rückgang der CD4⁺-Zellen. Dieser Nachteil ist bei dem CD4-Antikörper 5A8 nicht gegeben. Ob dieser jedoch durch die CD4-Bindung andere immunsuppressive Eigenschaften hat, ist bisher nicht bekannt.¹¹⁹

Auch die sekundäre Wechselwirkung von gp120 mit Chemokinrezeptoren der Wirtszelle ist ein Ansatzpunkt für die Wirkstoffentwicklung. Die natürlichen Liganden der Korezeptoren CXCR4 und CCR5, wie SDF-1 sowie RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β , zeigen antivirale Aktivität, sind allerdings aufgrund erheblicher Nebenwirkungen therapeutisch nicht einsetzbar.¹²⁶ Eine antagonistische Blockierung von CXCR4 scheint problematisch zu sein, da eine Deletion des CXCR4-Gens bei Mäusen zu tödlichen Entwicklungsstörungen des Fötus führt.¹²⁷ Mittlerweile sind jedoch verschiedene nicht toxische niedermolekulare Inhibitoren bekannt. Bei den CXCR4-Inhibitoren T22, T134, T140, AMD3100, AMD070, ALX40-4C und ihren Derivaten handelt es sich um hochgradig kationische Substanzen, die sich zum Teil bereits in klinischen Studien befinden.¹²⁸⁻¹³⁰ Die Blockierung der Funktion des CCR5-Rezeptors scheint weniger bedenklich zu sein, da Menschen mit $\Delta 32$ -Deletion, die von Natur aus keinen funktionalen CCR5-Rezeptor besitzen, keine gesundheitlichen Einschränkungen erfahren.⁷¹ Zu den niedermolekularen, nicht-antagonistischen CCR5-Inhibitoren gehören das in klinischer Erprobung befindliche Sch-C und TAK-779, sowie dessen Weiterentwicklungen AD101, TAK-220 und AK-602.^{118,119} Jedoch könnte die alleinige Blockierung eines Korezeptors den R5-X4-Wechsel beschleunigen, weshalb eine Kombination von Korezeptor-Inhibitoren sinnvoll erscheint. Hoch selektive Antikörper gegen die Korezeptoren könnten eine beachtliche Potenz und eine breite Wirkung als Inhibitoren besitzen, ohne jedoch Antagonisten zu sein.

Die beste Alternative, um die HIV-Infektion zu bekämpfen, liegt neben einer verstärkten Aufklärung und der Vermeidung einer Ansteckung in einer Impfung gegen das Virus. Auf diese Weise könnte eine Infektion grundsätzlich verhindert werden, jedoch gibt es bis heute keinen wirksamen Impfstoff. Die bislang verfolgten Strategien mit genetisch veränderten, nicht pathogenen Viren, sowie der Verwendung von rekombinant hergestelltem gp120 zeigten nur geringen Erfolg.^{131,132} Ein weiterer Ansatz untersucht den Einsatz von plasmidbasierten DNA-Vakzinen, die eine virusspezifische Immunantwort bei Affen zeigten und einen Impfschutz möglich erscheinen lassen.^{23,132,133}

2 Methoden

2.1 Synthese von Peptiden und N-Typ-Glycopeptiden

Proteine sind Makromoleküle, bestehend aus Aminosäuren, die über eine Amidbindung entsprechend ihrer Primärstruktur verknüpft sind. Neben enzymatischen Methoden unter Verwendung von spezifischen Peptidasen sind insbesondere die für höhermolekulare Peptide angewandten gentechnologischen Verfahren in Expressionssystemen von Bedeutung. Ferner hat vor allem die im Folgenden erläuterte rein chemische Synthese an einer festen Phase einen hohen Stellenwert bei der Herstellung von Peptiden und Glycopeptiden. Während die Festphasensynthese insbesondere im Labormaßstab ihre Anwendung findet, trifft man die chemische Synthese in Lösung eher im industriellen Maßstab an.

Ziel einer Peptidsynthese auf rein chemischem Wege ist die kontrollierte Verknüpfung verschiedener Aminosäuren entsprechend der angestrebten Peptidsequenz. Die im Grunde unkomplizierte Reaktion einer Aminofunktion mit einer aktivierten Carboxylgruppe erfährt bei der Peptidsynthese verschiedene Schwierigkeiten. Problematisch ist zum einen, dass Aminosäuren zumindest bifunktionelle Verbindungen darstellen. Um unkontrollierte Oligomerisierungen zu verhindern, müssen die Aminofunktionen der eingesetzten Aminosäuren in geschützter Form vorliegen. Außerdem muss die Carboxyfunktion der zu verknüpfenden Aminosäure für die Bildung der Peptidbindung aktiviert werden, um eine Kupplung unter milden Bedingungen zu gewährleisten. Um Nebenreaktionen von funktionellen Gruppen der Seitenkette zu unterbinden, sind diese ebenfalls durch Einführung orthogonaler Schutzgruppen zu blockieren. Schließlich ist es von großer Bedeutung, die Reaktionsbedingungen derart zu wählen, dass eine Racemisierung der Aminosäuren vermieden wird.

Da es sich bei der Peptidsynthese um eine sich wiederholende Ausführung verschiedener Entschützungs-, Aktivierungs- und Kupplungsreaktionen handelt, liegt eine Automatisierung der Synthese nahe. Die rein chemische Synthese von Peptiden¹³⁴ wurde daher durch die Entwicklung der Festphasenmethode durch R. B. Merrifield ganz entscheidend geprägt, der aufgrund seiner Arbeit auf diesem Gebiet 1984 mit dem Nobelpreis bedacht wurde.

Bei dieser Methode erfolgt der Aufbau des Peptids an einer festen Phase entgegen der biologischen Syntheserichtung vom C- zum N-Terminus. Das Prinzip der Peptidfestphasensynthese ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt, wobei die einzelnen Schritte jeweils durch Waschschriffe unterbrochen werden. Die Festphase besteht aus einem Polyethylenglycol-Polystyrol-Harz und trägt an ihrer Oberfläche sogenannte *Linker*, an der die Peptidkette wächst. Je nach Problemstellung gibt es unterschiedliche *Linker*, die zumeist entweder Fmoc-geschützte Aminogruppen oder Hydroxybenzylfunktionen besitzen.

Methoden

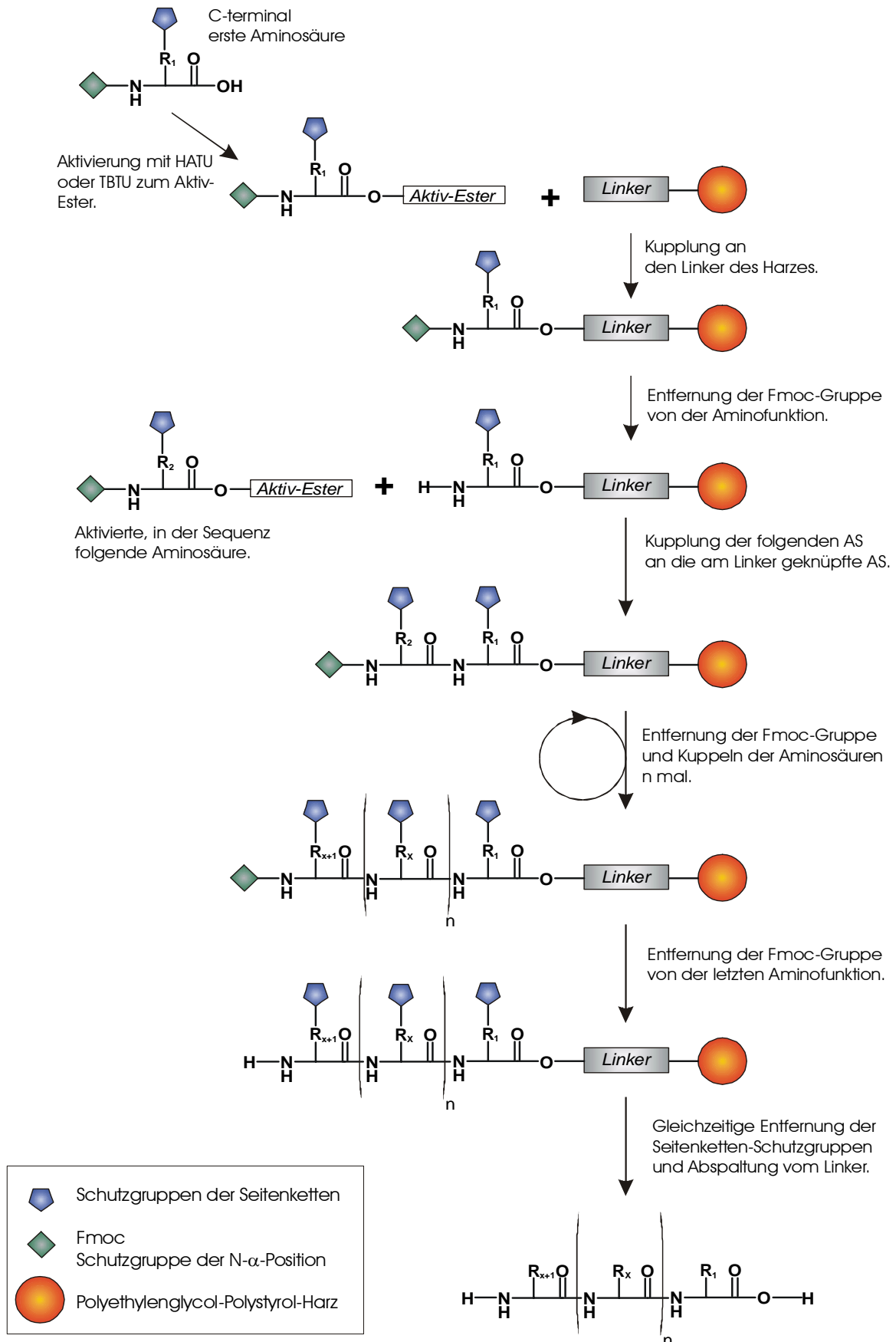


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Peptid-Festphasensynthese.

Da die Synthese an der Festphase verläuft, wird die erste Aminosäure über ihre Carboxylgruppe entweder als Amid oder als Benzylester an den *Linker* gebunden. Diese Bindung ist während der Synthese stabil, lässt sich nach Beendigung der Peptidarsstellung jedoch gezielt spalten. Bei der Abspaltung vom Harz werden in Abhängigkeit vom *Linker* die Abspaltbedingungen so gewählt, dass entweder sämtliche Schutzgruppen an den Seitenketten mit entfernt werden oder das Peptid für weitere Reaktionen an den Seitenketten geschützt bleibt. Entsprechend der Natur des *Linkers* liegt der C-Terminus des Peptids nach der Abspaltung somit entweder als Carboxamid oder als freie Carboxylgruppe vor.

Ein jeweiliger Synthesesyklus wird durch die Entschützung des N-Terminus am Harz eingeleitet. Daraufhin folgt die Kupplung einer aktivierten Fmoc-geschützten Aminosäure in Form eines Aktivesters und anschließend die Blockierung aller nicht umgesetzten Aminofunktionen durch Acetylierung. Die Fixierung der wachsenden Peptidkette am Harz erlaubt durch entsprechende Waschvorgänge eine problemlose und quantitative Entfernung überschüssiger und nicht umgesetzter Reagenzien ohne Verlust an Reaktionsprodukt, was gegenüber der Synthese in Lösung einen entscheidenden Vorteil darstellt. Allerdings sinkt häufig die Kupplungsausbeute bei länger werdenden Peptiden, da eine Verknäuelung und somit eine gegenseitige Behinderung der verschiedenen Ketten auftritt.

Die α -Aminofunktion der zu kuppelnden Aminosäure trägt während der Bindungsbildung eine Schutzgruppe, die jedoch vor einer weiteren Kupplung entsprechend der Primärsequenz abgespalten werden muss, wobei allerdings die Seitenkettenschutzgruppen orthogonal über die gesamte Synthese erhalten bleiben müssen. Hierfür hat sich im Laufe der Zeit die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe¹³⁵ als temporärer Schutz der α -Aminogruppen als besonders geeignet erwiesen. Zum einen kann sie unter milden basischen Bedingungen mittels Piperidin leicht abgespalten werden, zum anderen lässt sich der Verlauf der Synthese bequem photometrisch anhand der Bildung von Metylenfluoren verfolgen.

Für die Knüpfung der Peptidbindung stehen eine Reihe verschiedener Reagenzien (Aktivatoren) zur Verfügung, die die Aktivierung der α -Carboxylfunktion durch Bildung von Aktivestern bewirken, beispielsweise DCC, HOAt, HOBt, HBTU, TBTU oder HATU. Die in dieser Arbeit eingesetzten Aktivierungsreagenzien HATU¹³⁶ und TBTU¹³⁷ (s. Abbildung 10) haben sich aufgrund zahlreicher Vorteile etabliert.

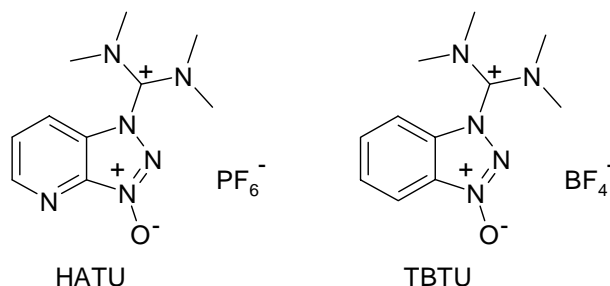


Abbildung 10: Die Aktivatoren *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) und *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU).

Sie ermöglichen die Kupplung mit hohen Ausbeuten bei kurzen Kupplungszeiten, ohne dass Racemisierung auftritt. Außerdem bieten sie eine hohe Kupplungseffektivität bei sterisch gehinderten Aminosäuren. Nachteilig wirkt sich allerdings der relativ hohe Preis von HATU aus. Der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch Bildung eines Aminosäureaktivesters durch HATU ist in Abbildung 11 dargestellt.

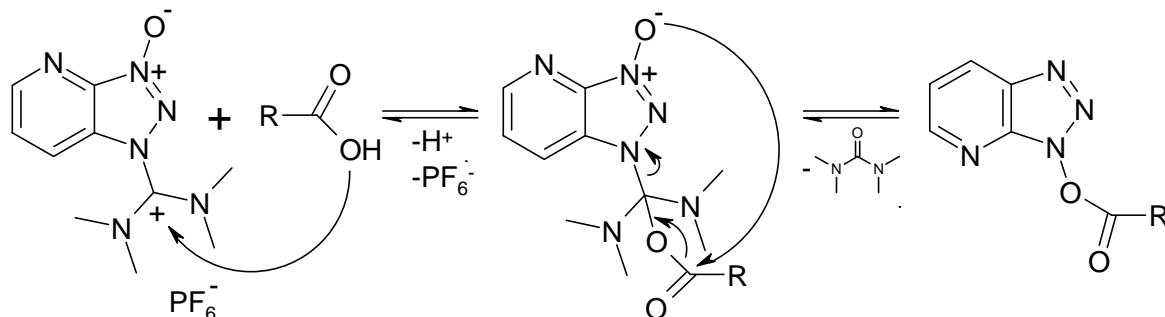


Abbildung 11: Vorgeschlagener Mechanismus der Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU.

Trotz Optimierung der einzelnen Kupplungsschritte verlaufen diese nicht immer quantitativ. Die nach einer Bindungsbildung nicht umgesetzten, noch frei vorliegenden Aminofunktionen, sind daher für nachfolgende Umsetzungen zu blockieren, um Deletionen zu vermeiden. Dazu wird nach jeder Kupplung ein *capping*-Schritt durchgeführt, wobei die Acetylierung nicht umgesetzter Aminogruppen mittels Essigsäureanhydrid die weitere Anknüpfung der nächsten Aminosäure verhindert.

Als Schutzgruppen der Seitenketten der zu kuppelnden Aminosäuren dienen in dieser Arbeit ausschließlich Trt-, Pbf-, *t*Bu-, Boc- und *S*tBu-Gruppen (s. Abbildung 12), die sich bis auf die *S*tBu-Gruppe in wasserhaltiger TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan¹³⁸ (TIPS) als *scavenger* problemlos entfernen lassen. Das TIPS wirkt als Hydridionendonator und sorgt durch Reaktion mit den während der Abspaltung frei werdenden Carbokationen dafür, dass diese nicht erneut mit dem Peptid reagieren können. Die *S*tBu-Schutzgruppe lässt sich durch Reduktion mittels DTT selektiv entfernen.

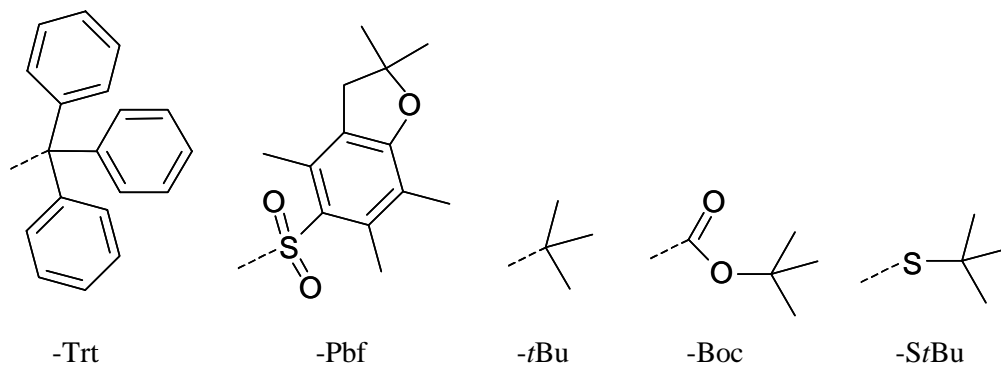


Abbildung 12: In der Festphasensynthese verwendete Seitenkettenschutzgruppen.

Für die Darstellung von *N*-Typ-Glycopeptiden stehen ebenso wie auch bei der reinen Peptidsynthese chemische, enzymatische oder gentechnologische Methoden in Expressionssystemen zur Verfügung. Die Gewinnung von Glycopeptiden aus natürlichen Quellen stellt einen aufwendigen und schwierigen Prozess von nur geringer Ergiebigkeit dar. Auch gentechnologische Verfahren durch Expression in gentechnisch veränderten Zellen sind problematisch, da die Glycosylierung posttranslational erfolgt, d.h. die Proteine werden im Anschluss an ihre ribosomale Synthese biochemisch modifiziert, wobei die Glycosylierung von Proteinen grundsätzlich spezie- und zelltypspezifisch ist¹³⁹ und somit nicht mit dem gewünschten Glycosylierungsmuster übereinstimmen muss. Die klassische organische Synthese stellt also eine wichtige Alternative dar und bietet einen wertvollen Zugang zur Darstellung von Glycopeptiden einer genau definierten Sequenz mit einheitlichem Glycosylierungsmuster in annehmbaren Ausbeuten.

Seit 1992 sind verschiedene Syntheseverfahren beschrieben worden, mit denen *N*-Typ-Glycopeptide darstellbar sind. Dabei können im Wesentlichen zwei Synthesestrategien unterschieden werden. Zum einen besteht die Möglichkeit der nachträglichen Glycosylierung¹⁴⁰ eines Peptids im Anschluss an die Peptidsynthese. Zum anderen werden glycosylierte Asparaginbausteine¹⁴¹ hergestellt, um diese dann in der sequentiellen Synthese bzw. in einer Blocksynthese einzusetzen.

Bei dem Verfahren der konvergenten Synthese werden die zu glycosylierenden Asparagine als Aspartate in die Peptidkette eingeführt, wobei die Aspartate mit orthogonal zu entfernenden Allylgruppen in den Seitenketten geschützt vorliegen, so dass hier die Glycosylierung erst im Anschluss an die gesamte Peptidsynthese erfolgt. Der Zucker wird als Glycosylamin eingesetzt und kann an der selektiv entschützten Seitenkette von Aspartat angeknüpft werden. Diese nachträgliche Glycosylierung kann allerdings die Schwierigkeit beinhalten, dass bereits am Harz gefaltete Peptide vorliegen, die an den zu glycosylierenden Aspartaten nicht mehr gut zugänglich sind und die schlechte Entropie der Reaktion zu Ausbeuteverlusten führt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die wertvollen Saccharide, die in der Regel nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen, erst zum Ende der Synthese eingesetzt werden. Allerdings wurden bei der Umsetzung dieser Methode hier im Arbeitskreis schlechte Erfahrungen gemacht.^{142,143}

Bei der Bausteinmethode werden glycosylierte Asparaginbausteine aus Asparagin oder Aspartat hergestellt, um diese dann in der sequentiellen Festphasensynthese bzw. in einer Blocksynthese einzusetzen. Der schrittweise Aufbau in der Festphasensynthese hat dabei den Nachteil, dass nach Einsatz der kostbaren Glycosylaminosäurebausteine, diese den gesamten nachfolgenden Syntheszyklus und die Abspaltung vom Harz unbeschadet überstehen müssen. Nachteilig ist außerdem der nicht vermeidbare Ausbeuteverlust, der im Wesentlichen durch nicht quantitative Umsätze bei den nachfolgenden Aminosäurekupplungen hervorgerufen wird. Der Vorteil dagegen besteht in der Möglichkeit der selektiven und auch

mehrfachen Glycosylierung an den gewünschten Asparaginen ohne den aufwendigen Einsatz von Schutzgruppen. Die Blocksynthese, bei der zunächst geschützte Peptidblöcke dargestellt werden, hat den Vorteil, dass hierbei die Glycosylbausteine erst zum Ende der Synthese zum Einsatz kommen, nachteilig ist dabei jedoch die unter Umständen schlechte Löslichkeit der zu verknüpfenden geschützten Peptidfragmente.

Ein Problem, welches sowohl bei der Bausteinstrategie als auch bei der nachträglichen Glycosylierung auftritt, ist die während der Kupplung auftretende unerwünschte Nebenreaktion der intramolekularen Aspartimidbildung.¹⁴⁴ Hierbei bildet sich zwischen der aktivierten Säurefunktion am Aspartatrest und der in der Sequenz benachbarten Aminosäure ein fünfgliedriger Succinimidring, der thermodynamisch sehr stabil ist.

Für die in der Bausteinstrategie erforderliche Synthese der glycosylierten Aminosäurebausteine hat sich der Einsatz von Aspartat etabliert. Die bis auf die Seitenketten-carboxylgruppe vollständig geschützte Asparaginsäure lässt sich nach vorheriger Aktivierung mittels TBTU in einer glycosidischen Bindung an den Aminozucker anknüpfen. Das Glycosylamin wird durch Aminierung des anomeren C-Atoms des hydroxylgruppen-ungeschützten Zuckers erhalten. Um in der späteren Peptidsynthese hochreaktive Aktivierungsreagenzien einsetzen zu können, werden die Hydroxylgruppen des Saccharidteils des Glycosylbausteines geschützt. Als Schutzgruppen für den Zucker werden zumeist Estergruppen verwendet, wobei sich der Schutz durch Acetylierung durchgesetzt hat. Abschließend wird die *t*Bu-geschützte α -Carboxylfunktion des Glycosylaminosäurebausteines entschützt.

Sollen disulfidverbrückte zyklische Peptide und Glycopeptide hergestellt werden, so stehen für das Verfahren der Zyklisierung zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung.¹⁴⁵ Für die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen kann man je nach Art der Cystein-Thiol-Schutzgruppen zwischen simultaner und sukzessiver Entschützung der Cysteine und ihrer Verknüpfung über eine Disulfidbrücke unterscheiden (s. Abbildung 13).

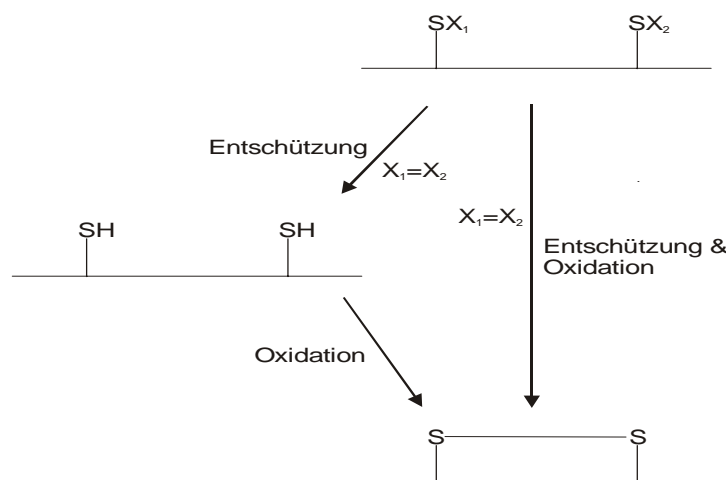


Abbildung 13: Synthesestrategien zur Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (X = Thiol-Schutzgruppen der Cysteine).

Methoden

Die Zyklisierung des Peptids kann sowohl am Harz als auch in Lösung durchgeführt werden. Dazu stehen zahlreiche Oxidationsmittel zur Verfügung, dazu gehören z.B. Iod, DMSO oder Luftsauerstoff.

Durch die Verfahren der simultanen Entschützung und oxidativen Zyklisierung^{146,147} wird ein Reaktionsschritt eingespart, vorteilig ist außerdem die kürzere Reaktionsdauer. Allerdings findet diese Methode im Allgemeinen in relativ konzentrierter Lösung statt, weshalb bei ungünstiger Sekundärstruktur oder zunehmender Peptidlänge die Tendenz zur intermolekularen Disulfidverbrückung und Polymerisation steigen kann.

Die Verfahren der schrittweisen Umsetzung erfolgen in stark verdünnter Lösung, so dass die einzelnen Peptide bei der Zyklisierung genügend großen Abstand voneinander haben, welches somit das Problem der intermolekularen Reaktion der Peptidketten reduziert. Gleiches gilt für die Zyklisierung am Harz bei niedriger Belegung, was allerdings auf kurze Peptide beschränkt ist, da bei wachsender Peptidlänge die Tendenz zur Polymerisation nicht durch Verringerung der Harzbelegung entsprechend kompensiert werden kann. Daher bietet sich die Zyklisierung bei hoher Verdünnung der Peptide in Lösung an, um zu gewährleisten, dass die Disulfidbrücken gezielt intramolekular geschlossen werden. Die Entschützungs- und Oxidationsbedingungen sind dabei derart zu wählen, dass sämtliche andere Funktionalitäten die Umsetzungen an den Cystein-Thiol-Gruppen unbeschadet überstehen und die Reagenzien sich nach Abschluss der Zyklisierung leicht entfernen lassen. Als bequem handhabbares Oxidationsmittel bietet sich Luftsauerstoff an, welches die oxidative Zyklisierung unter milden Bedingungen gewährleistet und zudem keinerlei Rückstände hinterlässt.¹⁴⁸ Als Oxidationsbeschleuniger kann ein geringer Zusatz von DMSO dienen, welches außerdem als Lösungsvermittler bei schlecht löslichen Peptiden wirkt.

Bei Verwendung von *S*(Trt)-geschützten Cysteinen werden die Thiol-Gruppen bei der Abspaltung von der Festphase unter Standardabspaltbedingungen mittels wässriger TFA gleichzeitig freigesetzt, so dass die Zyklisierung nach Einengung der Abspalllösung direkt in verdünnter Lösung aus dem Rohprodukt erfolgen kann. Vorteilig dabei ist eine schnelle und vollständige Entschützung des Peptides. Die Problematik dieser Methode liegt in der Gefahr, dass das entschützte Peptid während und nach der Abspaltung leicht polymerisieren kann, weshalb die Reaktion in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt werden muss. Die anschließende Zyklisierung erfolgt zwar in sehr verdünnter Lösung, jedoch führen auch die Abbruchprodukte der Synthese zu unkontrollierten Dimerisierungen und/oder Oligomerisierungen, welches insbesondere bei längeren Synthesen erhebliche Aufreinigungsprobleme nach sich zieht. Bei Verwendung von *S*tBu-Cysteinschutzgruppen erfolgt deren Entfernung und Zyklisierung erst nach der Abspaltung vom Harz und der Aufreinigung, was eine regioselektive Disulfidverbrückung des bereits aufgereinigten Zielproduktes ermöglicht, wodurch die Aufreinigungsproblematik durch die Abbruchpeptide vermieden werden kann. So besteht bei Einsatz von z.B. *S*tBu-geschützten Cysteinen die Möglichkeit, das von der

Festphase abgespaltene Peptid ohne die Gefahr einer Polymerisation aufzureinigen, selektiv mit DTT reaktiv zu entschützen (s. Abbildung 14) und daraufhin oxidativ zu zyklisieren.¹⁴⁹ Zusätzlich bietet diese Schutzgruppenstrategie die Möglichkeit, innerhalb einer Synthese sowohl die zyklische Form als auch das lineare Peptid zugänglich zu machen, je nachdem, ob die Cysteine entschützt werden und das Peptid zyklisiert wird, oder die Cysteine in geschützter Form belassen werden.

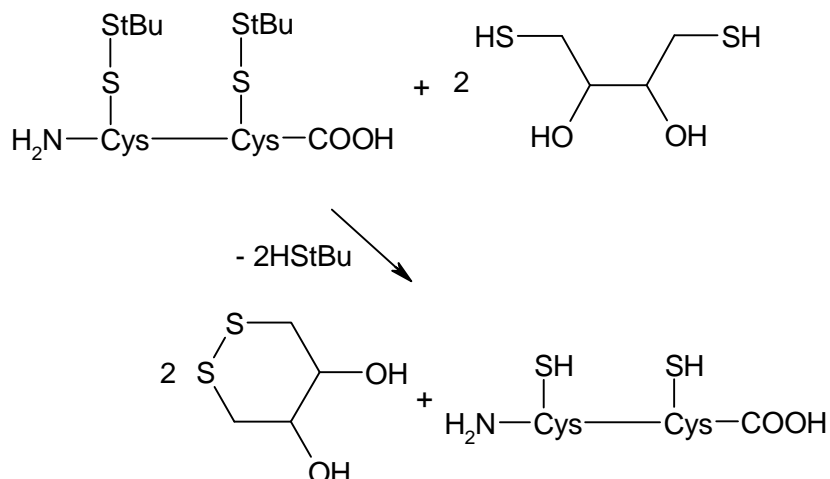


Abbildung 14: Reduktive Entschützung StBu-geschützter Cysteine mit DTT.

2.2 Analytik

2.2.1 Massenspektrometrische Methoden

Bei der Synthese komplexer Peptide und Glycopeptide entstehen häufig sehr umfassende Produktgemische, zu deren Identifizierung eine schnelle und sensitive Analysenmethode notwendig ist. Die *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight* - Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) und die *Electron Spray Ionisation* - Massenspektrometrie (ESI-MS) ermöglichen es, die synthetisierten Verbindungen sehr schnell und ohne großen Aufwand zu bestätigen.¹⁵⁰ Sie ermöglichen durch sanfte Ionisation und somit einer geringen Fragmentierung die Bestimmung des Molekulargewichtes von Biomolekülen. Diese Methoden besitzen den Vorteil sehr hoher Empfindlichkeit, so dass bereits geringe Substanzmengen im fmol-Bereich nachgewiesen werden können. Dies macht sie ideal für die Analytik von wertvollen, nur in geringen Mengen zur Verfügung stehenden Substanzen.

Hochmolekulare Verbindungen, wie es viele Klassen von Biomolekülen sind, können in herkömmlichen Verfahren aufgrund ihrer Molmasse nur schwer in die Gasphase überführt werden, ohne dabei zu fragmentieren. Dieses Problem hat die MALDI-TOF-Massenspektrometrie nahezu optimal gelöst. Es handelt sich bei dieser Methode um ein *hot spot* Verfahren, bei dem die Ionisierung durch kurze intensive Laserpulse erreicht wird. Dazu wird

die zu untersuchende Substanzprobe in großem Überschuss zusammen mit einer geeigneten organischen Matrix (z.B. CCA oder DHB) kokristallisiert, die bei der entsprechenden Wellenlänge des Lasers (N_2 337 nm) ein Absorptionsmaximum besitzt. Durch lokalen Laserbeschuss erfolgt die schlagartige Verdampfung der kleineren Matrixmoleküle, wobei die größeren Probenmoleküle in die Gasphase mitgerissen werden.¹⁵¹ Bei der Desorption der Matrixmoleküle werden diese zusätzlich durch Photoionisation angeregt und es findet ein Protonentransfer auf elektrisch neutrale Matrixmoleküle statt. Ein weiterer Ladungstransfer auf die Probenmoleküle sorgt dann für deren Ionisation. Nach der Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt die Detektion nach der *Time of Flight* Methode. Da die Endgeschwindigkeit der bei der Verdampfung ionisierten Teilchen im elektromagnetischen Feld umgekehrt proportional der Masse ist, lässt sich anhand der Flugzeit der Ionen ihr Masse-Ladungsverhältnis zuordnen.¹⁵² Eine Quantifizierung ist allerdings schwierig, da innerhalb der Probe keine homogene Kristallisation vorliegt und unterschiedliche Moleküle nicht gleich gut ionisiert werden.

Bei der ESI-Massenspektrometrie handelt es sich um ein homogenes Ionisationsverfahren, bei dem flüssige Proben vermessen werden. Dabei wird die Probelösung in einem starken elektrischen Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt, und der am MS-Eingang lokalisierten Gegenelektrode angelegt wird.¹⁵³ Die bei Atmosphärendruck gebildeten Ionen werden mit Hilfe der angelegten Spannung im Hochvakuum in Richtung des Analysators beschleunigt. Dabei wird eine schnelle und feine Zerstäubung der Flüssigkeit und eine effektive Ionisierung des Analyten erzielt. Durch eine Öffnung in der Gegenelektrode gelangen die Ionen in den Analysatorteil des Spektrometers. Die Bestimmung ihres Masse-Ladungsverhältnisses erfolgt dabei z.B. über einen Quadrupol. Es treten hierbei neben den einfach geladenen auch mehrfach geladene Molekülonen auf. Dies eröffnet die Möglichkeit neben niedermolekularen Molekülen (Untergrenze ca. 100 m/z) auch sehr hochmolekulare Biomoleküle zu vermessen. Außerdem treten bei der ESI-MS selten Fragmentierungen auf, was die Bestimmung der Molekularmasse in der Regel vereinfacht. Vorteilig gegenüber der MALDI-TOF-MS ist die Möglichkeit der Kombination mit einer HPLC. Außerdem ist hier eine Quantifizierung von Einzelkomponenten vergleichbarer Molekülklassen möglich, da eine homogene Lösung vorliegt und nicht ein heterogener Kristall.

2.2.2 NMR-spektroskopische Methoden

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die experimentelle Untersuchung von Peptiden und Glycopeptiden in Lösung¹⁵⁴ und gestattet somit deren Analyse unter nahezu physiologischen Bedingungen. Sie hat sich dabei zu einem unverzichtbaren Hilfsmittel für die Charakterisierung von Biomolekülen entwickelt.¹⁵⁵ Die Aufnahme der Spektren erfolgt dazu vorzugsweise in H_2O/D_2O (9:1), um auch die NH-Protonen zu detektieren. Die Unter-

drückung des Wassersignals erfolgt durch eine Vorsättigung des Resonanzsignals oder in Form einer *Watergate*-Pulssequenz.

Bei kleineren Molekülen kann durch die Aufnahme eines eindimensionalen ^1H -NMR-Spektrums bereits in vielen Fällen die Identität der Verbindung bestimmt werden. Die Vorteile des ^1H -NMR-Spektrums liegen dabei in der ausgezeichneten Empfindlichkeit bei sehr kurzen Messzeiten und hoher digitaler Auflösung. Im Falle größerer und komplex gebauter Verbindungen resultieren allerdings aufgrund von Signalüberlagerungen kompliziertere Spektren, die in der Regel nicht mehr auswertbar sind, jedoch einen ersten Überblick der charakteristischen Regionen ermöglichen. Dort stellen mehrdimensionale Spektren ein wichtiges Hilfsmittel bei der spektroskopischen Analyse dar. Die Aufnahme zweidimensionaler Spektren, die allerdings ein schlechteres Signal zu Rauschverhältnis als eindimensionale Techniken besitzen, ermöglicht die genaue Ermittlung der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten, sowie die Sequenzbestimmung. Man unterscheidet bei der hochauflösenden NMR-Spektroskopie zwischen skalarer Spin-Spin-Kopplung (J-Kopplung), die über die Bindungselektronen vermittelt wird und typischerweise über drei Bindungen effektiv ist, sowie die dipolare Kopplung von Spins, die direkt durch den Raum miteinander wechselwirken. Die im Folgenden erläuterten homonuklearen 2D-Experimente ermöglichen die Identifizierung der einzelnen Spinsysteme sowie die genaue Ermittlung skalarer und dipolarer Kopplungen, was wichtige strukturelevante Daten liefert.¹⁵⁶

In einem TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)-Experiment kann durch das Anlegen eines Spinlockfeldes die totale Korrelation der gekoppelten Spins eines Spinsystems erreicht werden.¹⁵⁷ Hierfür ist es allerdings erforderlich, dass die Kopplungskonstante $^3J_{\text{HH}}$ zwischen zwei direkt koppelnden Spins mindestens zwei Hertz beträgt. Dabei hängt es von der Spinlockzeit im Experiment ab, wie weit der Magnetisierungstransfer innerhalb eines Spinsystems erfolgt. Das so erhaltene Kopplungsmuster ermöglicht die Identifizierung der einzelnen Spinsysteme und somit eine Zuordnung der einzelnen Aminosäuren, denn idealerweise ist innerhalb einer Spur das gesamte Spinsystem beobachtbar. Die Ermittlung der chemischen Verschiebungen erfolgt dabei vorzugsweise durch Analyse der NH-Spuren, da diese meist gut dispergiert und separiert von anderen Resonanzsignalen vorliegen.

Da mit Hilfe eines 1D-NMR-Experiments die skalaren Kopplungskonstanten nur bei kleineren Molekülen bestimmbar sind, empfiehlt es sich, diese bei komplexeren Spinsystemen anhand eines COSY (*Correlated Spectroscopy*)-Spektrums zu ermitteln. Hierbei ist es möglich, über die Kreuzsignale ein gesamtes Spinsystem zu verfolgen. Bei starken Signalüberlagerungen, die beispielsweise bei den Seitenketten von Arg, Leu, Lys oder Pro auftreten, und einer gleichzeitigen starken Aufspaltung des Signals, ist eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich. Daher ist bei größeren Molekülen die Aufnahme eines E.COSY-Spektrums ratsam, da bei dieser Aufnahmetechnik die Multipletstruktur erheblich

vereinfacht wird. Allerdings ist im Falle einer starken Kopplung mit dem Verschwinden der Kreuzsignale unter der Diagonalen zu rechnen. Durch die Verwendung eines Doppelquantenfilters (DQF-COSY) werden Singulettsignale unterdrückt, was die Übersichtlichkeit des Spektrums weiter erhöht. Mit Hilfe des COSY-Experiments kann eine eindeutige Zuordnung von Zuckerprotonen oder peptidischen Protonen von Aminosäureseitenketten durchgeführt werden.¹⁵⁸

NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy*)-Experimente basieren auf der dipolaren Kopplung von Spins direkt durch den Raum.¹⁵⁹ Durch sie wird das Relaxationsverhalten räumlich benachbarter Kerne beeinflusst. Die Magnetisierung eines Spins führt zu einer vom Gleichgewicht abweichenden Magnetisierung eines benachbarten Spins. Dieses Phänomen der Kreuzrelaxation der longitudinalen Magnetisierung wird als *Nuclear-Overhauser-Enhancement* (NOE) bezeichnet¹⁶⁰ und gibt Auskunft über den effektiven räumlichen Abstand der Kopplungspartner. Die Intensität des NOESY-Kreuzsignals im Spektrum ist abhängig vom Abstand der beiden Kerne zueinander und spiegelt Abstände zwischen zwei Protonen von 2 bis 5 Å wieder. Dabei ist durch die Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren (Nachbarschafts-NOEs) die Sequenzierung eines Peptids möglich (s. Abbildung 15).

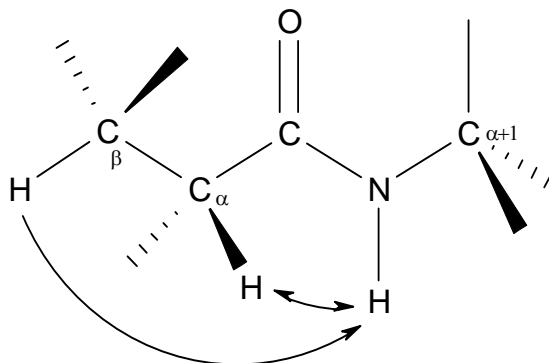


Abbildung 15: Sequenzielle NOE-Kontakte zwischen benachbarten Aminosäuren eines Peptids.

Außerdem dient das NOESY-Experiment bei Glycopeptiden zur Zuordnung der Saccharide zu den daran gebundenen Aminosäuren. Durch Analyse der NOE-MH-MH-Kontakte können Aussagen über die Sekundärstruktur von Peptiden gemacht werden. MH_i - MH_{i+1} - und MH_i - MH_{i+2} -Kontakte deuten dabei auf α -helicale Bereiche hin, dagegen werden in β -Strängen nur MH_i - MH_{i+1} -Kontakte beobachtet. Da es sich beim NOE um ein reines Relaxationsphänomen handelt, ist es unerheblich, ob die Spins zusätzlich über eine skalare Kopplung miteinander verknüpft sind. Neben sequenziellen NOE-Kontakten zwischen den amidischen Protonen können auch *long-range* NOE-Kontakte aufgrund weit entfernterer Kopplungen beobachtet werden.

2.3 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Die Untersuchung biomolekularer Interaktionen von biologischen Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden oder Zuckern mit anderen Molekülen gewinnt im Rahmen der Wirkstoffentwicklung zunehmend an Bedeutung. Mit Hilfe eines Anfang der neunziger Jahre von der Firma *Biacore* (Uppsala, Schweden) eingeführten Sensorchip-Messverfahrens, welches das Oberflächenplasmonenresonanz-Phänomen (SPR) ausnutzt, besteht die Möglichkeit ein bio-spezifisches Bindungsereignis von unmarkierten Substanzen in Echtzeit zu verfolgen.¹⁶¹

Die physikalischen Grundlagen dieser optischen Methode wurden bereits 1959 beschrieben.¹⁶² Diese sehr empfindliche Methode hat sich außergewöhnlich schnell entwickelt und gehört heute zu einer Standardmethode in pharmazeutischen Unternehmen.¹⁶³ Gegenüber klassischen Bindungsassays, die auf markierte Bindungspartner (Enzym- oder Fluoreszenzlabel oder auch radioaktive Isotope) angewiesen sind, ist der Hauptvorteil von SPR¹⁶⁴ basierten Biosensoren, dass die Moleküle keinerlei *labeling* benötigen und somit keine Moleküleigenschaften verändert werden. Allerdings muss dazu eine Komponente immobilisiert werden. Vorteilhaft ist die Möglichkeit unter nahezu physiologischen Bedingungen arbeiten zu können. Es können beinahe sämtliche wässrigen Puffersysteme eingesetzt werden, aber auch geringe Zusätze an organischen Lösungsmitteln sind möglich. Weiterhin werden für die Untersuchungen nur sehr geringe Mengen des häufig schwer zugänglichen biologischen Materials benötigt. Ferner bietet dieses Mess-System die Möglichkeit, dass neben Molekülen auch größere Systeme wie Viren¹⁶⁵, Bakterien¹⁶⁶ oder auch ganze Zellen¹⁶⁷ mit Erfolg vermessen werden können. Von besonderem wissenschaftlichen Interesse sind außerdem *Biacore* Untersuchungen an membranständigen Rezeptoren, da diese an häufig in der Natur vorkommenden Interaktionen beteiligt sind.¹⁶⁸

2.3.1 Theorie

Grundlage der *Biacore*-Systeme bildet die SPR- also Oberflächenplasmonenresonanz-Detektion, bei der monochromatisches, linear polarisiertes Licht unter Totalreflexion auf eine Grenzfläche von hohem zu niedrigem Brechungsindex auftrifft. Aufgrund des total-reflektierten Lichtes entsteht im optisch dünneren Bereich ein sogenanntes evaneszierendes Feld, wobei die Intensität der evaneszierenden Welle jenseits der Grenzfläche exponentiell abnimmt. Die Eindringtiefe entspricht dabei etwa der Wellenlänge des verwendeten Lichtstrahles. Ist die Grenzfläche mit einem dünnen Film eines leitenden aber nicht magnetischen Materials (z.B. Goldschicht) beschichtet, so tritt bei einem geeigneten Winkel eine Wechselwirkung der evaneszierenden Welle mit den Oberflächenplasmonen der Metallschicht auf. Diese Anregung von Oberflächenplasmonen führt zu einer deutlichen Verstärkung des evaneszierenden Feldes. Dies geschieht bei einem Reflexionswinkel, der vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängt. Eine auftretende Resonanz der Oberflächenplasmonen (*surface plasmon resonance* SPR) führt zu einer Intensitäts-

abschwächung des reflektierten Lichtes bei einem bestimmten Totalreflexionswinkel. Bei einem Bindungsereignis wird die Intensitätsänderung des Lichtes durch SPR detektiert, gemessen wird dabei die Veränderung des Winkels der Totalreflexion (s. Abbildung 16; Auftragung der Intensität des reflektierten Lichtes gegen den Winkel).¹⁶² Eine Änderung des Brechungsindex der Lösung nahe der Metallschicht von $1 \cdot 10^{-3}$ erzeugt eine Verschiebung im Resonanzwinkel um 0.1° , wobei aktuelle *Biacore* Geräte Änderungen von 0.0001° verfolgen können. Als Signal wird diese gemessene Veränderung des Resonanzwinkels in RU (*Response Unit*) angegeben. Es konnte gezeigt werden, dass für Proteine die Änderung des Brechungsindex und somit des Resonanzsignals nahezu proportional zur entsprechenden Massenzunahme auf der Sensorchipoberfläche ist.¹⁶⁹ Dies gilt annähernd auch für andere Moleküle. Daher kann das SPR-Verfahren zur Messung von Massendifferenzen benutzt werden. Die Zunahme des SPR-Signals von 1 RU entspricht etwa einer gebundenen Masse von 1 pg/mm^2 und 0.0001° .

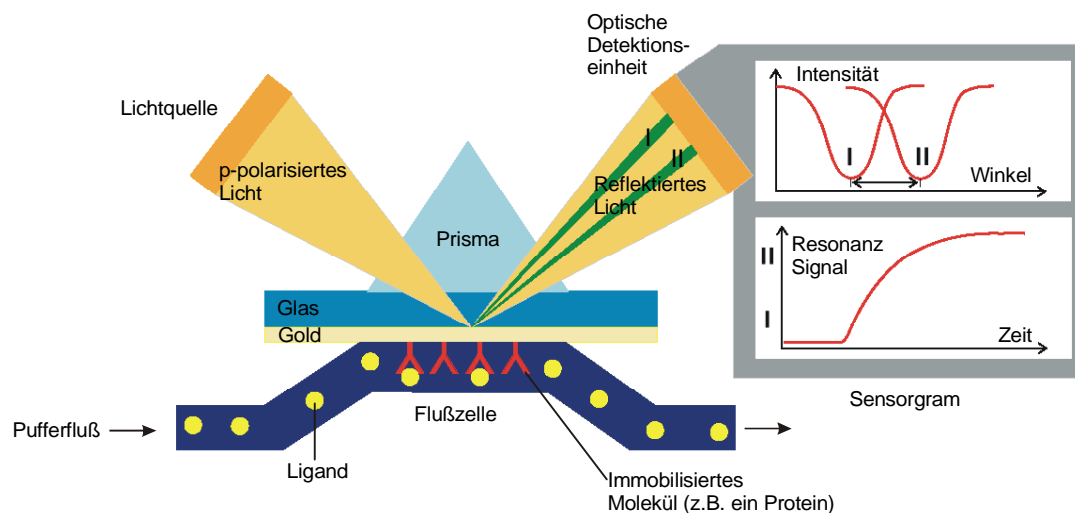


Abbildung 16: Schematische Darstellung des *Surface Plasmon Resonance* Experiments.

Biacore-SPR-Experimente ermöglichen die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen zwischen einer kovalent auf der Sensorchipoberfläche immobilisierten Verbindung und einem gelösten bzw. suspendierten Bindungspartner, der durch ein Mikrofluidsystem daran vorbeigeleitet wird (s. Abbildung 16).¹⁷⁰ Grundsätzlich kann dabei der immobilisierte Bindungspartner sowohl der makromolekulare Rezeptor (z.B. das Protein) als auch ein niedermolekularer Bindungspartner sein¹⁷¹, wobei es aufgrund der Empfindlichkeit vorteilhaft sein kann, den Bindungspartner mit dem niedrigeren Molekulargewicht zu immobilisieren. Allerdings kann dies aufgrund von *rebinding*-Effekten und begrenzter freier Diffusion zu falschen kinetischen Daten führen. Bei dem *Biacore*-Sensorchipssystem handelt es sich bei dem optisch dichteren Medium um einen Glasträger, der mit einem Goldfilm (50 nm) beschichtet ist. Das Medium niedrigeren Brechungsindex wird durch die in der Flusszelle strömende Lösung des mobilen Bindungspartners dargestellt. Die Lösung mit dem Bindungspartner fließt über die immobilisierte Verbindung, wobei ein Bindungsereignis

Methoden

zwischen den beiden Komponenten zu einer Erhöhung der lokalen Konzentration der mobilen Verbindung in der Nähe der Goldschicht führt, woraus eine Änderung des Brechungsindex und damit des Mess-Signals resultiert.

Je nach Fragestellung stehen dabei unterschiedliche Sensorchiparten und entsprechende Immobilisierungsverfahren zur Verfügung.¹⁷² Bei einer gebräuchlichen Methode erfolgt die Immobilisierung (Belegung) über eine Aminkupplung. Hierfür ist auf den Goldfilm des Sensorchips eine über Linker fixierte carboxymethylierte Dextranmatrix aufgebracht. Unter Einsatz von EDC und NHS werden die Carboxylfunktionen der Dextranschicht zunächst in Aktivester überführt und anschließend die Verbindung kovalent über eine Amidbindung gebunden (s. Abbildung 17). Abschließend werden sämtliche nicht umgesetzten, aber aktivierten Carboxylfunktionen mit einem Überschuss Ethanolamin umgesetzt und auf diese Weise inaktiviert.

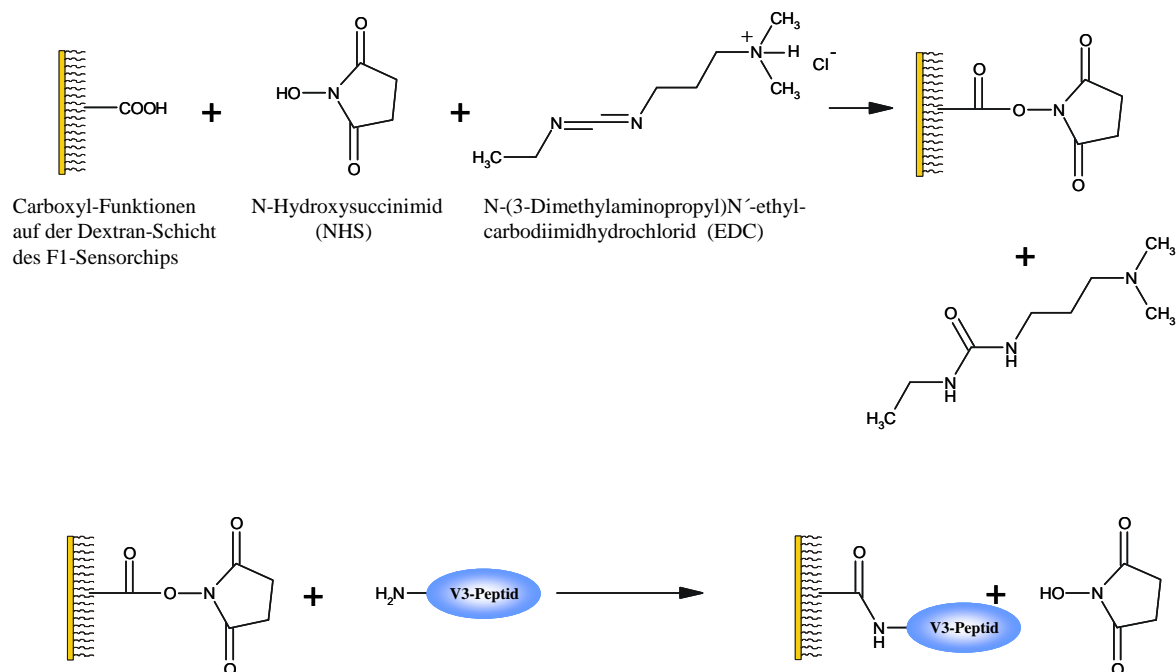


Abbildung 17: Immobilisierung eines V3-Peptides auf der Chipoberfläche durch Aminkupplung.

Darüber hinaus sind andere Sensorchips kommerziell erhältlich, auf deren Oberfläche beispielsweise biotinylierte Proteine über Streptavidin oder Proteine mit *his-tag* über einen Nickelchelate-Komplex immobilisiert werden können. Auch gibt es carboxymethylierte Sensorchips unterschiedlicher Carboxyl-Dichte und Matrix-Dicke. Eine weitere interessante Anwendung bietet die Belegung eines Sensorchips mit Liposomen.¹⁷³

Da der Brechungsindex in Abhängigkeit von der Konzentration an gelösten Molekülen (Biomoleküle, Salze, Puffersubstanzen etc.) stark variiert, wird parallel zur Messzelle stets eine Referenzzelle vermessen, auf der kein Bindungspartner immobilisiert wurde. Das eigentliche Signal eines *Biacore*-Sensorgramms (s. Abbildung 18) stellt dann die Differenz der Signale von belegter Messzelle und Referenzzelle dar. Dies ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit einerseits notwendig, um die spezifische Wechselwirkung zwischen beiden

Bindungspartnern von der nicht-spezifischen Wechselwirkung des mobilen Bindungspartners mit der Chipoberfläche zu unterscheiden. Andererseits dient es zur Unterscheidung von Änderungen im Brechungsindex, die durch *bulk*-Effekte während der Injektionen hervorgerufen werden. Dieser Effekt beschreibt die Differenzen im Brechungsindex zwischen dem Laufpuffer und der Injektionslösung.

Der idealisierte Verlauf eines SPR-Experiments¹⁷⁰ lässt sich in Form eines Sensorgramms in der Auftragung der RU-Werte in Abhängigkeit von der Messzeit in drei Phasen unterteilen (s. Abbildung 18).

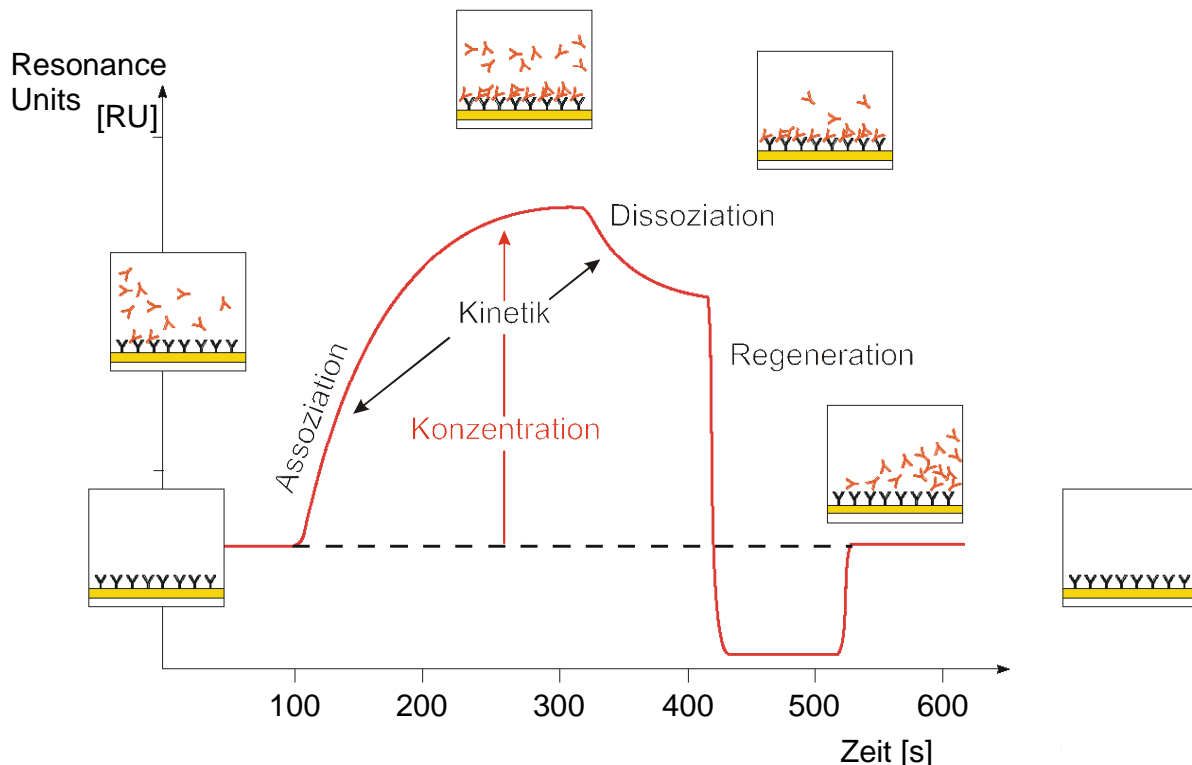


Abbildung 18: Idealisierter Verlauf eines SPR-Experiments.¹⁷⁰

Nachdem zu Anfang der Messung lediglich Laufpuffer über die Sensorchipoberfläche fließt, folgt mit der Zugabe des mobilen Bindungspartners die Assoziationsphase, in der der gelöste oder suspendierte Bindungspartner über die Chipoberfläche strömt und mit den immobilisierten Verbindungen wechselwirkt. Durch die Assoziation an Bindungspartner nimmt das Resonanzsignal zu. Die Steigung des Signals flacht nach einiger Zeit ab, da die Bindungsstellen auf der Chipoberfläche zunehmend belegt werden. Sind alle Bindungsstellen belegt, so stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation ein und das Resonanzsignal erreicht das Plateau des Sättigungsgleichgewichtes. Die Steigung des Resonanzsignals und der Zeitraum bis zum Erreichen des Plateaus ist abhängig von der Konzentration des gelösten Bindungspartners und der Kinetik des untersuchten Systems. Nach Beendigung der Zugabe an mobilem Bindungspartner wird mit Laufpuffer gespült und der gebundene Bindungspartner dissoziiert wieder ab, wodurch das Resonanzsignal

abnimmt. Auf die Dissoziationsphase folgt in der Regel die Regeneration der Sensorchipoberfläche durch Zugabe einer Regenerationslösung, wodurch die Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern schnell und vollständig gelöst wird. Das Resonanzsignal kehrt zur Basislinie zurück und der Sensorchip kann für ein weiteres SPR-Experiment genutzt werden.

Der Sättigungswert des erreichten Gleichgewichtszustandes ermöglicht einen quantitativen Vergleich der Bindungseigenschaften gegenüber anderen Bindungspartnern. Ist die Kinetik der Austauschprozesse nicht zu schnell, so lassen sich aus dem Kurvenverlauf des Sensorgramms die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{on} und der Dissoziation k_{off} bestimmen. Die thermodynamische Gleichgewichtskonstante der Dissoziationsreaktion K_D ergibt sich aus den beiden kinetischen Daten k_{on} und k_{off} .¹⁷⁴

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Sehr schnelle Austauschprozesse sind allerdings über diesen kinetischen Weg nicht mehr auswertbar. In diesen Fällen lässt sich die Dissoziationskonstante und somit die Gleichgewichtskonstante K_D nur über eine Konzentrationsreihe bestimmen.^{172,175,176} Insbesondere bei hoher Belegung des Sensorchips und bei niedrigen Flussraten kann die Assoziation außerdem durch die Diffusion des mobilen Bindungspartners begrenzt sein, was zu einer fehlerhaften Geschwindigkeitskonstanten k_{on} führt. Auch die beobachtete Dissoziationsrate kann durch sogenanntes *rebinding*, also das erneute Binden des Analyten, fehlerbehaftet sein. Wenn die mobile Komponente nicht selbstständig dissoziiert, muss die Regeneration der Chipoberfläche durch Injektion geeigneter Lösungen (z.B. einem Detergenz oder durch Änderung des pH-Wertes) unterstützt werden. Die thermodynamische Dissoziationskonstante lässt sich allerdings auch ohne Bestimmung von k_{off} unter Zuhilfenahme eines 1:1-Bindungsmodells (*One-Site-Binding*) ermitteln. Dazu sind Bestimmungen der maximalen RU-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des mobilen Bindungspartners (c_B) vorzunehmen. Der K_D -Wert ergibt sich aus der mathematischen Anpassung folgender Formel:

$$RU = RU_{max} c_B / (K_D + c_B)$$

Die Konstante K der *One-Site-Binding*-Funktion stellt bei SPR-Studien mit Molekülen die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D in mol/L dar, für deren Berechnung man die Kenntnis der Konzentration an mobilem Bindungspartner benötigt. Dagegen hätte K_D bei Bindungsstudien mit Zellsuspensionen eine Einheit von Zellen/L und wäre nur bedingt aussagekräftig. Bei SPR-Experimenten mit membranständigen Rezeptoren auf Zellen, wie es in dieser Arbeit bei der Untersuchung molekularer Interaktionen mit Peptiden und Glycopeptiden der Fall ist, entspricht die Konzentration an mobilem Bindungspartner der Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Da jedoch die Rezeptoranzahl der Zellen nicht konstant ist, lässt sie sich nur abschätzen, weshalb kein K_D -Wert angegeben werden kann.

2.3.2 SPR-Experimente mit Zellen

Für die Untersuchung der im Rahmen des HIV-Entry stattfindenden Interaktion zwischen der V3-Region und dem HIV CCR5-Korezeptor lässt sich durch den Einsatz CCR5 über-exprimierender Zellen (*HI5-Zellen*)¹⁷⁷ diese spezifische Wechselwirkung durch SPR-Experimente an immobilisierten V3-Verbindungen analysieren. Die Anzahl der auf der Zelloberfläche befindlichen CCR5-Korezeptoren liegt bei etwa 10^4 - 10^6 Kopien pro Zelle. Es handelt sich bei diesen Zellen um eine humane *Osteosarkoma-Zelllinie (HOS)*. Die V3-Verbindungen lassen sich auf der Chipoberfläche immobilisieren und als vorüber fließender Bindungspartner dienen im Laufmittel suspendierte *HI5-Zellen*.

Bei SPR-Experimenten mit Molekülen stellt die Anzahl der detektierten RUs ein Maß für die Anzahl gebildeter Komplexe mit dem immobilisierten Bindungspartner dar. Eine Zelle bindet jedoch über diverse Rezeptoren an mehrere immobilisierte Moleküle. Ausserdem haben Rezeptoren, die sich auf der von der Chipoberfläche abgewandten Seite der Zelloberfläche befinden, nicht die Möglichkeit mit dem immobilisierten Bindungspartner in Wechselwirkung zu treten. Zudem variiert die Rezeptoranzahl von Zelle zu Zelle, weshalb sich ein aussagekräftiger K_D -Wert allenfalls abschätzen lässt. Ein quantitativer Vergleich der Bindungseigenschaften gegenüber anderen Bindungspartnern wird jedoch durch Vermessung von Konzentrationsreihen ermöglicht. Werden die Zellkonzentrationsreihen verschiedener Verbindungen relativ zueinander ins Verhältnis gesetzt, so zeigt bei entsprechend gleicher Immobilisationsrate die am stärksten bindende Verbindung die Konzentrationsreihe mit den höchsten RU-Werten. Als Negativkontrolle zeigen Parentalzellen der gleichen Zelllinie, die jedoch nicht über CCR5-Korezeptoren auf ihrer Oberfläche verfügen, ob die detektierte Bindung spezifisch oder unspezifisch erfolgt.

3 Problemstellung

Ein entscheidender Schritt des HIV-*Entry* ist die Interaktion des viralen Glycoproteins gp120 mit dem Chemokinrezeptor CCR5 humaner CD4⁺-Lymphozyten. Die Inhibition dieser Wechselwirkung ist das Ziel neuer Anti-HIV-Wirkstoffe für den effektiven Einsatz im Rahmen einer Multi-Target-Therapie. Nachdem vorangegangene Studien^{106,107} zeigten, dass die V3-Region des HIV deutlich mit CCR5 interagiert, war es im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, V3-Peptide und Glycopeptide zu synthetisieren, um strukturelle Informationen zu erhalten und das Bindungsepitop genauer zu charakterisieren. Es ist dabei anzunehmen, dass die Konformation der V3-Region des gp120 in direktem Zusammenhang mit der biologischen Aktivität dieses Glycoproteins steht. Deshalb ist ein genauerer Einblick von großer Bedeutung, um Informationen über den Einfluss von Glycosylierungen und der Zyklisierung, sowie der erweiterten flankierenden Bereiche der V3-Loop auf die 3D-Struktur und die CCR5-Bindungseigenschaften zu gewinnen. Zur Herstellung von Peptiden und *N*-Typ-Glycopeptiden eignet sich die organisch-chemische Synthese in besonderer Weise.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten offenkettige und zyklische Peptide und *N*-Typ-Glycopeptide aus dem erweiterten V3-Bereich des HIV-1 gp120 mit Hilfe der Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie synthetisiert werden. Es wurde hinsichtlich der hohen Variabilität der V3-Loop eine geeignete Sequenz der größten prozentualen Häufigkeit an Aminosäuren der Nordamerikanischen Konsensussequenz des gp120 ausgewählt:

ESVEIN[C₂₉₆]TRPN[N]NTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAH[C₃₃₀]NISRAKW[N]DTLK

Die markierten Cysteine C₂₉₆ und C₃₃₀ zeigen die Positionen der Disulfidverbrückung der V3, die markierten Asparagine stellen die Glycosylierungsstellen dar. Bei der Glycopeptidsynthese war anstelle der natürlichen *N*-Typ-Glycosylierungen der Zucker Chitobiose als Modellverbindung einzusetzen. Dazu sollte der *N*₇-Chitobiosyl-Asparagin-Baustein **6** hergestellt und in der sequentiellen Synthese verwendet werden.

Die dargestellten Verbindungen waren anschließend durch MALDI-TOF-MS und NMR-Spektroskopie zu identifizieren. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen sollten vergleichende Aussagen hinsichtlich struktureller Veränderungen gemacht werden. Zur genaueren Charakterisierung des Bindungsepitops der gp120/CCR5-Interaktion sollten die V3-Verbindungen anschließend durch SPR-Studien mit CCR5-überexprimierenden Zellen auf ihre Korezeptorspezifität hin untersucht werden. Hierbei ist insbesondere von Interesse, inwieweit die Zyklisierung und eine mehrfache Glycosylierung, sowie die verlängerten Flanken des V3-Bereiches Einfluss auf die Bindungsaffinität zeigen. Die aus diesen Studien gewonnenen Erkenntnisse, können zu einem detaillierten Verständnis der Wechselwirkung und so zur Entwicklung von *Entry*-Inhibitoren beitragen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Darstellung des *N*_γ-Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines **6**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Glycopeptide erfolgte nach der zuvor beschriebenen Bausteinstrategie. Die Darstellungsweise des hierfür erforderlichen *N*_γ-Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines **6** ist im Prinzip bekannt,¹⁷⁸ wurde jedoch weiter optimiert, wobei die verbesserten Arbeitsweisen im Folgenden hervorgehoben sind.

Chitin **1** stellt ein preiswertes und aus Krabbenschalen gut zugängliches Ausgangsmaterial zur Isolierung von Chitobioseoctaacetat **2** dar.¹⁷⁹ Dazu wurde einer Lösung aus Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid fein gemahlenes Chitin zugesetzt, das unter der Einwirkung von Ultraschall gespalten wurde (s. Abbildung 19).

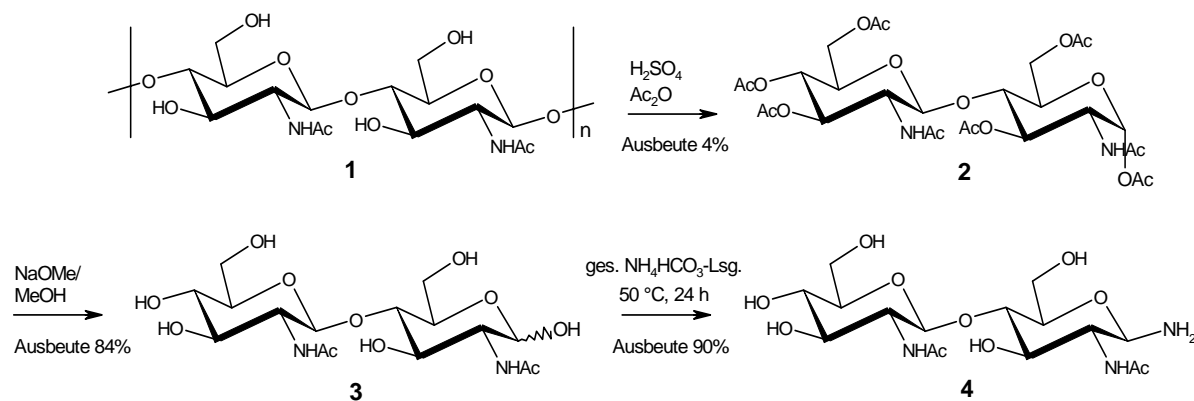


Abbildung 19: Darstellung von Di-*N*-Acetylchitobiosylamin **4**.

Dabei war die vorgegebene Reaktionstemperatur präzise einzuhalten, da bei zu hohen Spalttemperaturen die Ringöffnung des reduzierenden Zuckers zum Aldehyd erfolgt (s. Abbildung 20). Bei zu niedriger Temperatur wird dagegen die Bildung der längerkettigen Oligomere begünstigt.

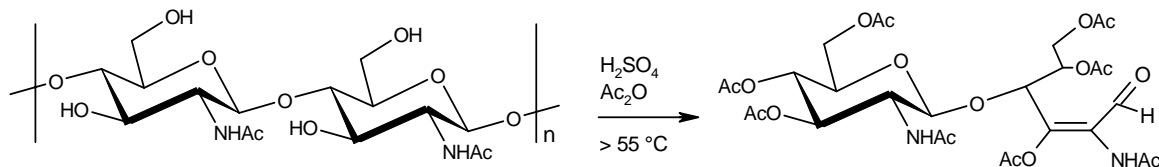


Abbildung 20: Nebenreaktion bei der Chitinspaltung bei zu hoher Reaktionstemperatur.

Die Auftrennung des Oligomerengemisches erfolgte mit Hilfe einer Mitteldrucksäule. Aus dem resultierenden α/β -Gemisch des Chitobioseoctaacetats **2** erhielt man durch Umkristallisation aus Ethanol das reine α -Anomer.

Deacetylierung von **2** durch Einwirkung von Natriummethanolatlösung ergab die *O*-deacetylierte Di-*N*-Acetylchitobiose **3** als α/β -Anomerengemisch (s. Abbildung 19).

Ergebnisse und Diskussion

Durch Umsetzung in gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung ließ sich dann die Chitobiose **3** bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C innerhalb von 20 Stunden in das entsprechende Di-*N*-Acetylchitobiosylamin **4** überführen¹⁸⁰ (s. Abbildung 19). Das Rohprodukt von **4** wurde dabei zur Abtrennung der Salze zunächst am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Da in neutraler, wässriger Lösung ein Gleichgewicht vorliegt, durch das das Chitobiosylamin **4** in wenigen Stunden zur Chitobiose **3** zurück reagiert, wurde zur Aufnahme des Rohproduktes eisgekühltes Wasser verwendet und die erhaltene Lösung sofort gefriergetrocknet.

Zur Verknüpfung des Chitobiosylamins **4** zum *N*_γ-Chitobiosyl-Asparagin-Baustein **6** wurde der Aspartatbaustein Fmoc-Asp-*O**t*Bu verwendet (s. Abbildung 21).

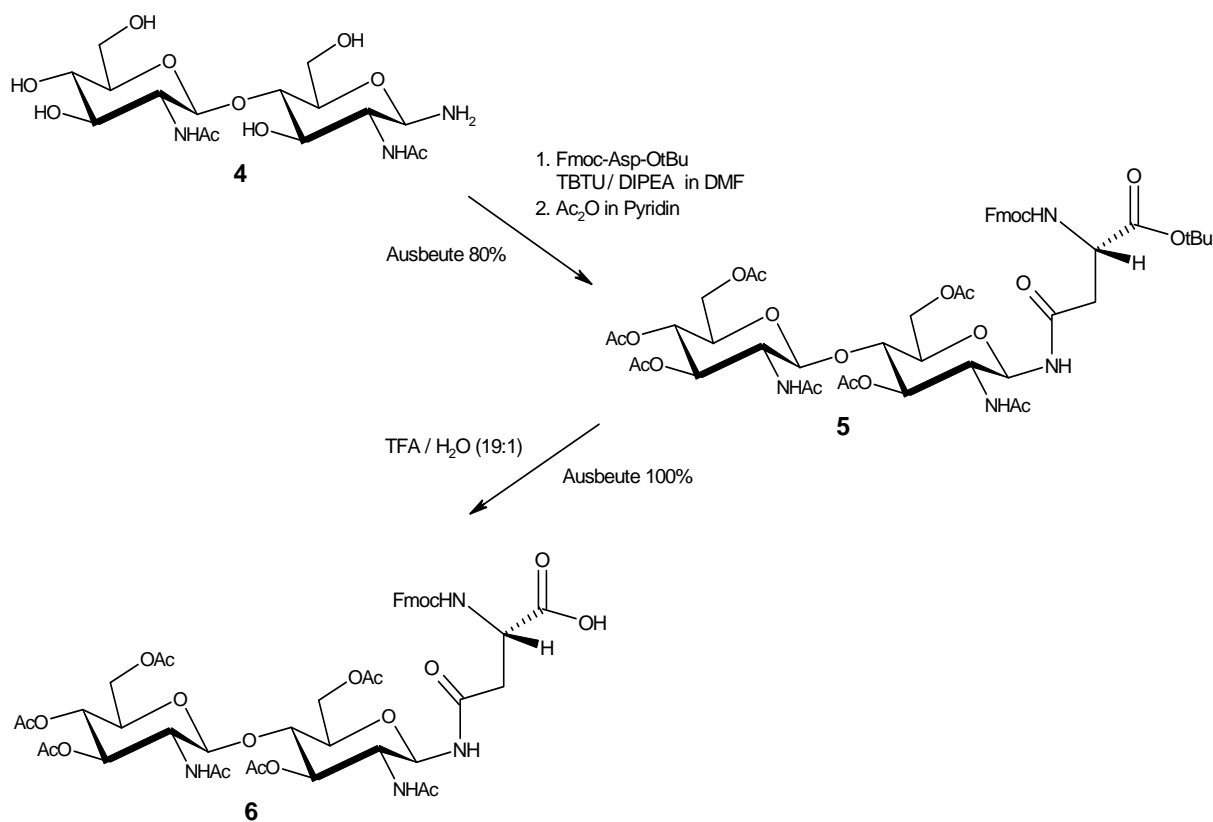


Abbildung 21: Verknüpfung des Chitobiosylamins **4** zum *N*_γ-Chitobiosyl-Asparagin-Baustein **6**.

Es wurde die ungeschützte Aminochitobiose **4** eingesetzt, da acetylierte Aminozucker weniger nukleophil sind. Da bei der Verknüpfung des ungeschützten Glycosylamins **4** mit der Seitenkettencarboxylgruppe der teilweise geschützten Asparaginsäure das Problem bestand, dass diese zu ungewollten Nebenreaktionen an den freien Hydroxylgruppen des Zuckers führte, erwies sich dabei die Umsetzung mit nur 0.9 Äquivalenten des Fmoc-Asp-*O**t*Bu anstelle von 1.2 Äquivalenten bei tieferen Temperaturen als sehr erfolgreich. Dadurch konnten nachfolgende Schwierigkeiten, die in der Aufreinigung des Rohproduktes von **5** begründet lagen, behoben werden, wodurch erhebliche Ausbeuteverluste verhindert werden konnten. Dazu wurde **4** unter Schutzgasatmosphäre mit Fmoc-Asp-*O**t*Bu in Gegenwart des

Ergebnisse und Diskussion

Aktivators TBTU und der Base DIPEA umgesetzt (s. Abbildung 21). Nach einer Reaktionszeit von sechs Stunden bei -15 °C wurde bei 10 °C acetyliert.

Als Aktivator für die der Peptidsynthese vergleichbare Verknüpfung von **4** zum geschützten Baustein **5** wurde TBTU gewählt, da der Einsatz von TBTU am erfolgreichsten verlief, um selektive *N*-Verknüpfung bei hoher Aktivität zu erreichen. Das aus der Festphasenpeptidsynthese bekannte hochreaktive Kupplungsreagenz HATU erwies sich als ein zu starker Aktivator bei der Verknüpfung zum Zuckerbaustein **5**, da es neben der geplanten Verknüpfung zu zahlreichen Nebenreaktionen an den Hydroxylfunktionen des Zuckers kommt. Dagegen erhält man bei der Verwendung des schwachen Aktivators DCC weder *N*- noch *O*-Verknüpfung zwischen Zucker und der Aminosäureseitenkette des Fmoc-Asp-*O*tBu.¹⁷⁸

Aufreinigung des Rohproduktes an Kieselgel mit Hilfe einer Mitteldrucksäule ergab den geschützten Baustein **5** in einer Ausbeute von etwa 80 %. Die *O*tBu-Schutzgruppe des Chitobiosylbausteins **5** lässt sich daraufhin quantitativ unter der Einwirkung einer Mischung aus TFA und Wasser (19:1) entfernen (s. Abbildung 21). Dies bietet den Vorteil der unproblematischen Entfernung der verwendeten Reagenzien sowie des Isobutens im Vakuum. Man erhält auf diese Weise den *N*_γ-Chitobiosyl-Asparagin-Baustein **6**, ohne dass eine weitere Aufreinigung notwendig ist.

Dieser Syntheseweg beinhaltet die Acetylierung der Hydroxylgruppen des Zuckers, um in der anschließenden Peptidsynthese den Einsatz des hochreaktiven Aktivatorreagenzes HATU zu ermöglichen. Die Verwendung von HATU würde ansonsten in der Peptidsynthese zu ungewollten Nebenreaktionen an den freien Hydroxylgruppen des Zuckers führen.

Ausgehend vom Chitobioseoctaacetat **2** ist über die Verbindungen **3**, **4** und **5** der Chitobiosylbaustein **6** mit einer Ausbeute von über 60 % erhältlich. Die höchsten Ausbeuteverluste dieses Syntheseweges lagen dabei in der Umsetzung der Aminochitobiose **4** zum *O*tBu-geschützten Baustein **5**, weshalb sich die Optimierungsversuche hauptsächlich auf diesen Syntheseschritt konzentrierten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieser entscheidende Schritt der direkten Verknüpfung soweit optimiert werden, dass eine effiziente Ausbeute von über 80 % zu erreichen ist. Im Sinne der Ausbeuteoptimierung standen darüber hinaus Versuche, statt einer Kieselgelsäule eine Gelfiltration zur Aufreinigung durchzuführen oder präparative RP-HPLC durchzuführen. Es zeigte sich allerdings, dass die optimal durchgeführte direkte Verknüpfung zu **5** nach den oben beschriebenen Bedingungen wesentlich bedeutsamer für eine gute Ausbeute ist, als eine sehr aufwendige verlaufende Aufreinigung mittels HPLC.

4.2 Synthese von Peptiden und Glycopeptiden

Die Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Peptide und Glycopeptide (s. Abbildung 24) wurde nach dem *continuous flow* Verfahren an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer durchgeführt. Während die Synthese der Peptide dabei voll automatisiert erfolgte, wurden die Glycopeptide mittels einer Kombination aus automatisierter und manueller Festphasensynthese dargestellt.

Als Festphase diente ein mit Polyethylenglycol copolymerisiertes Polystyrolharz, welches einen PAL-Linker trägt, dessen Aminofunktion durch eine Fmoc-Gruppe geschützt ist (s. Abbildung 22). Das Harz bietet dabei den Vorteil, dass es druckstabil ist und ein geringes Quellvermögen besitzt, was für den Einsatz im Peptidsynthesizer von Bedeutung ist.

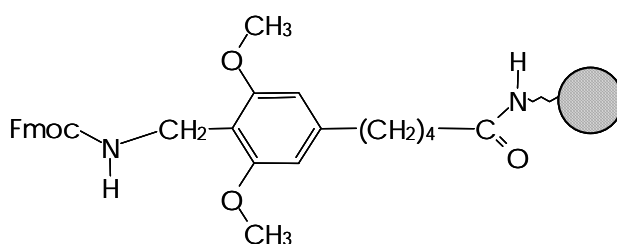


Abbildung 22: Schematische Darstellung des 5-(4-Fmoc-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeriansäure Linkers (Fmoc-PAL-Linker) am Polystyrolharz.

Der Linker und die Synthesebedingungen wurden derart gewählt, dass nach der Darstellung die Peptide und Glycopeptide am N-Terminus nicht acetyliert und am C-Terminus amidiert vorlagen. Die verwendeten Aminosäuren waren an der Aminofunktion Fmoc-geschützt, hatten jedoch eine freie Carboxylgruppe und trugen an den vorhandenen Seitenkettenfunktionalitäten entsprechende Schutzgruppen.

Sowohl zu Beginn der Synthese, als auch innerhalb jedes Synthesezyklus ist es notwendig, die Fmoc-Schutzgruppe der Aminofunktion abzuspalten. Dies erfolgte quantitativ durch die Einwirkung einer Lösung aus Piperidin und DMF (1:4). Wie kinetische Untersuchungen zeigten, ist nach spätestens 10 Minuten die Fmoc-Schutzgruppe vollständig abgespalten. Der Verlauf der Synthesen wurde durch photometrische Messung der Abspaltung bei 301 nm verfolgt. Bei der Synthese im Peptidsynthesizer erfolgte dies automatisch, bei der manuellen Fmoc-Abspaltung wurde das Harz mit einer definierten Menge an Abspaltungslösung bedeckt, die abgesaugten Lösungen entsprechend verdünnt und die Konzentration an abgespaltenem Methylfluoren anhand der gemessenen UV-Absorption berechnet ($\epsilon = 7950 \text{ cm}^2/\text{mol}$).¹⁸¹ Dies liefert eine gute Möglichkeit für die Abschätzung der Kupplungsausbeute.

Für den Einbau der Aminosäuren in die Peptidkette diente der Aktivator TBTU als Kupplungsreagenz, wobei bei der Anknüpfung schwierig zu kuppelnder Aminosäuren der hoch reaktive Aktivator HATU verwendet wurde. Es wurden jeweils vier Äquivalente

Ergebnisse und Diskussion

Aminosäurebaustein und fünf Äquivalente Aktivator und DIPEA als Base in bezug auf die freien Aminofunktionen eingesetzt. Diese hohen Überschüsse ermöglichen Kupplungs- ausbeuten von über 99 %, was eine hohe Homogenität der Produkte zur Folge hat. Um den Ausbeuteverlust, der insbesondere bei längeren Peptidsynthesen auftritt, zu minimieren, wurden Mehrfachkupplungen durchgeführt. Dies bietet insbesondere bei der Glycopeptid- synthese den Vorteil der möglichst quantitativen Verknüpfung der Aminosäuren, um am Ende der Synthese aufwendige Trennungen zu vermeiden. Die Gesamtausbeute einer Synthese läßt sich dabei gegenüber Einfachkupplungen durch Dreifachkupplungen nahezu verdoppeln.

Für den Einbau des kostbaren Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins **6** in die Peptidkette ist es von großer Bedeutung, möglichst mit einem geringen Überschuss an Baustein hohe Kupplungsausbeuten zu erzielen. Bei der Verknüpfung des Bausteins mit der Peptidkette trat als Nebenreaktion die intramolekulare Aspartimidbildung auf, die zum Verlust des Bausteins führte (s. Abbildung 23).¹⁴⁴

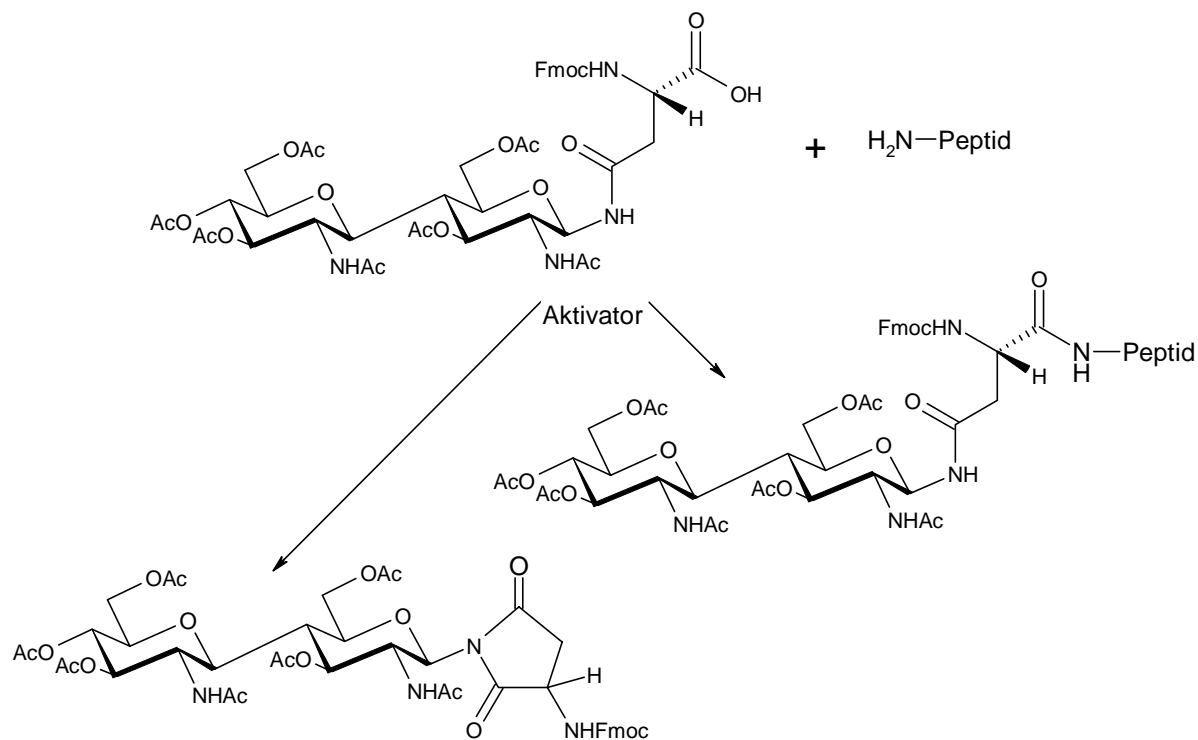


Abbildung 23: Intramolekulare Aspartimidbildung als Nebenreaktion bei der Glycopeptidsynthese.

Für den manuellen Einbau des Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins in die Peptidkette wurde daher als Aktivator TBTU in Gegenwart der Base DIPEA verwendet. Dagegen ist z.B. unter Verwendung des Kupplungsreagenzes DCC nur eine Ausbeute von etwa 10 % zu erreichen.¹⁷⁸ Durch den Einsatz von TBTU bei Feuchtigkeitsausschluss unter Argon- atmosphäre ließ sich die Kupplungsausbeute durch Zweifachkupplungen auf bis zu 90 % optimieren. Es hat sich dabei gezeigt, dass eine optimale Glycosylaminosäurekupplung zu erzielen ist, wenn bei einer längeren Kupplungszeit von mindestens sechs Stunden das

Verhältnis von Baustein zu Aktivator und Base 4:5:5 beträgt, wobei 1.5 Äquivalente des Bausteins bezüglich der freien Aminofunktionen eingesetzt wurden. Der in trockenem DMF gelöste Glycosylbaustein wurde dabei getrennt von TBTU und DIPEA ohne Voraktivierungszeit auf das Harz gegeben, um die oben genannte Aspartimidbildung zu verhindern.

Da die Kupplungsreaktionen in der Regel nicht quantitativ verlaufen, wurden nach jedem Kupplungsschritt nicht umgesetzte Aminogruppen mittels einer 10 %igen Lösung von Acetanhydrid in DMF acetyliert. Dieser *Capping*-Schritt verhindert, dass nach beendeter Synthese eine Vielzahl von Nebenprodukten mit Deletionsstellen vorliegt, was die nachfolgende Aufreinigung erheblich erschweren würde.

Die *O*-Deacetylierung des an der Festphase befindlichen und am Zuckerteil peracetylierten Glycopeptids erfolgte selektiv mit Hilfe von Hydrazinhydrat in abs. Methanol (1:5) innerhalb von sechs Stunden.¹⁸² Diese Vorgehensweise hat den Vorteil der Reinigung des Glycopeptides an der Festphase durch einfaches Waschen ohne Ausbeuteverluste. Darüber hinaus besteht allerdings auch die Möglichkeit, die *O*-Deacetylierung der Glycopeptide in Lösung durchzuführen. Dazu ist zunächst das Glycopeptid von der Festphase abzuspalten und anschließend durch HPLC zu reinigen, um es dann mittels einer einprozentigen Natriummethanolatlösung zu deacetylieren und nochmals aufzureinigen.

Die quantitative Entschützung und Abspaltung der Peptide und Glycopeptide vom Harz wurde manuell durch Einwirkung einer Lösung aus TFA/TIPS/Wasser 95:5:2 innerhalb von 90 Minuten erreicht. In der Literatur findet man verschiedene Nucleophile (z.B. 1,2-Ethandithiol und Phenol), die der Abspaltung zugesetzt werden, um eine quantitative Entschützung zu erzielen.¹⁸² Diese zugesetzten Nucleophile sind notwendig, wenn durch das obige Abspaltreagenz bestimmte Schutzgruppen nicht vollständig entfernt werden können. Da allerdings derartige Abspaltlösungen mit Zusatz von 1,2-Ethandithiol oder Phenol unter den stark sauren Abspaltbedingungen bei Glycopeptiden auch die Abspaltung des Zuckers vom Peptid bzw. Anomerisierung bewirken können, wurde darauf verzichtet. Aus diesem Grund musste als Schutzgruppe für das Arginin die Pbf-Gruppe (2,2,5,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl) verwendet werden. Dies hat den Vorteil, dass sie sich ohne den Zusatz weiterer Nucleophile quantitativ entfernen lässt. Darüber hinaus wurden, abgesehen von Fmoc-L-Cys(S*t*Bu)-OH, ausschließlich Aminosäurederivate eingesetzt, deren Seitenkettenschutzgruppen eine vollständige Entfernung auch ohne zusätzliche *scavenger* zulassen.

Aufgrund der leichten Oxidierbarkeit der freien Thiolfunktionen an den Cysteinen erfolgt bereits in Gegenwart von Luftsauerstoff Disulfidverbrückung. Unter den Standardabspaltbedingungen liegen die offenkettigen Verbindungen in hohen Konzentrationen vor, so dass die Anwesenheit von Luftsauerstoff zu ungewollten intermolekularen Reaktionen führt. Durch Ausschluss von Sauerstoff während der Abspaltung von der Festphase konnte bei den

Ergebnisse und Diskussion

dargestellten zyklischen Verbindungen anhand MALDI-TOF-spektrometrischer Verfolgung das entsprechende offenkettige Dithiol jeweils als Hauptprodukt identifiziert werden. Bei der anschließenden Oxidation unter Ausbildung einer Disulfidbrücke müssen die Bedingungen derart gewählt werden, dass die Wahrscheinlichkeit für eine intramolekulare Zyklisierung wesentlich höher ist als für eine unerwünschte intermolekulare Polymerisation. Dies wird durch Zyklisierung in entsprechend hoher Verdünnung erreicht, indem das Dithiol in einer Konzentration von mindestens 50 mL pro 1 μ mol Harzäquivalent in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung unter Schutzgasatmosphäre gelöst und im Anschluss in Gegenwart von Luftsauerstoff 24 Stunden gerührt wurde. Nach Abtrennung der Salze mittels Ultrafiltration ermöglicht die Aufnahme von MALDI-TOF-Spektren aus den Rohprodukten den Nachweis für die Zyklisierung.

4.2.1 Übersicht über die synthetisierten Peptide und Glycopeptide

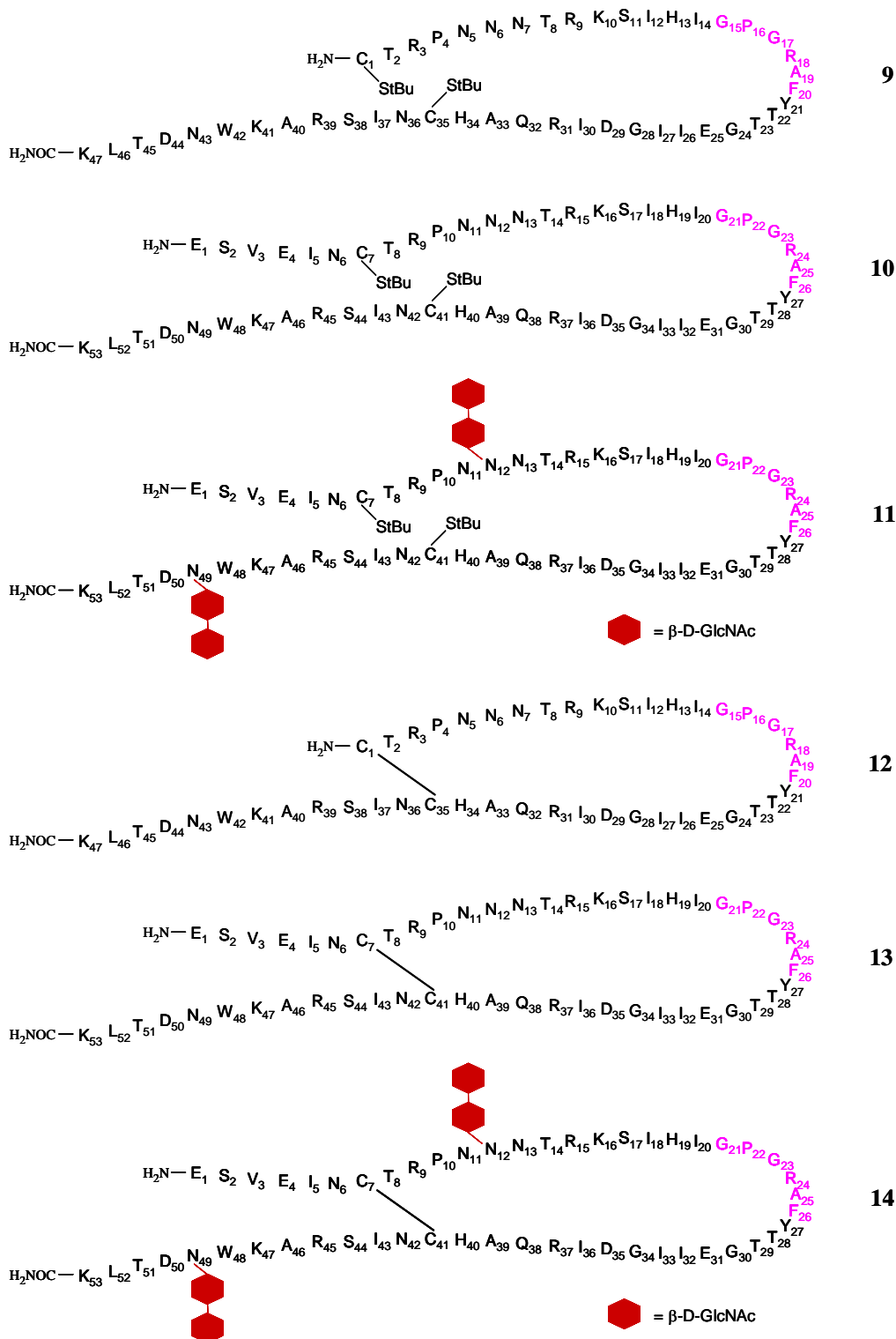


Abbildung 24: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten V3-Verbindungen. Dabei handelt es sich um das offenkettige 47er-Peptid 9, das offenkettige 53er-Peptid 10 und das entsprechende offenkettige Glycopeptid 11, sowie das zyklische 47er-Peptid 12, das zyklische 53er-Peptid 13 und das entsprechende zyklische Glycopeptid 14.

4.2.2 Versuche zur Synthese in Nachbarschaft zum Cystein glycosylierter zyklisierter V3-Verbindungen

Zur genaueren Charakterisierung des Bindungsepitops der HIV/CCR5-Interaktion sollte insbesondere der Einfluss der Zyklisierung und Glycosylierung von erweiterten V3-Loops des gp120 auf eine verbesserte Bindungsaffinität zum humanen CCR5-Rezeptor untersucht werden. Dazu wurde zur Synthese von erweiterten V3-Verbindungen der Nordamerikanischen Konsensussequenz zunächst die Darstellung des in Abbildung 25 gezeigten zyklisierten 53er-Glycopeptids mit vier Chitobiosylglycosylierungen versucht, welches die Glycosylierung der beiden Asparagine in direkter Nachbarschaft zu den Cysteinen beinhaltet.

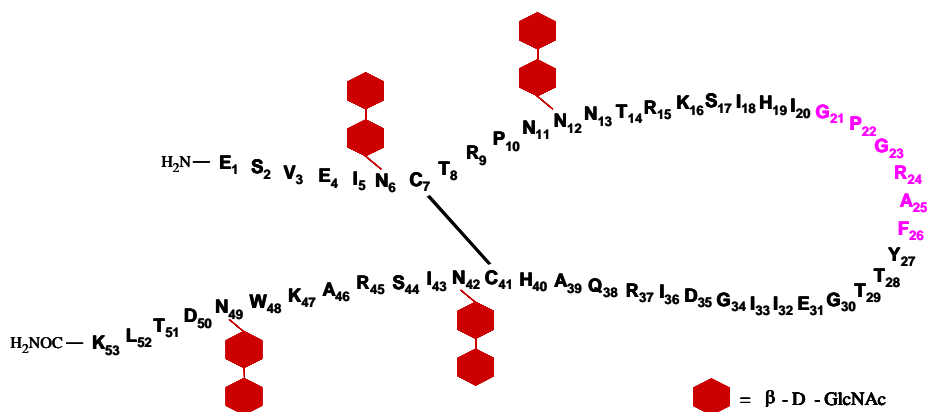


Abbildung 25: Schematische Darstellung des vierfach glycosylierten zyklischen 53er-Glycopeptids **7**.

Im natürlichen gp120 ist dabei die Glycosylierungssituation der Asparagine direkt an den Cysteinen, die die Disulfidbrücke der V3-Loop bilden, weiterhin unklar.⁴¹ Asparagine, die eine *N*-glycosidische Bindung tragen können, müssen C-terminal zwei Positionen weiter ein Serin oder Threonin tragen, also die Sequenz N-X-S/T beinhalten. Jedoch sollen laut Literaturdaten Segmente der Sequenz N-C-S/T vermutlich nicht gleichzeitig glycosyliert und zyklisiert vorliegen, also zumindest die Position direkt am N-terminalen Cystein der zyklisierten V3 nicht glycosyliert sein. Dagegen sollte entsprechend der vorliegenden Sequenz im biologischen System eine Glycosylierung am C-terminalen Cystein der zyklisierten V3-Loop möglich sein. Allerdings sollen laut Literatur beide Asparagine direkt an den Cysteinen nicht glycosyliert vorliegen, jedoch weist die in der Röntgenkristallstruktur beobachtete hohe Elektronendichte an den Stickstoffatomen der Asparaginseitenketten auf eine vorliegende Glycosylierung hin.^{29,41}

Das 53er-Glycopeptid **7** wurde mittels einer Kombination aus automatisierter und manueller Festphasensynthese am Harz aufgebaut. Diese Syntheseversuche (s. Tabelle 1) wurden aufgrund von Schwierigkeiten, welche bei dem Versuch der Zyklisierung auftraten, zweimal durchgeführt. Die aus diesen Syntheseversuchen gewonnenen und im Folgenden kurz diskutierten Erkenntnisse über die Kupplungseffektivität der einzelnen Kupplungsschritte, konnten dabei für spätere erfolgreiche Synthesen genutzt werden, um optimale Ausbeuten zu erreichen.

Ergebnisse und Diskussion

	Kupplung der ersten 4 AS	Kupplung des 1. Bausteins	Kupplung von 6 AS	Kupplung des 2. Bausteins	Kupplung weiterer 14 AS
Synthese 1:	automatisiert	manuell	automatisiert	manuell	automatisiert
Kupplung	3x120 min	2x24 std	3x120 min	2x24 std	3x90 min
Überschuss	Vierfach	je 1.0 eq	Vierfach	je 1.0 eq	Vierfach
Verhältnis	4/5/5	1/1.5/1.5	4/5/5	1/1.5/1.5	4/5/5
Aktivator	HATU	TBTU	HATU	TBTU	HATU
Ausbeute	98 %	83 %	96 %	74 %	90 %
Synthese 2:	automatisiert	manuell	manuell	manuell	automatisiert
Kupplung	3x120 min	2x24 std	3x3 std	2x24 std	3x90 min
Überschuss	Vierfach	je 1.0 eq	Vierfach	je 1.0 eq	Vierfach
Verhältnis	4/5/5	1/1/1	4/5/5	1/1/1	4/5/5
Aktivator	HATU	TBTU	HATU	TBTU	HATU
Ausbeute	94 %	74 %	100 %	58 %	85 %

	Kupplung weiterer 15 AS	Kupplung des 3. Bausteins	Kupplung von 5 AS	Kupplung des 4. Bausteins	Kupplung weiterer 5 AS
Synthese 1:	automatisiert	manuell	manuell	manuell	manuell
Kupplung	3x90 min	2x24 std	3x3 std	2x24 std	3x3 std
Überschuss	Vierfach	je 1.2 eq	Achtfach	je 1.5 eq	Achtfach
Verhältnis	4/5/5	1/1.5/1.5	4/5/5	1/1.5/1.5	4/5/5
Aktivator	HATU	TBTU	HATU	TBTU	HATU
Ausbeute	59 %	65 %	100 %	75 %	100 %
Synthese 2:	automatisiert	manuell	manuell	manuell	manuell
Kupplung	3x90 min	2x24 std	3x3 std	2x24 std	3x3 std
Überschuss	Vierfach	0.8 / 1.6 eq	Achtfach	1.2 / 1.6 eq	Achtfach
Verhältnis	4/5/5	1/1.5/1.5	4/5/5	1/1.5/1.5	4/5/5
Aktivator	HATU	TBTU	HATU	TBTU	HATU
Ausbeute	64 %	67 %	100 %	85 %	100 %

Tabelle 1: Kupplungsbedingungen zur Synthese des Glycopeptids 7.

Vom C-Terminus ausgehend erfolgte jeweils die Anknüpfung der ersten vier Aminosäuren automatisiert mittels Dreifachkupplungen an der Festphase. Wie das automatische Fmoc-Monitoring zeigte, war im Wesentlichen die Kupplung der ersten Aminosäure Lysin-53 direkt an das Harz für eine Ausbeuteverringering verantwortlich. Eine Verbesserung dieser häufig schwierigen ersten Kupplung wäre hier sicherlich durch manuelle Durchführung zu erreichen.

Die anschließende Verknüpfung des ersten Chitobiosylasparagin-Bausteins **6** wurde jeweils manuell mittels Zweifachkupplung unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Es wurde dabei

Ergebnisse und Diskussion

je 1.0 eq des Bausteins eingesetzt. Es hat sich bei Synthese 1 gezeigt, dass mit 83 % Ausbeute eine Optimierung der Glycosylierung erreicht wird, wenn ein Verhältnis von Baustein zu Aktivator und Base unter Feuchtigkeitsausschluss von 1.0/1.5/1.5 verwendet wird. Für die Kupplung wurde der in DMF gelöste Baustein dabei getrennt von TBTU und DIPEA ohne Voraktivierungszeit auf das Harz gegeben, um die intramolekulare Succinimidbildung zu verhindern. Dagegen lieferte die Synthese 2 bei einem eingesetzten Verhältnis von 1/1/1 eine erheblich schlechtere Kupplungsausbeute von 74 %.

Die weitere Anknüpfung von sechs Aminosäuren bei Synthese 1 lieferte trotz langer Kupplungszeit nur eine Ausbeute von 96 %. Die Analyse des automatischen *Fmoc-Monitoring* zeigte, dass die Kupplung von Tryptophan-48 an das glycosylierte Asparagin-49, sowie das nachfolgende Lysin-47 erheblich schlechter verlaufen waren. In Synthese 2 wurde daraufhin die Kupplung der sechs Aminosäuren inklusive dieser beiden schwierig zu verknüpfenden Aminosäuren manuell in einer Dreifachkupplung von je drei Stunden durchgeführt. Die photometrische Bestimmung der Ausbeute nach jedem Kupplungsschritt durch Messung der UV-Absorption des in der Abspaltlösung enthaltenen Methylenfluorens ergab nahezu quantitative Ausbeuten in diesen sechs Kupplungsschritten. Die manuell durchgeführte Anknüpfung von Aminosäuren verläuft natürlich effektiver als die Automatisierung im Synthesizer, jedoch ist sie ungleich zeitaufwendiger, stellt allerdings für bekannt schwierig zu kuppelnde Aminosäuren eine günstige Alternative dar.

Die zweite Glycosylkupplung wurde jeweils entsprechend der zuvor beschriebenen manuellen Anknüpfung des ersten Glycosylbausteins durchgeführt. Sie zeigte für die Synthese 1 bei einem eingesetzten Reaktandenverhältnis von 1.0/1.5/1.5 mit 74 % Ausbeute ebenso eine erfolgreichere Glycosylierung als bei Synthese 2 mit nur 58 % Kupplungsausbeute bei einem Verhältnis von 1/1/1.

Ferner wurde nach der zweiten Glycosylkupplung die automatisierte Anknüpfung weiterer 29 Aminosäuren in zwei Syntheseschritte gesplittet, um zu verhindern, dass die umzusetzenden Aminosäuren für mehrere Tage im Synthesizer stehen. Einerseits unterliegen sie z.T. einer langsamen Zersetzung, andererseits kondensiert je nach Temperatur und Luftfeuchtigkeit Wasser in die Aminosäurederivate. Dies ist insbesondere bei langen Peptidsynthesen zu vermeiden, da dies durch Inaktivierung des Aktivators erheblich die jeweiligen Kupplungsausbeuten senkt, was sich drastisch auf die Gesamtausbeute auswirkt. Wie die photometrische Bestimmung der Ausbeuten ergab, lieferte mit 90 % bzw. 85 % jeweils der erste Syntheseabschnitt von 14 Aminosäuren unter gleichen Bedingungen von Cystein-41 bis Threonin-28 eine wesentlich höhere Ausbeute von jeweils 99 % pro Kupplungsschritt. Dagegen ergab der zweite Teil von 15 Aminosäuren von Tyrosin-27 bis Asparagin-13 unter gleichen Synthesebedingungen mit 59 % bzw. 64 % erheblich schlechtere Ausbeuten von jeweils 97 % pro Kupplungsschritt. Die Analyse des automatischen *Fmoc-Monitoring* bestätigte dies. Es zeigte für die Anknüpfung der 29 Aminosäuren, dass im Wesentlichen die

Kupplung von Tyrosin-27 bis Arginin-24, sowie die Kupplung von Histidin-19, Lysin-16, Arginin-15 und Asparagin-13 aus dem zweiten Syntheseabschnitt nur mit schlechten Ausbeuten durchführbar war. Der Einbruch der Ausbeuten an diesen Positionen könnte in der Ausbildung einer für die weitere Kupplung ungünstigen Sekundärstruktur begründet liegen.

Die manuelle Kupplung des dritten Chitobiosylasparagin-Bausteins **6** ergab für beide Synthesen trotz optimierter Bedingungen nur mäßige Glycosylierungsausbeuten von 65 % bzw. 67 %. Dies stellte den mit Abstand schlechtesten Glycosylierungserfolg unter den beschriebenen Synthesebedingungen dar und trat für beide Synthesen an dieser Position auf. Daher ist zu vermuten, dass die unbefriedigende Kupplung an dieser Syntheseposition auf eine für die Kupplung ungünstige Faltung der Peptidketten am Harz zurückzuführen ist. Zusätzlich führen sterische Hinderungen durch den vergleichsweise voluminösen Kohlenhydratteil der glycosylierten Aminosäure zu Ausbeuteverlusten.

Die folgenden fünf Aminosäuren Asparagin-11 bis Cystein-7 wurden jeweils manuell mittels Dreifachkupplung mit je drei Stunden Dauer gekuppelt. Dabei wurde der Aminosäureüberschuss auf das Achtfache verdoppelt, um bei dem vorliegenden großen Harzvolumen einer zu starken Verdünnung des Reaktionsgemisches entgegenzuwirken. Die photometrische Verfolgung der Ausbeute nach jedem Kupplungsschritt ergab nahezu quantitative Ausbeuten in diesen fünf Kupplungsschritten.

Die letzte Glycokupplung wurde jeweils manuell entsprechend der optimierten Synthesebedingungen durchgeführt und lieferte mit 75 % bzw. 85 % Ausbeute eine erfolgreiche Glycosylierung. Mit abnehmender Anzahl reaktiver Aminogruppen bietet es sich an, den Überschuss an Glycosylbaustein zu erhöhen, um eine genügend hohe Konzentration aufrecht zu erhalten. Natürlich ist die Aussicht auf hohe Glycosylierungsausbeute umso besser, je mehr Äquivalente der glycosylierten Aminosäure umgesetzt werden. Es hat sich gezeigt, dass eine Zweifachkupplung effektiver verläuft, wenn anstelle eines zweimaligen Einsatzes mittlerer Äquivalente zunächst eine geringere Menge an Baustein und bei der zweiten Kupplung ein höherer Überschuss eingesetzt wird.

Die abschließende Anknüpfung der letzten fünf Aminosäuren wurde jeweils entsprechend der zuvor beschriebenen manuellen Kupplung durchgeführt und verlief quantitativ.

Die Synthesen lieferten laut Fmoc-Bestimmung 15 bzw. 14 μmol am Harz befindliches Glycopeptid. Entsprechend den beschriebenen Standardbedingungen wurde deacetyliert und unter Ausschluss von Sauerstoff von der Festphase abgespalten. Anschließend wurden die Rohprodukte mit einer 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung wie folgt beschrieben verdünnt und oxidativ zyklisiert. Es wurde versucht, das Fortschreiten der Entschützung und die anschließende Zyklisierung massenspektrometrisch zu verfolgen. Dazu wurde jeweils nach verschiedenen Zeitabständen eine Probe aus dem Reaktionsgemisch entnommen und nach vorheriger Entsalzung mittels C_{18} -Pipettenspitzen via MALDI-TOF-MS vermessen. Dieses Vorhaben schlug allerdings fehl. Es konnte weder Edukt noch zyklisiertes Produkt

detektiert werden. Das Problem bei der massenspektrometrischen Vermessung dieser mehrfach glycosylierten Verbindungen ist, dass sie äußerst schlecht im MALDI desorbieren und sie außerdem nur in geringen Anteilen vorliegen, so dass ein definitiver Nachweis des Zielproduktes erst bei der chromatographischen Aufreinigung und somit der Aufkonzentrierung erfolgen kann.

Die oxidative Knüpfung der Disulfidbrücke des Glycopeptids **7** wurde in drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt, um optimale Reaktionsbedingungen zu ermitteln, wobei die Zyklisierungsbedingungen hinsichtlich der Verdünnung, der Dauer der Zyklisierung, sowie der Oxidationsbedingungen variiert wurden. Dazu wurden die 15 μmol der Synthese 1 im ersten Versuch auf 3 L Zyklisierungslösung (5 μM) verdünnt. Die Disulfidverbrückung wurde dann durch Luftoxidation über 24 Stunden durchgeführt. Nach Ultrafiltration erwies sich der gefriergetrocknete Rückstand allerdings als extrem wasserunlöslich. Das lässt darauf schließen, dass während der Ultrafiltration aufgrund der Aufkonzentrierung Polymerisation durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung auftrat. Möglicherweise war die Dauer der Zyklisierung zu kurz oder die Lösung war noch zu konzentriert, was hinsichtlich der Erfahrungswerte eher unwahrscheinlich ist. Deshalb wurde in einem zweiten Versuch die Hälfte der Synthese 2 von 7 μmol in 1.5 L Lösung (4.7 μM) für 48 Stunden durch Luftoxidation zyklisiert. Aber auch hier blieb nach Ultrafiltration anstelle eines weißen Lyophilisates ein weißgelbes, unlösliches Polymerisat zurück. Im dritten Zyklisierungsversuch wurden daher weitere 7 μmol der Synthese 2 in extremer Verdünnung von 2.3 μM mittels Luftsauerstoff unter Zusatz von 1 Volumenprozent DMSO für vier Tage zyklisiert, was für die glycosidischen Bindungen unproblematisch sein sollte. Nach der Ultrafiltration wurde eine geringe Menge weißliches Lyophilisat erhalten. Das gefriergetrocknete Produkt bestand allerdings aus einem schwer wasserlöslichen Granulat. Bei dem Versuch, das Rohprodukt mit Hilfe von GPC und *RP*-HPLC aufzureinigen, konnte das Glycopeptid **7** weder im MALDI-TOF-Spektrum noch mittels ESI-LC-MS nachgewiesen werden. Es konnte nicht geklärt werden, ob zyklisiertes Produkt entstanden ist, dieses jedoch im Rahmen der sehr niedrigen Zyklisierungsausbeute aufgrund der geringen Konzentration im Produktgemisch nicht nachgewiesen werden konnte. Die untypische Konsistenz des Lyophilisates lässt vermuten, dass es aller Wahrscheinlichkeit nach bei der Aufkonzentrierung der Peptidlösung wiederum zu einer Polymerisationsreaktion kam. Hierfür spricht auch die schwere Wasserlöslichkeit.

Die Synthesen des zyklischen Glycopeptids **7** verliefen bis zur Abspaltung von der Festphase den Erwartungen entsprechend, denn nach der Entfernung der Abspaltlösung im Vakuum war eine erhebliche Menge weißes Rohprodukt vorhanden und auch die manuelle Fmoc-Bestimmung der endständigen Aminofunktionen spricht dafür, dass bis an diese Stelle die Synthesen erfolgreich verliefen. Die Problematik liegt somit in der nachfolgenden Knüpfung der Disulfidbrücke. Es stellte sich nun die Frage, ob die Zyklisierung nicht gelang, da

möglicherweise die beiden Glycosylierungen der Asparagine direkt an den zu verbrückenden Cysteinen die Zyklisierung der Loop sterisch behindern oder ob es prinzipiell an der Sequenz liegt. Da sich jedoch das korrespondierende Glycopeptid **14** unter gleichen Bedingungen problemlos in guten Ausbeuten zyklisieren ließ (s. 4.2.9), muss von keinem speziellen sequenzbedingten Problem ausgegangen werden. Dies würde bedeuten, dass die Syntheseprobleme vielmehr an den Glycosylierungen liegen.

Um herauszufinden, ob die Schwierigkeiten bei den beschriebenen Zyklisierungen von einer oder beiden Glycosylierungen direkt an den Cysteinen herrühren, wurde die Darstellung des in Abbildung 26 gezeigten zyklisierten 47er-Glycopeptids mit drei Chitobiosylglycosylierungen versucht, welches nur am Asparagin direkt benachbart zum C-terminalen Cystein glycosyliert ist.

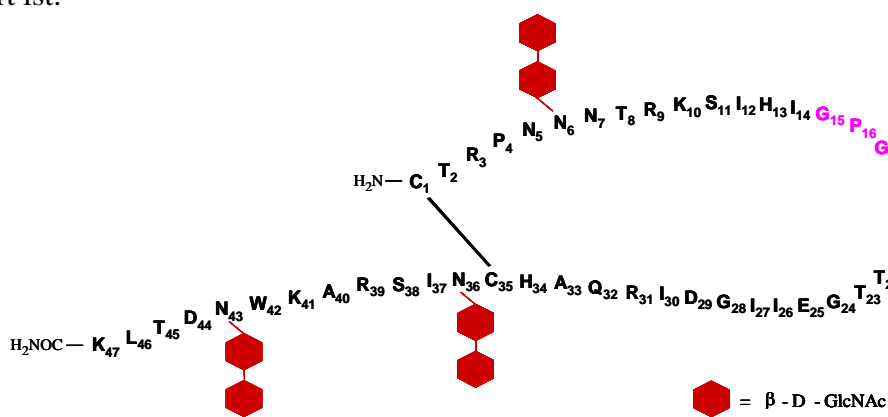


Abbildung 26: Schematische Darstellung des dreifach glycosylierten zyklischen 47er-Glycopeptids **8**.

Das 47er-Glycopeptid **8** wurde mittels einer Kombination aus automatisierter und manueller Festphasensynthese am Harz aufgebaut. Da die Kupplungsbedingungen dieser Synthese die Erkenntnisse aus den vorherigen Synthesen bestätigen, wird hier im Folgenden nicht weiter darauf eingegangen. Die Synthese lieferte laut Fmoc-Bestimmung 16 μmol am Harz befindliches Glycopeptid. Entsprechend den beschriebenen Standardbedingungen wurde deacetyliert und unter Ausschluss von Sauerstoff von der Festphase abgespalten. Anschließend wurde das Rohprodukt mit einer 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf 5.3 μmol verdünnt und mittels Luftsauerstoff und einer Glasfritte unter Zusatz von 1 Volumenprozent DMSO für vier Tage oxidativ zyklisiert. Aber auch hier blieb nach Ultrafiltration anstelle eines weißen Lyophilisates eine geringe Menge weißgelbes, schwer wasserlösliches, körniges Granulat zurück. Bei dem Versuch, das Rohprodukt mit Hilfe von GPC und *RP*-HPLC aufzureinigen, konnte das Glycopeptid **8** weder im MALDI-TOF-Spektrum noch mittels ESI-LC-MS nachgewiesen werden. Die Übereinstimmung mit den Synthesergebnissen des Glycopeptids **7** lässt darauf schließen, dass aller Wahrscheinlichkeit nach wiederum keine Zyklisierung zustande gekommen ist und es bei der Aufkonzentrierung der Peptidlösung daraufhin zu einer Polymerisationsreaktion kam.

Der Misserfolg der Zyklisierung des an beiden Cysteinen glycosylierten Glycopeptids **7** stimmt mit dem biologischen System überein, nachdem Segmente der Sequenz N-C-S/T nicht gleichzeitig glycosyliert und zyklisiert vorliegen. Zumindest also die Position direkt am N-terminalen Cystein der zyklisierten V3 demnach nicht glycosyliert vorliegt. Dass jedoch die Zyklisierung des Glycopeptids **8** nicht erfolgreich verlief, das an diesem Cystein nicht glycosyliert ist, ist zunächst verwunderlich, weil eine Glycosylierung am C-terminalen Cystein der zyklisierten Loop zumindest im biologischen System möglich sein sollte. Die vorliegenden Syntheseergebnisse legen allerdings den Schluss nahe, dass beide Glycosylierungen der Asparagine benachbart zu den Cysteinen die Zyklisierung der V3 behindern. Die Zucker scheinen unter den hier vorliegenden Synthesebedingungen die Zyklisierung sterisch zu blockieren, dass bei späterer Einengung der Lösung die Neigung zur intermolekularen Disulfidverbrückung stark ansteigt, was letztendlich zur unkontrollierten Polymerisation führt. Laut Literaturdaten sollen beide Asparagine direkt an den Cysteinen nicht glycosyliert vorliegen, obwohl die in der Röntgenkristallstruktur beobachtete hohe Elektronendichte an den Stickstoffatomen der Asparaginseitenketten auf eine vorliegende Glycosylierung hinweist.^{29,41}

Auf weitere Versuche wurde hinsichtlich des erheblichen Aufwandes derartiger Synthesen mehrfach glycosylierter Verbindungen verzichtet. In den folgenden Glycopeptidsynthesen wurden beide Glycosylierungen in direkter Nachbarschaft zu den Cysteinen weggelassen.

4.2.3 Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen verkürzten V3-Peptides **9**

Das offenkettige Referenzpeptid **9** (s. Abbildung 27) wurde synthetisiert als Vergleichssubstanz gegenüber der entsprechenden zyklisierten Verbindung **12** (s. 4.2.7) hinsichtlich des Einflusses der Zyklisierung auf konformative Änderungen, sowie auf Änderungen der Bindungsaffinität bzgl. der CCR5-Korezeptorspezifität.

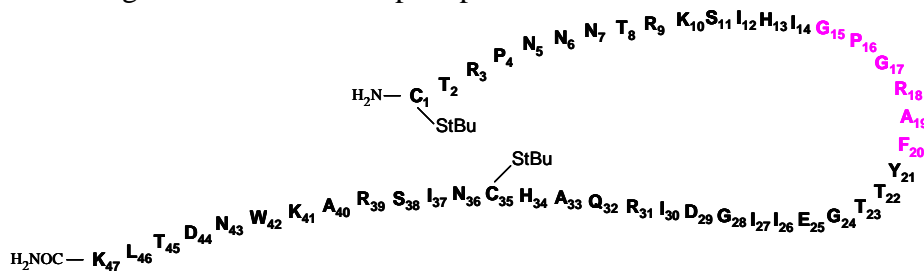


Abbildung 27: Schematische Darstellung des unglycosylierten offenkettigen 47er-Peptids **9**.

Das 47er-Peptid wurde komplett in einer vollautomatischen Synthese mittels Dreifachkupplungen unter TBTU Aktivierung an der Festphase aufgebaut. Über alle 47 Kupplungsschritte konnte nach Fmoc-Abspaltung eine Rohausbeute von 65 % erzielt werden. Dies zeigt, dass TBTU gegenüber dem zuvor eingesetzten Reagenz HATU ebenso gute Kupplungsergebnisse liefert, darüber hinaus aber um einiges kostengünstiger ist. Wie die

Ergebnisse und Diskussion

photometrische Bestimmung der Kupplungsausbeute ergab, lieferte dabei mit 89 % der erste Syntheseabschnitt von 26 Aminosäuren von Lysin-47 bis Threonin-22 unter gleichen Bedingungen eine wesentlich höhere Ausbeute als die Kupplung der folgenden 21 Aminosäuren von Tyrosin-21 bis Cystein-1 mit 73 %. Dies bestätigt vorherige Syntheseergebnisse (s. 4.2.2), dass im Wesentlichen der N-terminale Strang der V3-Loop schlechter zu kuppelnde Synthesepositionen beinhaltet, was für die Ausbildung einer für die Kupplung ungünstigen Sekundärstruktur spricht.

Bei dieser Synthese wurden *S*tBu-seitenkettengeschützte Cysteine eingesetzt, die unter den vorliegenden Abspaltbedingungen nicht zusammen mit allen anderen Aminosäuren entschützt wurden. Dies ermöglicht den Zugang zu entsprechenden offenkettigen Verbindungen ohne die Aminosäuresequenz zu verändern. Die Verwendung orthogonal zu entfernender Schutzgruppen verspricht darüber hinaus „im Erfolgsfall“, dass nach Aufreinigung des Rohproduktes durch selektive Entfernung auch das zyklisierte Produkt erhalten werden kann (s. 2.1 und 4.2.5).

Nach Abspaltung von der Festphase wurde die Lösung des offenkettigen Rohproduktes ultrafiltriert, um vor der chromatographischen Aufreinigung bereits kürzere Abbruchpeptide abzutrennen. Dies zeigte sich als besonders vorteilhaft, da es die nachfolgende HPLC-Trennung enorm erleichterte. Das unglycosylierte, lineare V3-Peptid **9** wurde daraufhin in einer Ausbeute von 2.8 % erhalten. Wie ein Vergleich mit dem korrespondierenden Zylopeptid **12** zeigt (s. 4.2.7), resultierte in dessen Synthese trotz einer geringeren Kupplungsausbeute eine höhere Gesamtausbeute. Aufgrund der Disulfidverbrückung des V3-Peptides und des Abreagierens der freien Cystein-Abbruchpeptide verlief dort offensichtlich die Aufreinigung erheblich effektiver.

Die Identität des offenkettigen Peptids **9** (MW = 5497.80 g/mol) wurde zunächst durch die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums durch ein $[M+H]^+$ -Signal von $m/z = 5498.66$ bestätigt.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte anhand von 2D-NMR-Experimenten. In der NH-Region des TOCSY-Spektrums konnten 44 NH-Spuren der amidischen Protonen im Bereich von 7.962 bis 8.587 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (s. Abbildung 28).

Ergebnisse und Diskussion

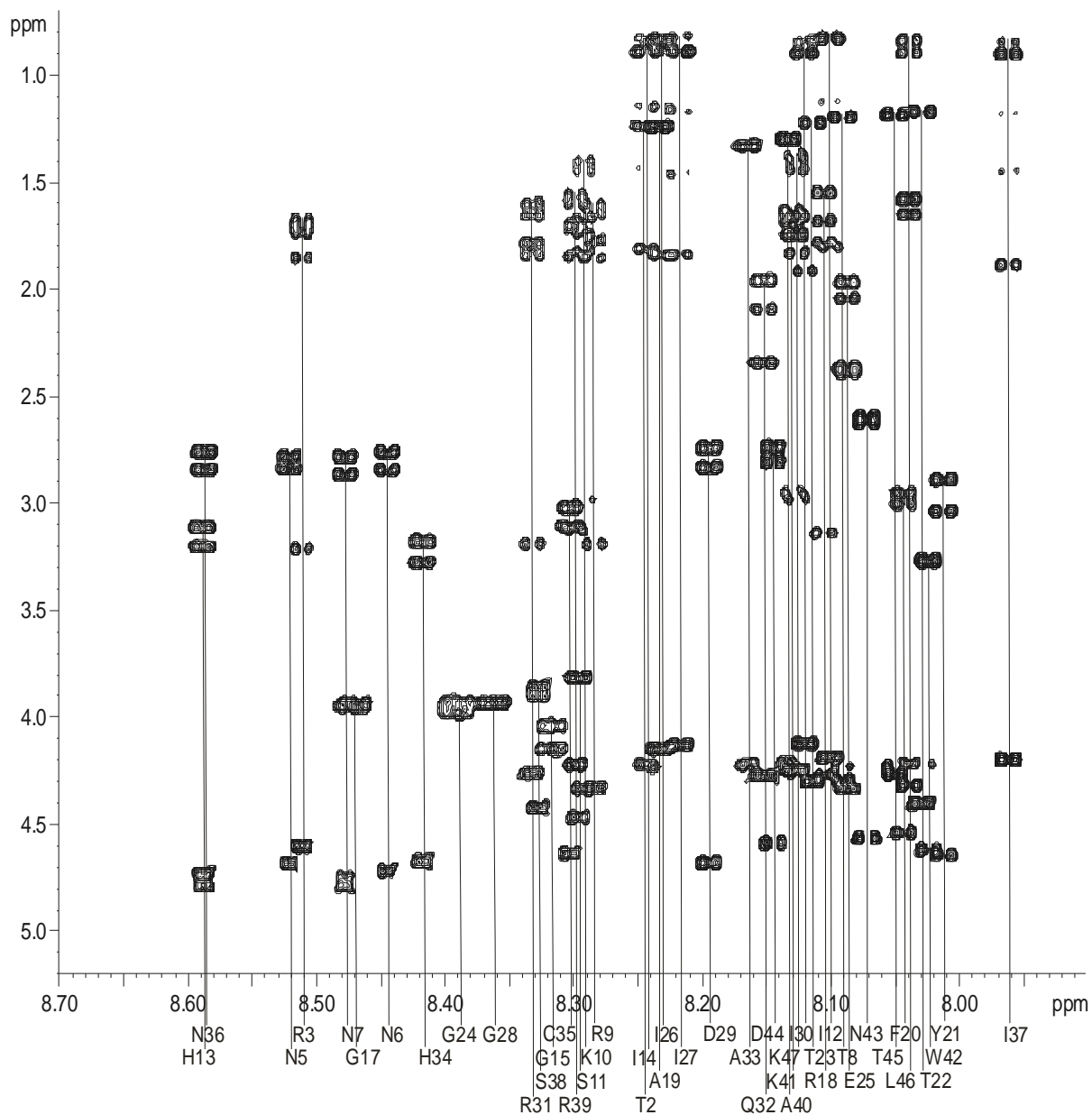


Abbildung 28: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des unglycosylierten offenkettigen 47er-Peptids 9. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

In der Sequenz sind zwei Proline enthalten, die naturgemäß keine amidischen Protonen tragen. Aus den CH_α-Spuren der beiden Proline bei 4.437 ppm und 4.462 ppm konnten die Protonen eindeutig zugeordnet werden. Ebenso sind die Protonen der freien Aminogruppe des N-terminalen Cysteins aufgrund von Austauschprozessen dort nicht sichtbar, welche jedoch bei 4.739 ppm anhand ihrer CH_α-Spur zugeordnet werden konnten. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren (Nachbarschafts-NOEs) in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmung der ³J_{HNHα}-Kopplungskonstanten erfolgte anhand eines DQF-COSY-Spektrums. Die ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen und die ³J_{HNHα}-Kopplungskonstanten sind in Tabelle 18 angegeben (s. 7.3.1).

Die Analyse des NOESY-Spektrums kann Auskünfte über eine vorhandene Sekundärstruktur eines Peptides geben.¹⁵⁴ Die Untersuchung der strukturelevanten NOE-Kontakte ergab nur sequenzielle NOE-Kontakte zwischen den amidischen Protonen (s. Tabelle 2). Die hier beobachteten NH_i-NH_{i+1} -Kontakte deuten im Wesentlichen auf β -Stränge hin, was für eine relativ gestreckte Struktur in diesem Bereich spricht. Es konnten für das offenkettige 47er-Peptid **9** insgesamt 42 NH_i-NH_{i+1} -Kontakte ausgewertet werden, wobei in den Randbereichen deutlich weniger NOE-Kontakte auftreten. Da im N-terminalen Bereich überhaupt keine $NH-NH$ -Kontakte zu finden waren, spricht dies für eine erhöhte Flexibilität dieser Region.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Asn7	Thr8	Phe20	Ala19	Gln32	Arg31
Thr8	Asn7; Arg9	Thr23	Gly24	Ala33	His34
Arg9	Thr8	Gly24	Thr23; Glu25	His34	Ala33; Cys35
Ser11	Ile12	Glu25	Gly24; Ile26	Cys35	His34; Asn36
Ile12	His13	Ile26	Glu25	Asn36	Cys35; Ile37
His13	Ile12; Ile14	Ile27	Gly28	Ile37	Asn36; Ser38
Ile14	His13	Gly28	Ile27; Asp29	Ser38	Ile37
Gly17	Arg18	Asp29	Gly28	Arg39	Ala40
Arg18	Gly17; Ala19	Ile30	Arg31	Ala40	Arg39
Ala19	Arg18; Phe20	Arg31	Ile30; Gln32	Asp44	Thr45

Tabelle 2: Strukturelevante $NH-NH$ -NOE-Kontakte des nicht glycosylierten offenkettigen 47er-Peptids **9, beobachtet aus der F1-Dimension. Aufgrund einer Signalüberlagerung mit der Diagonalen waren einige NOE's nur auf einer Hälfte des $NH-NH$ -Bereiches des NOESY-Spektrums identifizierbar.**

4.2.4 Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptides **10**

Die Synthese des offenkettigen Referenzpeptides **10** (s. Abbildung 29) sollte eine Vergleichssubstanz liefern gegenüber der entsprechenden zyklisierten Verbindung **13** (s. 4.2.8) hinsichtlich der Wirkung der Zyklisierung auf konformative Änderungen und deren Einfluss auf die Bindungseigenschaften bzgl. der CCR5-Korezeptorspezifität. Darüber hinaus diente es als Vergleich gegenüber dem korrespondierenden linearen Glycopeptid **11** (s. 4.2.6), inwieweit die Glycosylierung Effekte zeigt. Außerdem sollte eine Gegenüberstellung mit dem verkürzten, offenkettigen Peptid **9** (s. 4.2.3) Hinweise auf einen Einfluss des erweiterten N-terminalen Bereiches der V3-Loop liefern.

Die Darstellung des 53er-Peptids **10** wurde vollautomatisch mittels Dreifachkupplungen unter TBTU Aktivierung durchgeführt. Über alle 53 Kupplungsschritte wurde nach Fmoc-Abspaltung eine Rohausbeute von 44 % erzielt.

Bei dieser Synthese wurden *S*tBu-seitenkettengeschützte Cysteine eingesetzt, die unter den vorliegenden Abspaltbedingungen nicht zusammen mit allen anderen Aminosäuren entschützt wurden. Nach Abspaltung von der Festphase und Ultrafiltration lieferte die Aufreinigung mittels HPLC eine Ausbeute von 2.1 %.

Ergebnisse und Diskussion

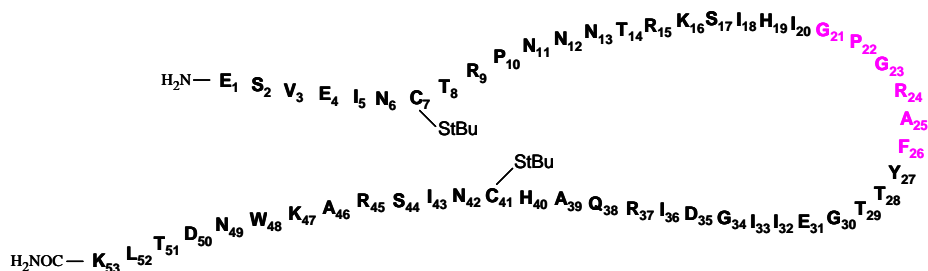


Abbildung 29: Schematische Darstellung des unglycosylierten offenkettigen 53er-Peptids **10**.

Das unglycosylierte, offenkettige V3-Peptid **10** (MW = 6169.11 g/mol) konnte massenspektrometrisch durch ein $[M+H]^+$ -Signal von $m/z = 6170.49$ im MALDI-TOF-Spektrum nachgewiesen werden.

Zur genauen Charakterisierung wurden 2D-NMR-Experimente aufgenommen. Der Nachweis der einzelnen Spinsysteme der Aminosäuren und die Zuordnung der chemischen Verschiebungen erfolgte mittels eines TOCSY-Spektrums. Dort konnten in der NH-Region 50 NH-Spuren der amidischen Protonen im Bereich von 7.967 bis 8.590 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (s. Abbildung 30). Die Identifikation der beiden in der Sequenz enthaltenen Proline und der N-terminalen Glutaminsäure gelang anhand ihrer CH_α -Spuren bei 4.408, 4.428 und 4.263 ppm. Die Sequenzierung des Peptids erfolgte durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmung der $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten geschah anhand eines DQF-COSY-Spektrums. Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen und die $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 19 angegeben (s. 7.3.2).

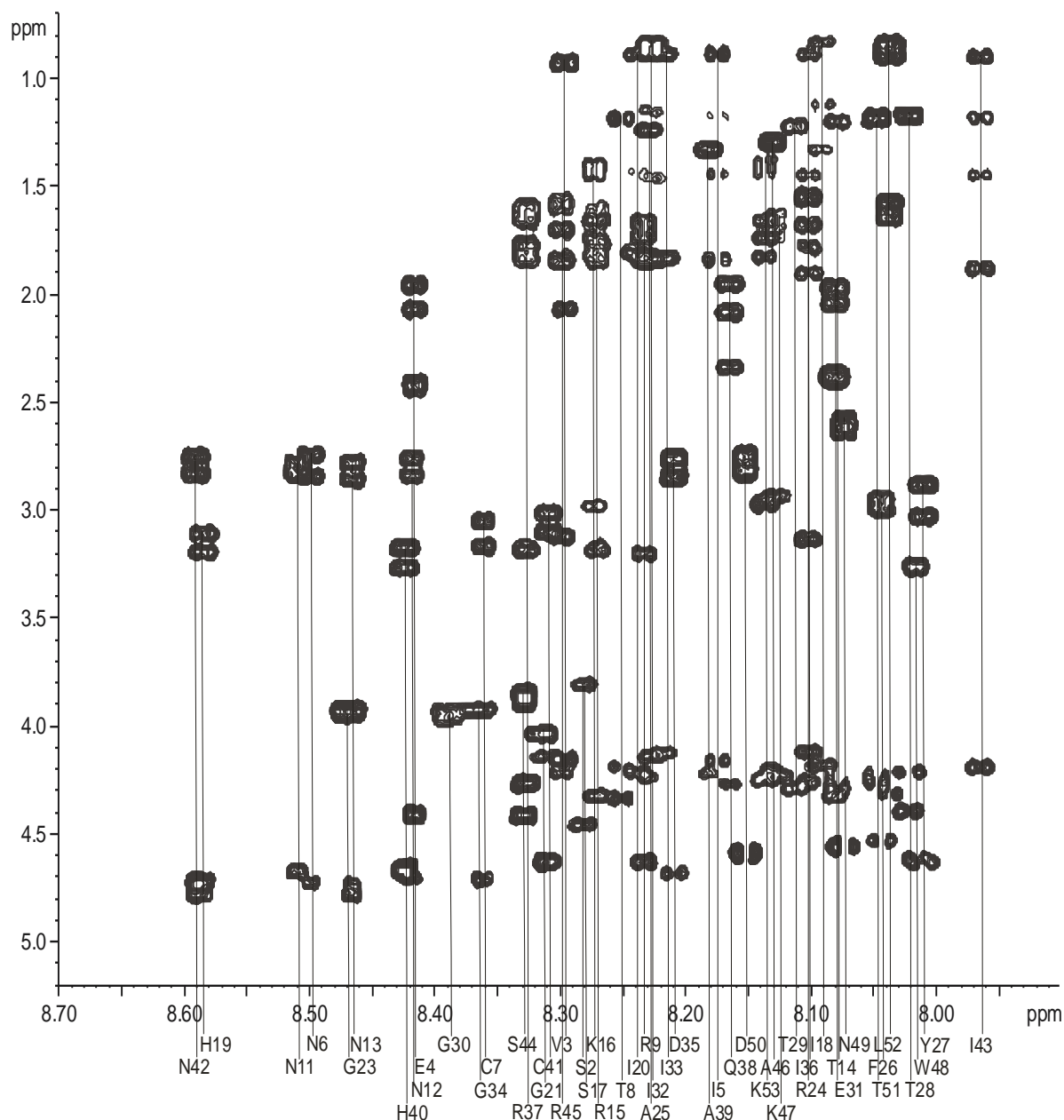


Abbildung 30: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des unglycosylierten offenkettigen 53er-Peptids **10**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

Für das offenkettige, verlängerte Peptid **10** konnten, wie in Abbildung 31 ersichtlich ist, insgesamt 57 NH_i-NH_{i+1}-Kontakte ausgewertet werden. Im Vergleich zum offenkettigen, verkürzten V3-Peptid **9** treten hier erwartungsgemäß im verlängerten N-terminalen Bereich zusätzliche acht NH-NH-Kontakte auf, wobei auch hier in den Randbereichen überhaupt keine NOE-Kontakte zu finden waren, was für eine erhöhte Flexibilität dieser Regionen spricht. Der zentrale Bereich der Peptidkette deckt sich bis auf zusätzliche fünf NH-NH-Kontakte mit denen des verkürzten Peptides. Dass auch hier neben diesen sequenziellen NH-NH-Kontakten keine weiteren strukturelevanten NOE-Kontakte auftraten (s. Tabelle 3), deutet auf eine gestreckte aber weniger definierte Struktur der linearen Verbindungen hin.

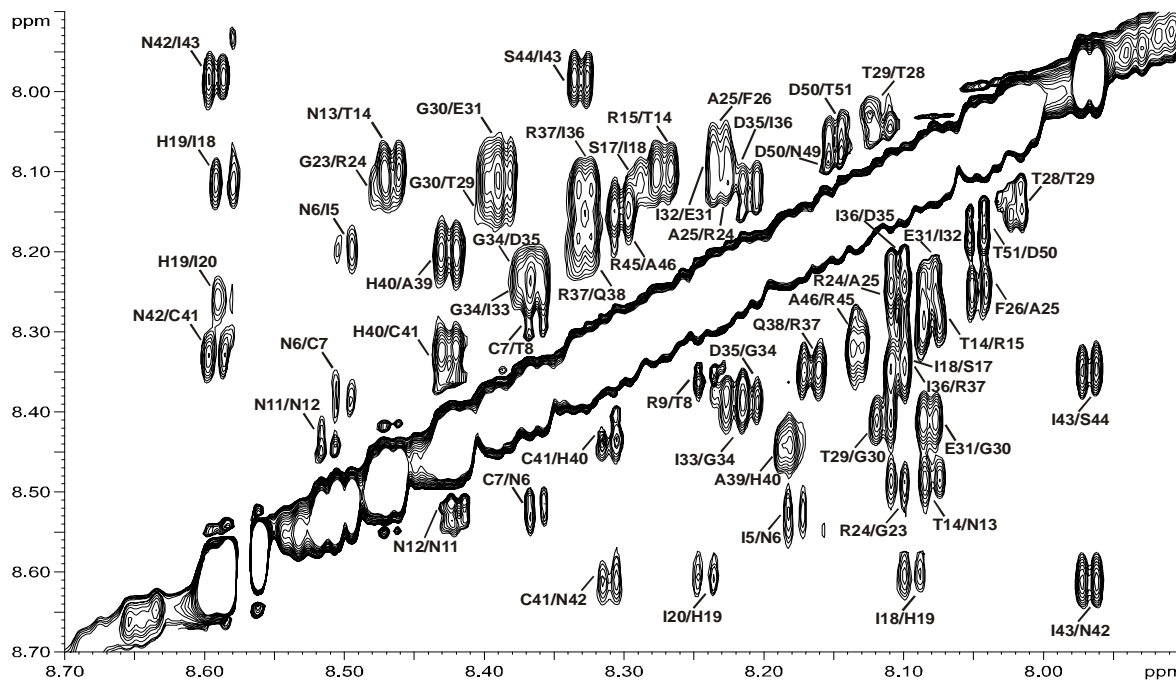


Abbildung 31: NH-NH-Bereich des NOESY-Spektrums des nicht glycosylierten offenkettigen 53er-Peptids 10.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Ile5	Asn6	Gly23	Arg24	Arg37	Ile36; Gln38
Asn6	Ile5; Cys7	Arg24	Gly23; Ala25	Gln38	Arg37
Cys7	Asn6; Thr8	Ala25	Arg24; Phe26	Ala39	His40
Arg9	Thr8	Phe26	Ala25	His40	Ala39; Cys41
Asn11	Asn12	Thr28	Thr29	Cys41	His40; Asn42
Asn12	Asn11	Thr29	Thr28; Gly30	Asn42	Cys41; Ile43
Asn13	Thr14	Gly30	Thr29; Glu31	Ile43	Asn42; Ser44
Thr14	Asn13; Arg15	Glu31	Gly30; Ile32	Ser44	Ile43
Arg15	Thr14	Ile32	Glu31	Arg45	Ala46
Ser17	Ile18	Ile33	Gly34	Ala46	Arg45
Ile18	Ser17; His19	Gly34	Ile33; Asp35	Asp50	Asn49; Thr51
His19	Ile18; Ile20	Asp35	Gly34; Ile36	Thr51	Asp50
Ile20	His19	Ile36	Asp35; Arg37		

Tabelle 3: Strukturelevante NH-NH-NOE-Kontakte des nicht glycosylierten offenkettigen 53er-Peptids 10, beobachtet aus der F1-Dimension. Aufgrund einer Signalüberlagerung mit der Diagonalen waren einige NOE's nur auf einer Hälfte des NH-NH-Bereiches des NOESY-Spektrums identifizierbar.

4.2.5 Versuche zur Zyklisierung des Cys(S*t*Bu)-geschützten verkürzten V3-Peptides 9

Die unter 4.2.3, 4.2.4 und 4.2.6 beschriebenen Synthesen der offenkettigen V3-Verbindungen wurden unter Verwendung von S*t*Bu-seitenkettengeschützten Cysteinen durchgeführt. Dies sollte die Möglichkeit eröffnen, das entstandene Rohprodukt vor der orthogonalen Entschützung der Thiolgruppen und dem Knüpfen der Disulfidbrücke aufzureinigen. Durch die selektive Disulfidverbrückung des bereits aufgereinigten Zielproduktes sollten dabei Aufreinigungsprobleme aufgrund starker Heterogenität des Rohproduktes umgangen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Denn nach der Trityl-Strategie führen die zahlreichen Abbruchprodukte der Synthese durch unkontrollierte Di- bzw. Oligomerisierungen im Allgemeinen bei der Aufreinigung mittels HPLC zu erheblichen Ausbeuteverlusten. Darüber hinaus versprach die orthogonale *S*tBu-Schutzgruppenstrategie den Vorteil, dass in einem Syntheseschritt sowohl das lineare, als auch das zyklisierte Produkt erhalten werden kann (s. 2.1).

Nach Aufreinigung des Rohproduktes von **9** wurde die selektive Abspaltung der orthogonalen *S*tBu-Schutzgruppen mit Hilfe von Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens durchgeführt. In der Literatur ist dabei der Einsatz verschiedener Thiole¹⁴⁵ wie z.B. Ethandithiol, Mercaptoethanol oder auch DTT beschrieben, wobei die Verwendung von DTT aufgrund der guten Wasserlöslichkeit und der geringeren Geruchsbelästigung im Vergleich zu den anderen Thiolen am geeignetsten erschien.¹⁴⁹ Es wurden drei verschiedene Ansätze zur Abspaltung der *S*tBu-Schutzgruppen und zur anschließenden Disulfidverbrückung durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen hinsichtlich des Überschusses an DTT, Reduktionszeit bei der Entschützung und Dauer der oxidativen Zyklisierung variiert, um optimale Zyklisierungsbedingungen zu ermitteln. Im ersten Syntheseversuch wurde zur Reduktion der geschützten Thiole mit 15 Äquivalenten DTT für sechs Stunden umgesetzt. Die Entschützungreaktion der Cysteinthiole wurde dabei massenspektrometrisch verfolgt (s. Abbildung 32). Es wurde dazu vor dem Reaktionsstart, sowie nach drei und sechs Stunden Reaktionszeit jeweils eine Probe nach vorheriger Entsalzung mittels C₁₈-Pipettenspitzen massenspektrometrisch durch MALDI-TOF vermessen.

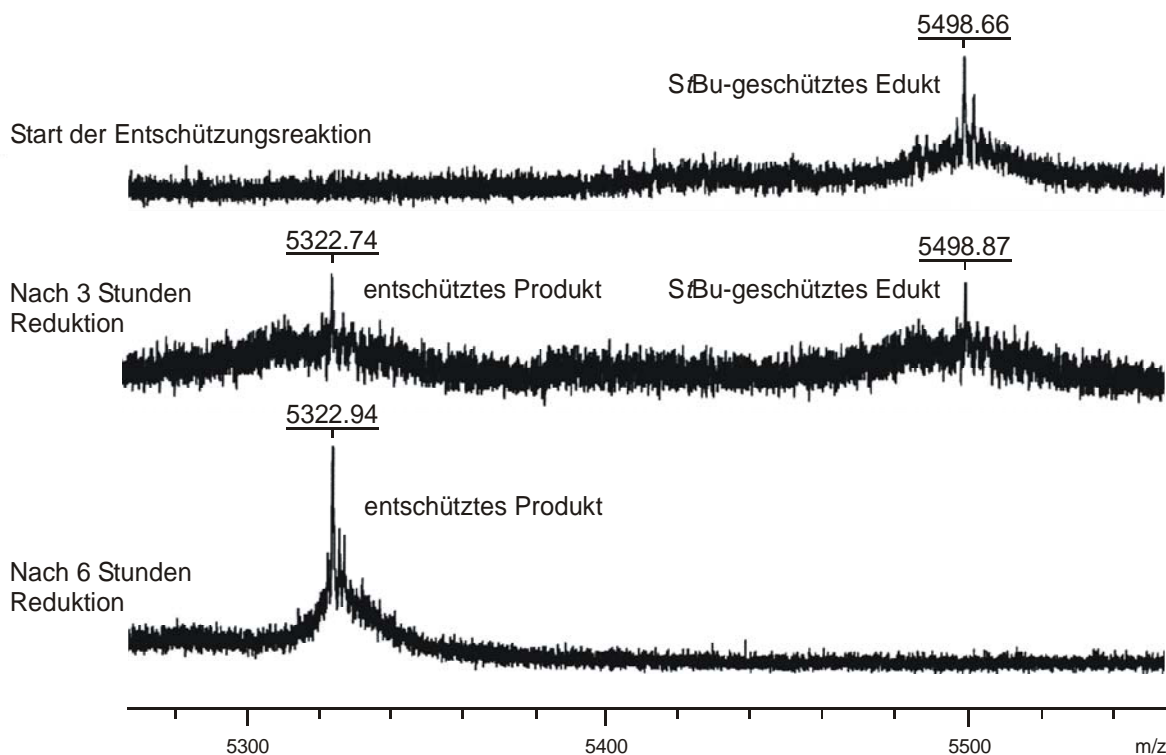


Abbildung 32: Massenspektrometrische Verfolgung des Fortschreitens der Entschützung der Cystein-*S*tBu-Thiole von Peptid **9** mittels DTT.

Nach erfolgter Reduktion wurde die Peptidlösung anschließend mit einer 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf 2.4 μ M verdünnt und zur Knüpfung der Disulfidbrücke für einen Tag mittels Luftsauerstoff oxidativ zyklisiert. Nach Entsalzung und Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration konnte jedoch weder das zyklisierte Produkt noch das Edukt mittels MALDI-TOF nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum leicht wasserlöslichen Edukt, wurde ein in keinem Lösungsmittel lösliches Polymerisat erhalten. Das lässt darauf schließen, dass während der Ultrafiltration aufgrund der Aufkonzentrierung der Peptidlösung Polymerisation durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung auftrat. Möglicherweise war die Dauer der Zyklisierung zu kurz. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass das in hohem Überschuss eingesetzte DTT während der Oxidationsreaktion dafür sorgte, dass die bereits geknüpften Disulfidbrücken wieder reaktiv gespalten wurden. Während der nachfolgenden Ultrafiltration wurde zwar überschüssiges DTT aus der Lösung entfernt, da jedoch die Peptidlösung jetzt stark aufkonzentriert vorlag, stieg die Neigung zur intermolekularen Disulfidbrückenbildung stark an, was letztendlich zur Polymerisation führte.

Deshalb wurde in zwei weiteren Versuchen das DTT letztendlich auf fünffachen Überschuss reduziert, die Reaktionsdauer auf zwei Tage verlängert, um die Rückreaktion zu unterbinden und die Oxidationszeit auf sieben Tage erhöht. Darüber hinaus wurde das Fortschreiten der oxidativen Zyklisierung mit Hilfe des *Ellman*-Tests^{183,184} durch den Nachweis freier Thiolgruppen verfolgt. Die massenspektrometrische Reaktionsverfolgung zeigte auch hier eine erfolgreich verlaufende Entschützung und beim Abbruch der Zyklisierungsreaktion wies der *Ellman*-Test keine freien Thiolgruppen mehr nach. Aber auch hier erwies sich nach der Ultrafiltration der gefriergetrocknete Rückstand als schwer wasserlösliches Granulat. Da im MALDI-TOF-Spektrum weder das zyklisierte Produkt noch das Edukt nachgewiesen werden konnte, führte die Aufkonzentrierung der Peptidlösung wahrscheinlich wiederum zur Polymerisation des Produktes. Obwohl der zum Ende der oxidativen Zyklisierung durchgeführte negative *Ellman*-Test keinerlei freie Thiole mehr anzeigte, weshalb von der Beendigung der Reaktion ausgegangen wurde, schien noch eine geringe Menge nicht umgesetztes DTT in der Reaktionslösung verblieben zu sein. Diese reichte im weiteren Verlauf der Aufarbeitung aus, um zu Polymerisationsreaktionen zu führen. In Anbetracht der extremen Verdünnung während der oxidativen Zyklisierung wird davon ausgegangen, dass der *Ellman*-Test unter diesen Bedingungen für den Nachweis freier Thiole sich letztlich als zu unempfindlich erwies.

Es wurde auf weitere Versuche verzichtet. Jedoch dienen die synthetisierten Cystein-*S**t*Bu-geschützten Peptide **9** und **10**, sowie das Glycopeptid **11** als offenkettige Analoga zu den entsprechenden zyklisierten Verbindungen **12**, **13** und **14**.

Wie andere Arbeiten zeigen¹⁰⁷, führte darüber hinaus auch die Verwendung von orthogonal *t*Bu-geschützten Cysteinen und deren Entschützung und Zyklisierung nach einer modifizierten Silylchlorid-Sulfoxid-Methode¹⁸⁵ nicht zum gewünschten Erfolg.

4.2.6 Synthese des diglycosylierten offenkettigen V3-Peptides 11

Das offenkettige Glycopeptid **11** (s. Abbildung 33) wurde synthetisiert als lineare Vergleichssubstanz gegenüber dem entsprechenden zyklisierten Glycopeptid **14** (s. 4.2.9) und sollte darüber hinaus als Vergleich gegenüber dem korrespondierenden unglycosylierten Peptid **10** dienen (s. 4.2.4).

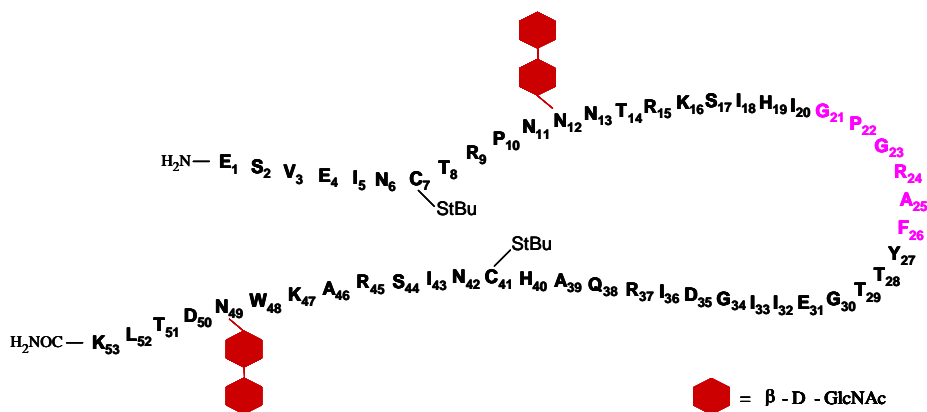


Abbildung 33: Schematische Darstellung des diglycosylierten offenkettigen 53er-Glycopeptids 11.

Die Darstellung des Glycopeptids wurde mittels einer Kombination aus automatisierter und manueller Festphasensynthese durchgeführt. Die Kupplung der gewöhnlichen Aminosäuren erfolgte dabei mittels automatisierter Synthese durch Dreifachkupplungen unter TBTU Aktivierung. Die Verknüpfung des Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines **6** wurde jeweils entsprechend den unter 4.2.2 beschriebenen optimierten Bedingungen manuell durchgeführt. Dabei lieferte der Einbau des ersten Glycosylbausteines mittels Zweifachkupplung eine Glycosylierungsausbeute von 83 %. Um die Gesamtsyntheseausbeute zu erhöhen erfolgte die zweite Glycokupplung unter Dreifachkupplung, wodurch sich die Glycosylierungsausbeute noch auf 88 % steigern ließ. Über alle 53 Kupplungsschritte konnte nach Fmoc-Abspaltung eine Rohausbeute von 32 % erzielt werden. Ein Vergleich mit dem Syntheseresultat des entsprechenden unglycosylierten Peptids **10** von 44 % Ausbeute (s. 4.2.4) zeigt, wie essentiell die effektive Anbindung des Zuckerbausteines für eine optimale Kupplungsausbeute ist, um am Ende der Synthese sehr aufwendige Trennungen zu vermeiden.

Mit Hilfe von Hydrazinhydrat/Methanol (1:5) wurde das Glycopeptid entsprechend den beschriebenen Standardbedingungen am Harz deacetyliert. Bei dieser Synthese wurden *StBu*-seitenkettengeschützte Cysteine eingesetzt, die unter den vorliegenden Abspaltbedingungen nicht zusammen mit allen anderen Aminosäuren entschützt wurden. Nach Abspaltung von der Festphase und Ultrafiltration lieferte die Aufreinigung mittels HPLC eine Ausbeute von 0,9 %. Trotz optimaler Kupplungsausbeuten führten Aufreinigungsprobleme aufgrund der Produktzusammensetzung zu erheblichen Ausbeuteverlusten, die für diese relativ geringe Gesamtausbeute verantwortlich sind. Dabei ergaben zunächst Aufreinigungsversuche mittels präparativer RP-HPLC, dass neben dem Zielprodukt **11** hauptsächlich die Abbruchpeptide der beiden Glycosylierungsstellen entstanden waren. Diese ließen sich mittels RP-HPLC

nicht wirksam abtrennen. In einem zweiten Schritt wurde daher das bereits vorgereinigte Produkt über Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt. Über eine in Reihe geschaltete *Toyopearl HW 50S* Säule und eine *Toyopearl HW 40S* Säule (jeweils Ethylenglycol/Methacrylat-Copolymer) wurde isokratisch mittels Wasser/Isopropanol 80:20 als 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung eluiert. Abschließend wurde das noch durch geringe Mengen monoglycosyliertes Abbruchpeptid verunreinigte Produkt an einer semipräparativen RP-C₁₈-Säule aufgereinigt.

Das diglycosylierte, offenkettige V3-Glycopeptid **11** (MW = 6981.43 g/mol) konnte massenspektrometrisch durch ein [M+H]⁺-Signal von m/z = 6982.59 im MALDI-TOF-Spektrum nachgewiesen werden.

Nach Bestätigung der berechneten Masse wurde die NMR-Analyse durchgeführt. Im ¹H-NMR-Spektrum waren neben den Signalen, die von der Peptidkette stammen, Multipletts der Saccharidprotonen im Bereich von 5.0 und 4.5 ppm zu finden. Des Weiteren befanden sich im Bereich von 3.4 bis 4.0 ppm weitere Zuckersignale. Die genauere NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte anhand von 2D-NMR-Experimenten. In der NH-Region des TOCSY-Spektrums konnten 50 NH-Spuren der amidischen Protonen der Peptidkette im Bereich von 7.972 bis 8.594 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (s. Abbildung 34). Die CH_α-Spuren der beiden in der Sequenz enthaltenen Proline liegen bei 4.407 und 4.437 ppm, die CH_α-Spur der N-terminalen Glutaminsäure liegt bei 4.268 ppm. Darüber hinaus sind in der NH-Region des TOCSY-Spektrums fünf NH-Spuren zu finden, die zu saccharidischen Protonen führen. Für die beiden N-glycosidisch direkt ans Peptid gebundenen N-Acetylglucosamine (GlcNAc), welche jeweils zwei amidische NH-Protonen besitzen, sind jeweils zwei ähnliche NH-Spuren zu beobachten. Diese stammen von der N-glycosidischen Bindung am Asparagin-12 bei 8.607 ppm und der N-Acetylgruppe bei 8.176 ppm, sowie von der N-glycosidischen Bindung am Asparagin-49 bei 8.503 ppm und der N-Acetylgruppe bei 8.155 ppm. Die fünfte NH-Spur bei 8.353 ppm gehört zu den beiden zweiten N-Acetylglucosaminen der Chitobiose (GlcNAc'), deren NH-Spuren aufgrund der Ähnlichkeit der chemischen Umgebung nicht dispergiert sind (s. Abbildung 34). Neben dem TOCSY-Spektrum diente die Aufnahme eines DQF-COSY-Experimentes zur vollständigen Zuordnung der Zuckerprotonen durch Analyse der skalaren Kopplungen. Die Sequenzierung des Glycopeptids erfolgte über ein NOESY-Spektrum (s. Abbildung 35). Die ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen und die ³J_{NHα}-Kopplungskonstanten sind in Tabelle 21 und 22 angegeben (s. 7.3.4).

Ergebnisse und Diskussion

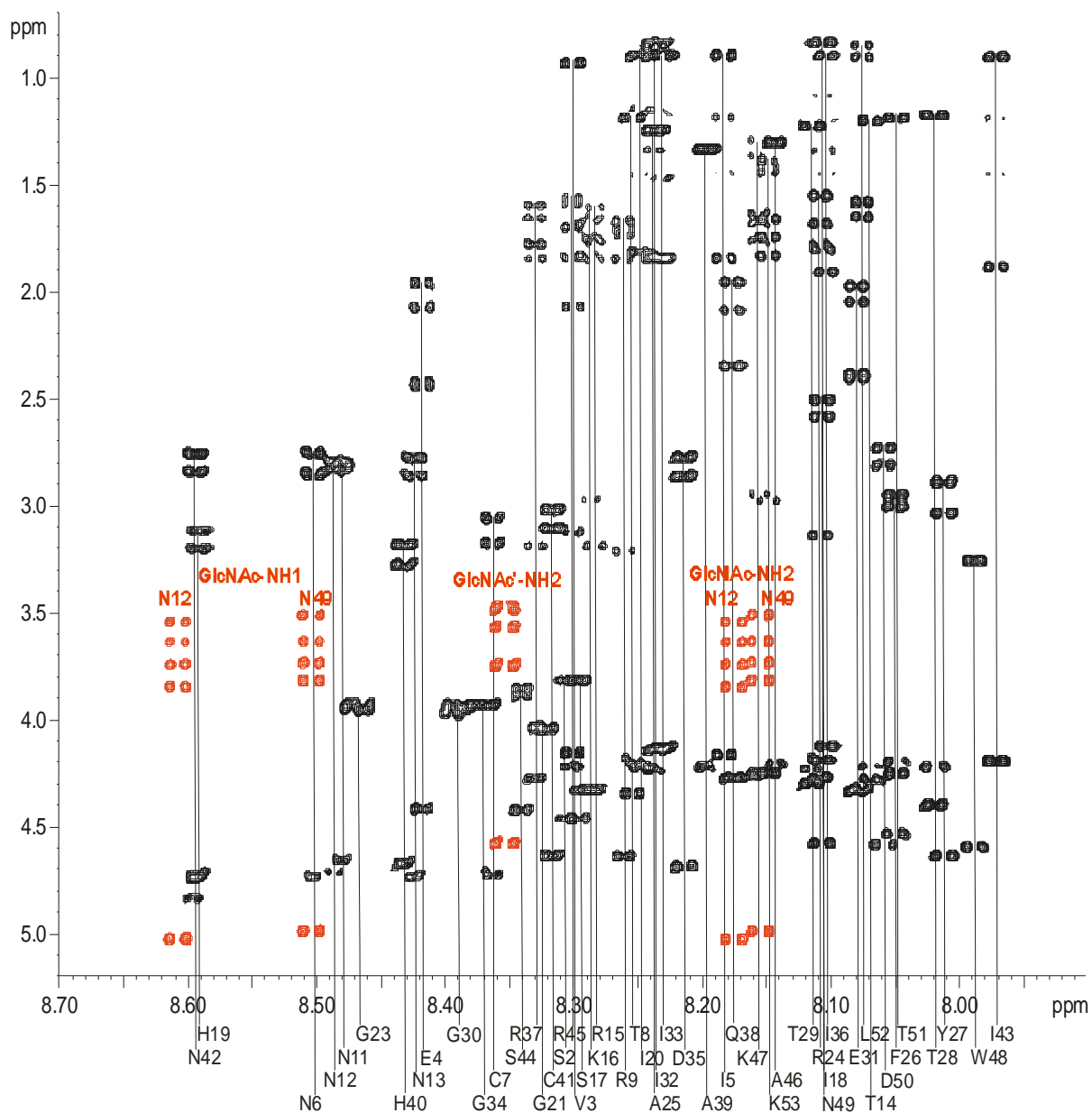


Abbildung 34: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des diglycosylierten offenkettigen Glycopeptids **11**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5. Die schwarz eingefärbten Signale stammen von Aminosäuren, die roten von Zuckerprotonen.

Die im NOESY-Spektrum beobachteten NH-NH-NOE-Kontakte der Peptidkette (s. Abbildung 36 und Tabelle 4) stimmen weitgehend mit denen des unglycosylierten offenkettigen Peptids **10** überein. Jedoch sind im Bereich der Glycosylierungsstellen an Asn12 zusätzlich zwei und an Asn49 zusätzlich vier MH_i - MH_{i+1} -Kontakte zu erkennen. Da sich beide Verbindungen nur durch die zwei Glycosylierungen an den Seitenketten der Asparagine unterscheiden, haben diese einen Einfluss auf die 3D-Struktur und bewirken eine eingeschränkte Beweglichkeit im Bereich der Glycosylierungsstellen. Insgesamt konnten für das offenkettige Glycopeptid **11** 62 sequentielle NOE-Kontakte beobachtet werden. Zusätzlich findet man (s. Abbildung 35 und Tabelle 4) in der jeweiligen Spur der *N*-glycosidischen Protonen die Kreuzsignale zu den β/β' -Protonen der zugehörigen

Ergebnisse und Diskussion

Asparagine. Außerdem sind NOE-Kontakte der amidischen NH-Protonen der *N*-Acetylglucosamine zu den entsprechenden Acetylprotonen zu beobachten.

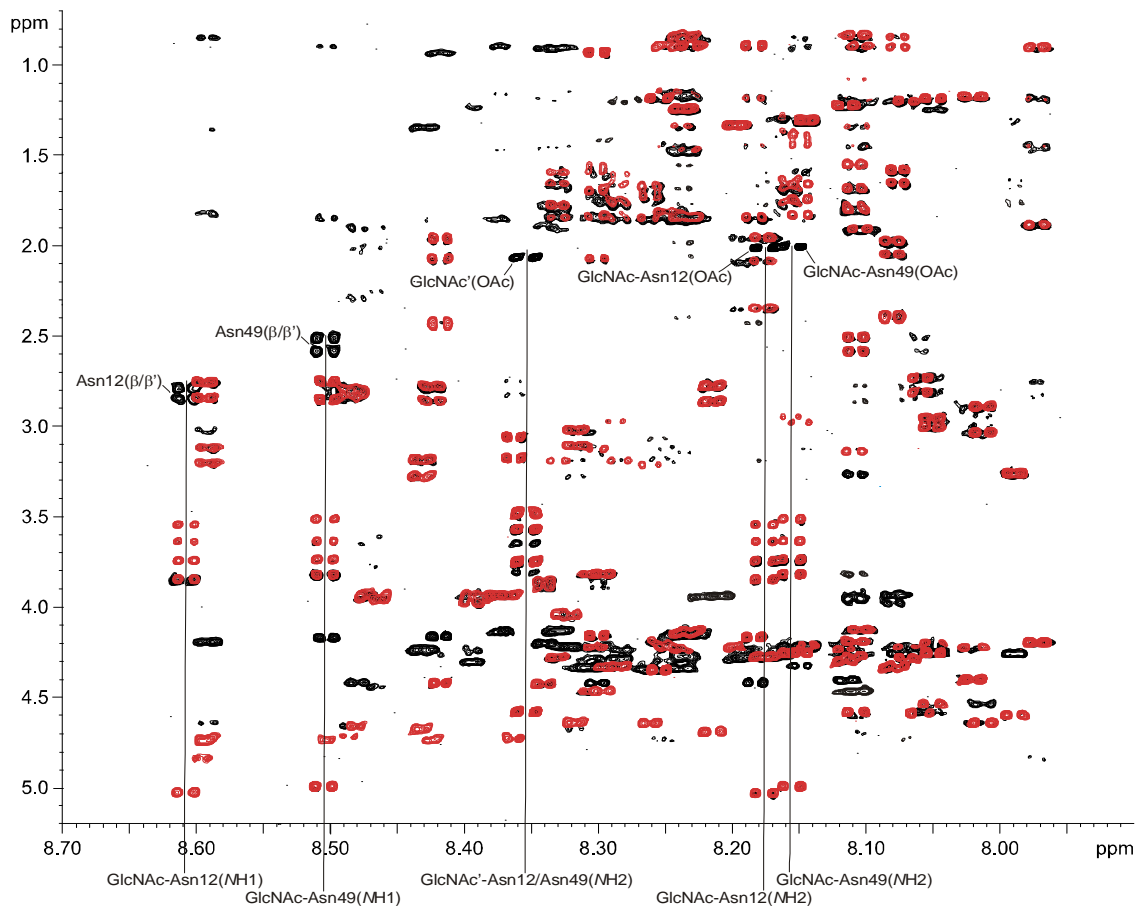


Abbildung 35: Ausschnitte aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums (rot) und des NOESY-Spektrums (schwarz) des diglycosylierten offenkettigen Glycopeptids **11**. Die Aufnahmen erfolgten bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

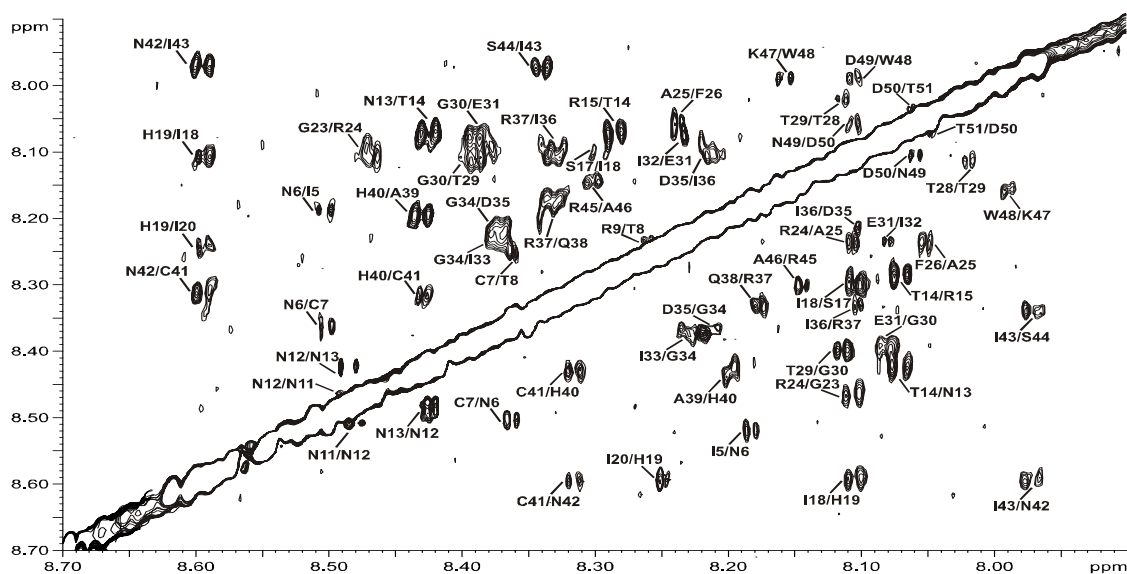


Abbildung 36: NH-NH-Bereich des NOESY-Spektrums des offenkettigen Glycopeptids **11**. Gegenüber dem entsprechenden Spektrum des Peptids **10** liegt hier eine in *z*-Richtung etwa halb so tiefe Skalierung vor (s. Abbildung 31).

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Ile5	Asn6	Arg24	Gly23; Ala25	Ala39	His40
Asn6	Ile5; Cys7	Ala25	Phe26	His40	Ala39; Cys41
Cys7	Asn6; Thr8	Phe26	Ala25	Cys41	His40; Asn42
Arg9	Thr8	Thr28	Thr29	Asn42	Cys41; Ile43
Asn11	Asn12	Thr29	Thr28; Gly30	Ile43	Asn42; Ser44
Asn12	Asn11; Asn13	Gly30	Thr29; Glu31	Ser44	Ile43
Asn13	Asn12; Thr14	Glu31	Gly30; Ile32	Arg45	Ala46
Thr14	Asn13; Arg15	Ile32	Glu31	Ala46	Arg45
Arg15	Thr14	Ile33	Gly34	Lys47	Trp48
Ser17	Ile18	Gly34	Ile33; Asp35	Trp48	Lys47
Ile18	Ser17; His19	Asp35	Gly34; Ile36	Asn49	Trp48; Asp50
His19	Ile18; Ile20	Ile36	Asp35; Arg37	Asp50	Asn49; Thr51
Ile20	His19	Arg37	Ile36; Gln38	Thr51	Asp50
Gly23	Arg24	Gln38	Arg37		
Weitere strukturelevante NOE-Kontakte					
GlcNAc-Asn12(NH1)	Asn12 (β/β')	GlcNAc-Asn12(NH2)	GlcNAc-Asn12(OCH ₃)		
GlcNAc'-Asn12(NH2)	GlcNAc'-Asn12(OCH ₃)				
GlcNAc-Asn49(NH1)	Asn49 (β/β')	GlcNAc-Asn49(NH2)	GlcNAc-Asn49(OCH ₃)		
GlcNAc'-Asn49(NH2)	GlcNAc'-Asn49(OCH ₃)				

Tabelle 4: Strukturelevante NH-NH-NOE-Kontakte des diglycosylierten offenkettigen Glycopeptids 11, beobachtet aus der F1-Dimension, sowie andere strukturelevante NOE-Kontakte. Aufgrund einer Signalüberlagerung mit der Diagonalen waren einige NOE's nur auf einer Hälfte des NH-NH-Bereiches des NOESY-Spektrums identifizierbar.

4.2.7 Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten verkürzten V3-Peptides 12

Durch die Synthese des zyklisierten Referenzpeptids 12 (s. Abbildung 37) sollte sichergestellt werden, dass beim Misslingen der Zyklisierung der in Nachbarschaft zu den Cysteinen glycosylierten V3-Loop (s. 4.2.2) von keinem speziellen sequenzbedingten Problem ausgegangen werden muss. Darüber hinaus diente 12 als Vergleichssubstanz gegenüber der entsprechenden offenkettigen Verbindung 9 (s. 4.2.3) hinsichtlich des Einflusses der Zyklisierung auf konformative Änderungen, sowie auf Änderungen der Bindungsaffinität bzgl. der CCR5-Korezeptorspezifität.

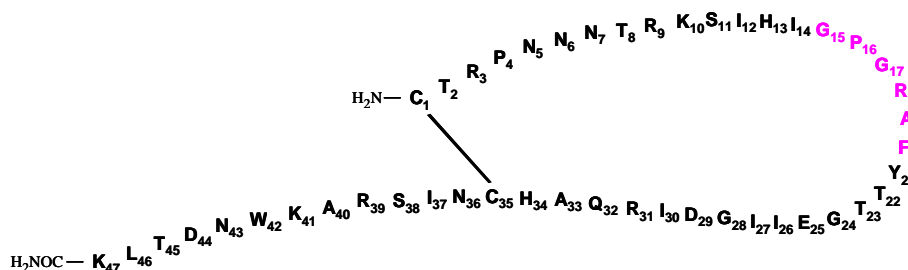


Abbildung 37: Schematische Darstellung des unglycosylierten 47er-Zyklopeptids 12.

Das 47er-Peptid wurde komplett in einer vollautomatischen Synthese mittels Dreifachkupplungen unter TBTU Aktivierung an der Festphase aufgebaut. Über alle 47 Kupplungsschritte konnte nach Fmoc-Abspaltung eine Rohausbeute von 51 % erzielt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Bei dieser Synthese wurden Trityl-geschützte Cysteine eingesetzt, die zusammen mit allen anderen Aminosäuren bei der unter Schutzgas verlaufenden Abspaltung von der Festphase geschützt wurden. Anschließend wurde das vollständig entschützte, offenkettige Peptid unter Sauerstoffausschluss auf 11.3 μM verdünnt und mit Hilfe von Luftsauerstoff für 48 Stunden zyklisiert. Nach Ultrafiltration und Aufreinigung mittels HPLC wurde das unglycosylierte, zyklisierte V3-Peptid **12** in einer Ausbeute von 3.4 % erhalten.

Die Identität des Zyklopeptids (MW = 5319.71 g/mol) wurde zunächst durch die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums durch ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal von $m/z = 5320.90$ bestätigt.

Zur genauen Charakterisierung wurden 2D-NMR-Experimente aufgenommen. Hierbei kam es zu erheblichen Schwierigkeiten auswertbare Spektren in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) aufzunehmen. Trotz ausreichend vorhandener Substanzmenge von 6.0 mg (1.1 μmol) ergaben sich weniger zufrieden stellend aufgelöste Spektren, die auf zu geringe Probenkonzentration schließen ließen. Es lag dabei offensichtlich keine echte Lösung vor, sondern die Moleküle lagen vielmehr vorwiegend in fein dispergierter Form vor, welches auch unter UV-Licht erkennbar war. Da die entsprechenden offenkettigen Peptide **9** und **10** unter gleichen Bedingungen deutlich besser aufgelöste und intensivere NMR-Spektren lieferten (s. 4.2.3 und 4.2.4), wird vermutet, dass aufgrund der zyklischen Struktur bereits eine derart gefaltete Konformation vorlag, die nur eine kolloidale Lösung zuließ, so dass eine für die Messung zu geringe Konzentration echt gelöster Moleküle vorhanden war. Aber auch die Variierung von Signal/Rausch-Verhältnis und Auflösung durch unterschiedliche Prozessierungen und auch die Verwendung anderer deuterierter Lösungsmittel verhalf nicht zu besseren Spektren. Dieses Problem trat bei der Aufnahme von Spektren des N-terminal um sechs Aminosäuren verlängerten Zyklopeptids **13** noch verstärkter auf (s. 4.2.8).

Dennoch gelang der Nachweis der einzelnen Spinsysteme der Aminosäuren und die Zuordnung der chemischen Verschiebungen mittels eines TOCSY-Spektrums. In der NH-Region konnten 44 NH-Spuren der amidischen Protonen im Bereich von 7.958 bis 8.596 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (s. Abbildung 38). Die Identifikation der beiden in der Sequenz enthaltenen Proline und des N-terminalen Cysteins erfolgte anhand ihrer CH_α -Spuren bei jeweils 4.459 ppm und 4.742 ppm. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmung der $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten erfolgte anhand eines DQF-COSY-Spektrums. Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen und die $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 23 angegeben (s. 7.3.5).

Ergebnisse und Diskussion

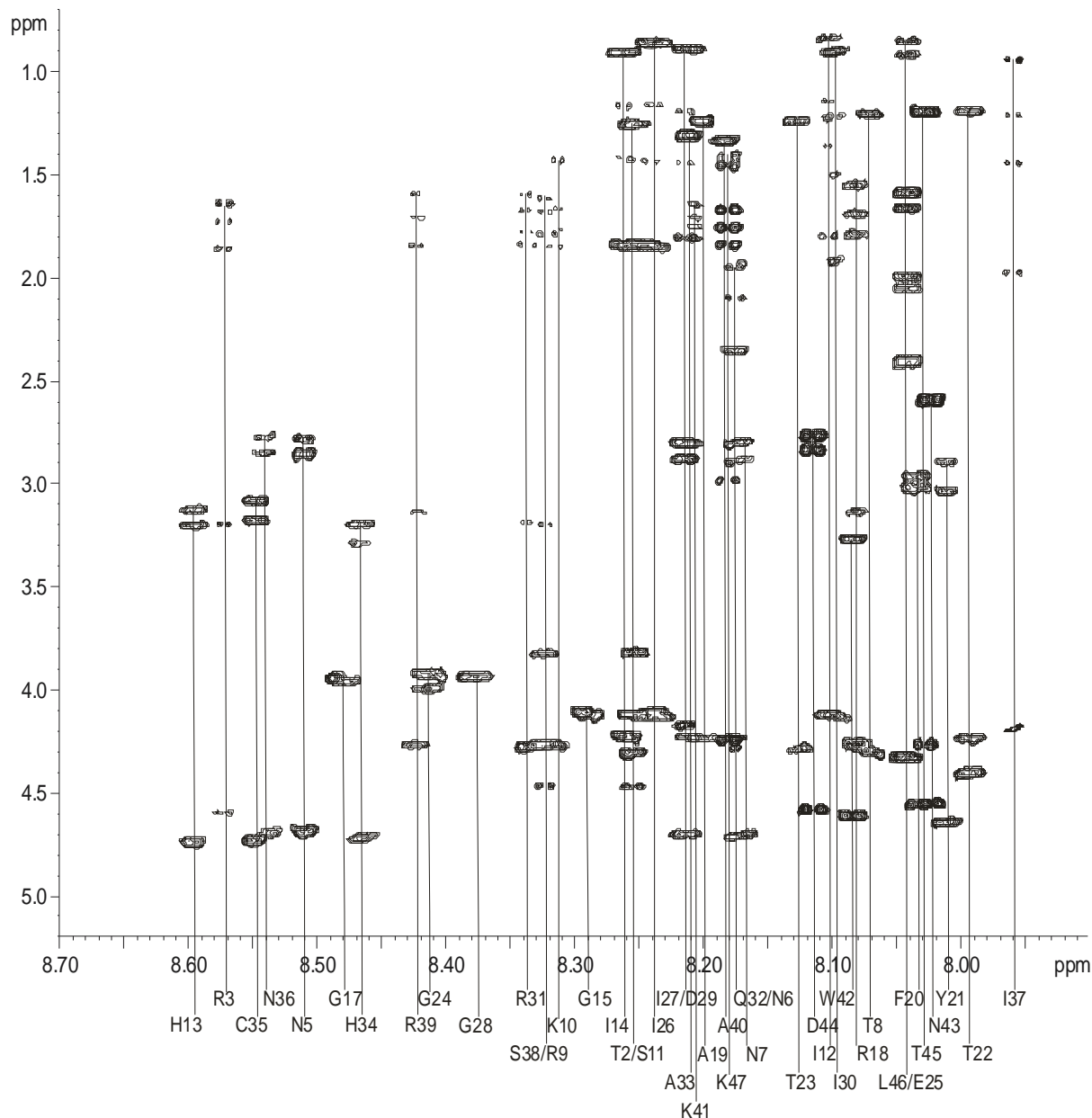


Abbildung 38: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des unglycosylierten 47er-Zylopeptids **12**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

Die Untersuchung der strukturelevanten NOE-Kontakte ergab für das verkürzte Zylopeptid **12** insgesamt 46 sequenzielle NH_i-NH_{i+1} -Kontakte (s. Tabelle 5). Im Vergleich zum offenkettigen Peptid **9** treten hier im Bereich der Disulfidverbrückung zusätzliche vier $NH-NH$ -Kontakte auf, was für eine besser definierte Struktur durch die Zyklisierung der Loop spricht. Hierfür spricht auch der beobachtete *long-range* NOE-Kontakt zwischen Ile30(NH) und Thr8(γ). Außerdem konnten *long-range* NOE-Kontakte zwischen Cys1(β') und Cys35(β'), sowie zwischen Cys35(β) und Cys1(β) beobachtet werden. Diese resultieren aus der räumlichen Nähe der betreffenden Aminosäuren aufgrund der Zyklisierung der V3-Loop. Die Struktur der zyklisierten Verbindung ist offensichtlich deutlich weniger flexibel als die der offenkettigen Loop, was auch aufgrund der höheren Anzahl an NOE-Kontakten zu

erwarten war. Es ist davon auszugehen, dass die zyklisierte V3-Loop **12** in einer wesentlich anderen Konformation vorliegt als das offenkettige Peptid **9**.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Thr2	Arg3	Ala19	Arg18; Phe20	Gln32	Arg31; Ala33
Arg3	Thr2	Phe20	Ala19; Tyr21	Ala33	His34; Gln32
Asn7	Thr8	Thr23	Gly24	His34	Ala33; Cys35
Thr8	Asn7; Arg9	Gly24	Thr23; Glu25	Cys35	His34; Asn36
Arg9	Thr8	Glu25	Gly24; Ile26	Asn36	Cys35; Ile37
Ser11	Ile12	Ile26	Glu25	Ile37	Asn36; Ser38
Ile12	His13	Ile27	Gly28	Ser38	Ile37
His13	Ile12; Ile14	Gly28	Ile27	Arg39	Ala40
Ile14	His13	Asp29	Gly28	Ala40	Arg39
Gly17	Arg18	Ile30	Arg31	Asp44	Thr45
Arg18	Gly17; Ala19	Arg31	Ile30; Gln32		
Weitere strukturelevante NOE-Kontakte					
Ile30 (NH)	Thr8 (γ)	Cys1 (β')	Cys35 (β')	Cys35 (β)	Cys1 (β)

Tabelle 5: Strukturelevante NH-NH-NOE-Kontakte des unglycosylierten 47er-Zyklopeptids **12**, beobachtet aus der F1-Dimension, sowie andere strukturelevante NOE-Kontakte. Aufgrund einer Signalüberlagerung mit der Diagonalen waren einige NOE's nur auf einer Hälfte des NH-NH-Bereiches des NOESY-Spektrums identifizierbar.

4.2.8 Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten V3-Peptides **13**

Die Darstellung des 53er-Peptids **13** (s. Abbildung 39) diente als Vergleichssubstanz gegenüber der entsprechenden offenkettigen Verbindung **10** (s. 4.2.4) und dem korrespondierenden zyklisierten Glycopeptid **14** (s. 4.2.9) hinsichtlich der Wirkung von Zyklisierung und Glycosylierung auf konformative Änderungen und CCR5-Bindungseigenschaften. Zudem sollte ein Vergleich mit dem verkürzten Zyklopeptid **12** (s. 4.2.7) auf mögliche Einflüsse des erweiterten N-terminalen Bereiches der V3-Loop hinweisen.

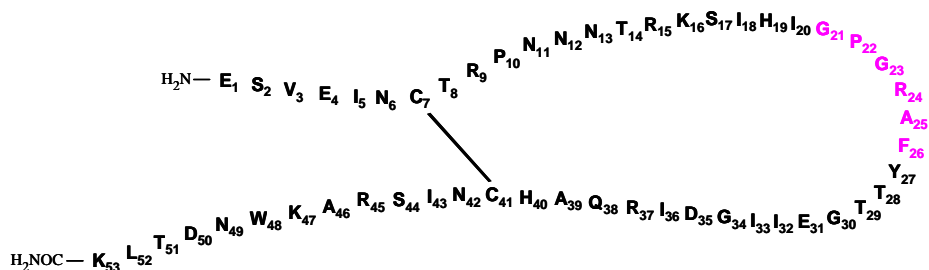


Abbildung 39: Schematische Darstellung des unglycosylierten 53er-Zyklopeptids **13**.

Die Synthese des 53er-Peptids **13** wurde vollautomatisch mittels Dreifachkupplungen unter TBTU Aktivierung durchgeführt. Über alle 53 Kupplungsschritte wurde nach Fmoc-Abspaltung eine Rohausbeute von 35 % erzielt, wobei die Anknüpfung der ersten 47 Aminosäuren mit einer Ausbeute von insgesamt 51 % erheblich erfolgreicher verlief als die Kupplung der letzten sechs Aminosäuren mit nur 68 %.

Die Synthese verlief unter Einsatz von Trityl-geschützten Cysteinen, die bei der unter Schutzgas durchgeführten Abspaltung von der Festphase mit entschützt wurden. Danach

Ergebnisse und Diskussion

wurde das vollständig entschützte, offenkettige Peptid unter Inertgasatmosphäre auf $7.7 \mu\text{M}$ verdünnt. Die anschließende 48 stündige Zyklisierung mit Luftsauerstoff, Ultrafiltration und Aufreinigung mittels HPLC ergab eine Ausbeute von 2.1 %.

Das unglycosylierte, zyklisierte V3-Peptid **13** (MW = 5991.02 g/mol) konnte massenspektrometrisch durch ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal von $m/z = 5992.31$ im MALDI-TOF-Spektrum nachgewiesen werden.

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte anhand von 2D-NMR-Experimenten (s. Abbildung 40).

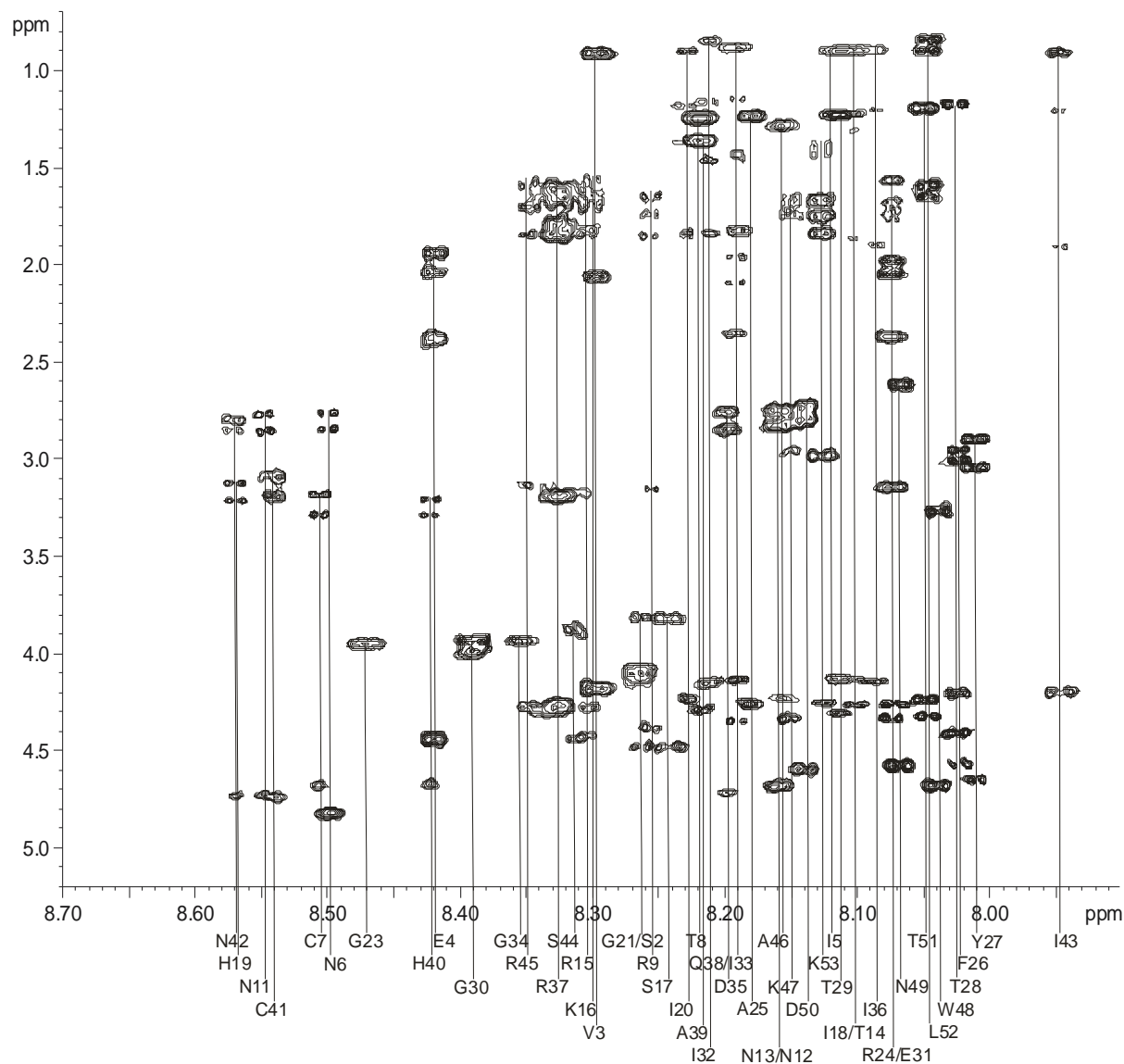


Abbildung 40: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des unglycosylierten 53er-Zylopeptids **13**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3.5.

Wie bereits bei der NMR-Analyse des verkürzten, zyklisierten V3-Peptids **12** beschrieben (s. 4.2.7) traten bei der Aufnahme der Spektren aufgrund einer nur kolloidal vorliegenden Lösung beträchtliche Probleme auf, welche hier noch gravierender in Erscheinung traten. Trotz hinreichender Substanzmenge von 8.4 mg ($1.4 \mu\text{mol}$) ließen sich in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)

nicht sehr gut aufgelöste und weniger intensive Spektren erhalten, was hinsichtlich der deutlich besseren Spektren der offenkettigen Verbindungen (s. 4.2.3 und 4.2.4) auf die zyklisierte Struktur und auf eine daraus resultierende wesentlich andere Konformation zurückgeführt wurde.

Die Aufnahme eines TOCSY-Spektrums diente dabei als Hauptinformationsquelle bei der Zuordnung der Protonenspinsysteme der Aminosäuren und deren ¹H-NMR-chemische Verschiebungen. Dort konnten in der NH-Region 50 NH-Spuren der amidischen Protonen im Bereich von 7.947 bis 8.570 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden (s. Abbildung 40). Die Identifikation der beiden in der Sequenz enthaltenen Proline und der N-terminalen Glutaminsäure erfolgte anhand ihrer CH_α-Spuren bei 4.417, 4.434 und 4.278 ppm. Die Sequenzierung des Peptids gelang durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmung der ³J_{H_{NH}α}-Kopplungskonstanten erfolgte anhand eines DQF-COSY-Spektrums. Die ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen und die ³J_{H_{NH}α}-Kopplungskonstanten sind in Tabelle 24 angeführt (s. 7.3.6).

Wie in Tabelle 6 ersichtlich ist, konnten für das verlängerte Zyklopeptid **13** neben 60 sequenzielle NH_i-NH_{i+1}-Kontakten zwischen den amidischen Protonen auch zwei *long-range* NOE-Kontakte zwischen den β-Protonen der durch die Zyklisierung in räumlicher Nähe stehenden Cysteine beobachtet werden. Im Gegensatz zum verkürzten Zyklopeptid **12** tritt hier jedoch kein zusätzlicher *long-range* NOE-Kontakt zwischen Ile36(NH) und Thr14(γ) auf, was an einer konformationellen Veränderung liegen kann. Im Vergleich zum offenkettigen Peptid **10** führt auch hier die Disulfidverbrückung der Loop zu einer höheren Anzahl an NOE-Kontakten, was für eine weniger flexible und definiere Struktur spricht.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Ile5	Asn6	Ile20	His19	Ile36	Asp35; Arg37
Asn6	Ile5; Cys7	Gly23	Arg24	Arg37	Ile36; Gln38
Cys7	Asn6; Thr8	Arg24	Gly23; Ala25	Gln38	Arg37; Ala39
Thr8	Cys7; Arg9	Ala25	Arg24; Phe26	Ala39	His40; Gln38
Arg9	Thr8	Phe26	Ala25	His40	Ala39; Cys41
Asn11	Asn12	Thr28	Thr29	Cys41	His40; Asn42
Asn12	Asn11	Thr29	Thr28; Gly30	Asn42	Cys41; Ile43
Asn13	Thr14	Gly30	Thr29; Glu31	Ile43	Asn42; Ser44
Thr14	Asn13; Arg15	Glu31	Gly30; Ile32	Ser44	Ile43
Arg15	Thr14	Ile32	Glu31	Arg45	Ala46
Ser17	Ile18	Ile33	Gly34	Ala46	Arg45
Ile18	Ser17; His19	Gly34	Ile33;	Asp50	Asn49; Thr51
His19	Ile18; Ile20	Asp35	Gly34; Ile36	Thr51	Asp50
Weitere strukturelevante NOE-Kontakte					
Cys7 (β')	Cys41 (β')	Cys41 (β)	Cys7 (β)		

Tabelle 6: Strukturelevante NH-NH-NOE-Kontakte des unglycosylierten 53er-Zyklopeptids **13, beobachtet aus der F1-Dimension, sowie andere strukturelevante NOE-Kontakte. Aufgrund einer Signalüberlagerung mit der Diagonalen waren einige NOE's nur auf einer Hälfte des NH-NH-Bereiches des NOESY-Spektrums identifizierbar.**

4.2.9 Synthese des diglycosylierten zyklisierten V3-Peptides **14**

Das zyklisierte Glycopeptid **14** (s. Abbildung 41) stellt hinsichtlich der zu untersuchenden Wirkung der Glycosylierung und der Zyklisierung auf konformative Eigenschaften sowie der CCR5-Bindungsaffinität die Vergleichssubstanz dar gegenüber dem entsprechenden linearen Glycopeptid **11** (s. 4.2.6) und dem zyklisierten Peptid **13** (s. 4.2.8).

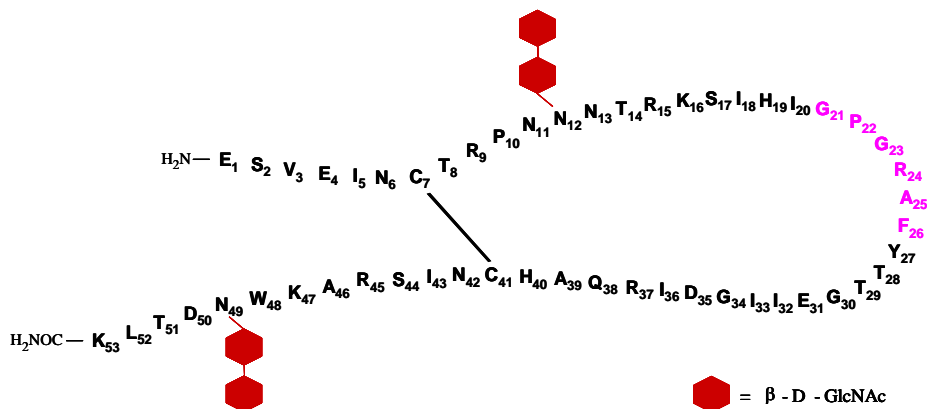


Abbildung 41: Schematische Darstellung des diglycosylierten zyklisierten 53er-Glycopeptids **14**.

Die Darstellung des Glycopeptids erfolgte mittels einer Kombination aus automatisierter und manueller Festphasensynthese. Die Kupplung der gewöhnlichen Aminosäuren wurde dabei mittels automatisierter Synthese durch Dreifachkupplungen unter TBTU Aktivierung erzielt. Die Verknüpfung des Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines **6** wurde jeweils entsprechend den unter 4.2.2 beschriebenen optimierten Bedingungen manuell durchgeführt. Dabei lieferte der Einbau des ersten Glycosylbausteines mittels Zweifachkupplung eine Glycosylierungsausbeute von 83 %. Um die Gesamtsyntheseausbeute zu erhöhen, erfolgte die zweite Glycokupplung unter Dreifachkupplung, wodurch sich die Glycosylierungsausbeute auf 85 % steigern ließ. Über alle 53 Kupplungsschritte konnte nach Fmoc-Abspaltung eine Rohausbeute von 32 % erzielt werden.

Mit Hilfe von Hydrazinhydrat/Methanol (1:5) wurde das Glycopeptid entsprechend den beschriebenen Standardbedingungen am Harz deacetyliert. Bei dieser Synthese wurden Trityl-seitenkettengeschützte Cysteine eingesetzt, die unter den vorliegenden Abspaltbedingungen zusammen mit allen anderen Aminosäuren bei der unter Schutzgas verlaufenden Abspaltung von der Festphase entschützt wurden. Anschließend wurde das vollständig entschützte, offenkettige Glycopeptid unter Sauerstoffausschluss auf 7.8 μM verdünnt und mit Hilfe von Luftsauerstoff für 67 Stunden zyklisiert. Nach Ultrafiltration und Aufreinigung mittels HPLC wurde das diglycosylierte, zyklisierte Glycopeptid **14** in einer Ausbeute von 0.8 % erhalten. Entsprechend der Synthese des korrespondierenden linearen Glycopeptids **11** (s. 4.2.6) führte trotz optimaler Kupplungsausbeuten die aufwendige Aufreinigung aufgrund der Produktzusammensetzung zu erheblichen Ausbeuteverlusten. Nach Aufreinigungsversuchen mittels präparativer RP-HPLC wurde daher in einem zweiten Schritt das bereits vorgereinigte Produkt erfolgreich durch Gelfiltrationschromatographie

Ergebnisse und Diskussion

aufgetrennt. Über eine *Superdex Peptide HR 10/30* Säule wurde isokratisch mittels Wasser/Acetonitril 80:20 eluiert. Dann wurde das noch durch geringe Mengen verschiedener Abbruchpeptide verunreinigte Produkt an einer semipräparativen RP-C₁₈-Säule aufgereinigt. Die Identität des zyklisierten Glycopeptids **14** (MW = 6803.34 g/mol) wurde zunächst durch die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums durch ein [M+H]⁺-Signal von m/z = 6804.51 bestätigt.

Zur genauen Charakterisierung wurden 2D-NMR-Experimente aufgenommen. Hierbei kam es bei der Aufnahme der NMR-Spektren bei pH 3.5 zunächst zu dem Auftreten von Doppelspuren von Aminosäuren im NH-Bereich des TOCSY-Spektrums. Allerdings zeigten sowohl die HPLC-Chromatogramme nach der Aufreinigung als auch das MALDI-TOF-Spektrum der vereinigten Fraktionen des Zielproduktes (s. Abbildung 42) keinerlei Nebenprodukte mehr auf, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass Verunreinigungen nicht dafür verantwortlich waren.

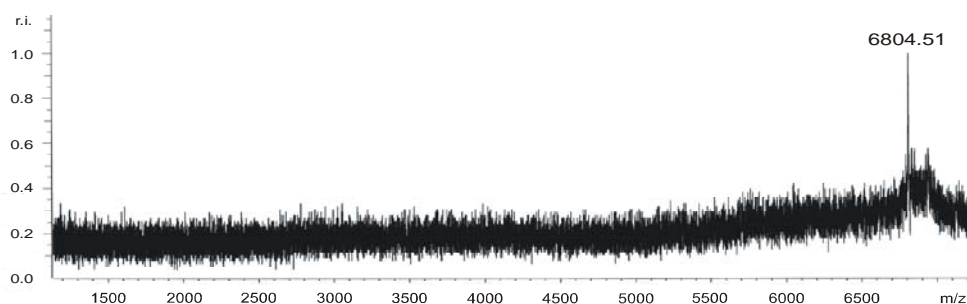


Abbildung 42: MALDI-TOF-Spektrum des aufgereinigten Glycopeptids **14.**

Interessanterweise zeigten die Aminosäuren, die Doppelspuren aufwiesen, nur Unterschiede in der chemischen Verschiebung für die NH-Protonen, die chemischen Verschiebungen der Protonen der jeweiligen Seitenkette waren jedoch nahezu identisch. Dies spricht dafür, dass keine Isomere oder Umlagerungsprodukte vorlagen. Da es sich bei dem zyklisierten Glycopeptid **14** um ein relativ kleines Molekül handelt, war schwer anzunehmen, dass es sich um einen konformativen Effekt handelte. Dies wäre auch in dem Temperaturbereich von 300 K Messtemperatur eher unwahrscheinlich. Dass allerdings nur die NH-Protonen betroffen waren und darüber hinaus nur Doppelspuren von Aminosäuren aus zwei definierten Bereichen der Sequenz auftraten, spricht für einen konformativen Effekt. Dabei wurden Doppelspuren nur im Bereich des GPGRF-Motivs (G23, R24, F26, Y27) und im C-terminalen Bereich außerhalb der zyklisierten V3-Loop (A46, W48, N49, D50, L52, K53) beobachtet. Es wurde vermutet, dass die Ausbildung von Salzbrücken zwischen den NH-NH-Protonen der betreffenden Aminosäuren der beiden aufgeführten Sequenzbereiche zu konformativen Effekten führte. Durch das Ansäuern der Probe sollte dabei diese Problematik durch das Zusammenfallen der Konformere lösbar sein. Die Einstellung und Vermessung der NMR-Probe bei pH 2.5 lieferte dann in der Tat ein Spektrum ohne Doppelspuren von Aminosäuren. Dort konnten in der NH-Region des TOCSY-Spektrums (s. Abbildung 43) 50

Ergebnisse und Diskussion

NH-Spuren der amidischen Protonen der Peptidkette im Bereich von 7.962 bis 8.587 ppm den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Die in der Sequenz enthaltenen zwei Proline wurden anhand ihrer CH_α -Spuren bei 4.421 und 4.438 ppm zugeordnet. Die Identifikation der N-terminalen Glutaminsäure erfolgte ebenso anhand ihrer CH_α -Spur bei 4.279 ppm.

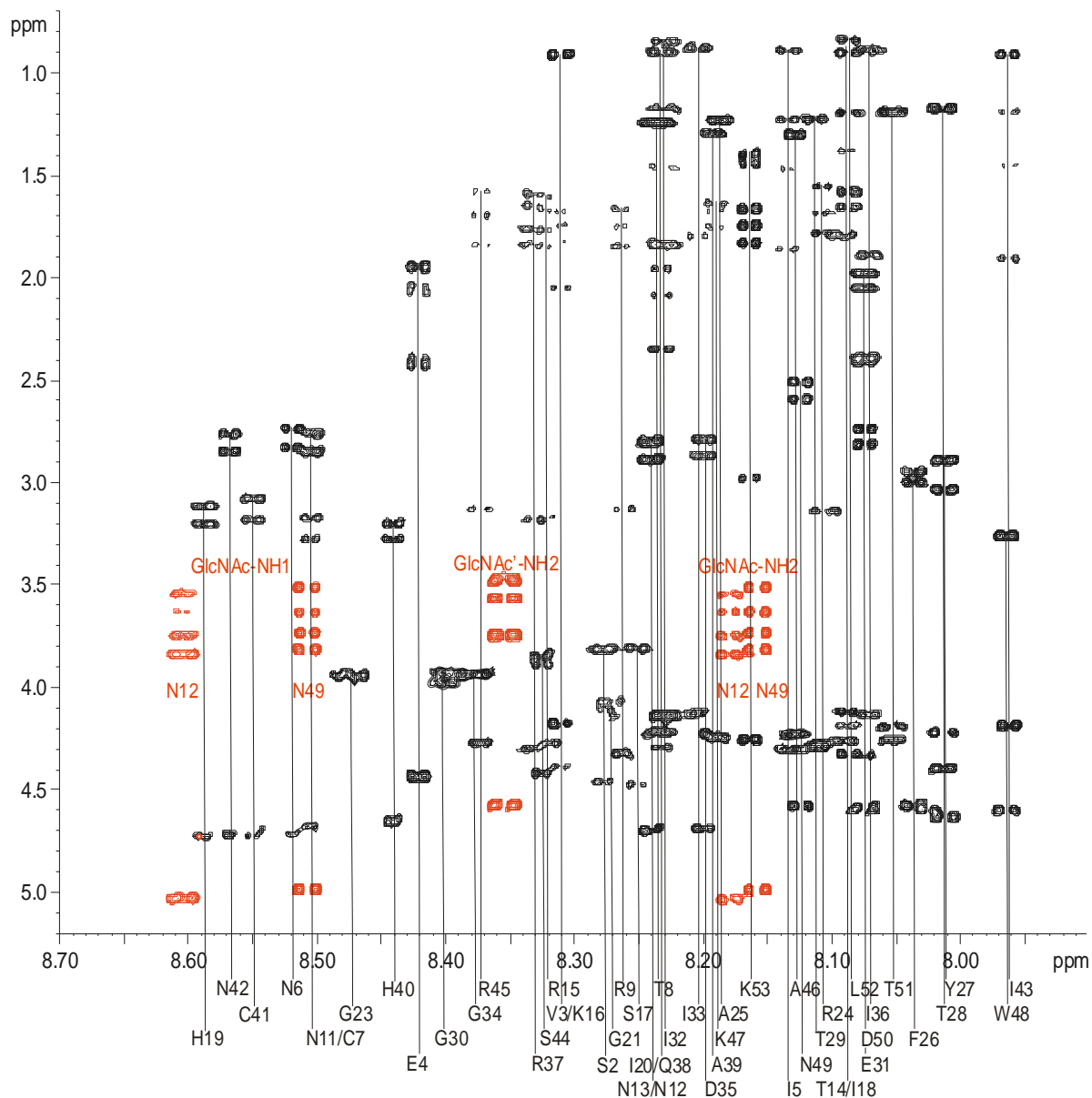


Abbildung 43: Ausschnitt aus der NH-Region des TOCSY-Spektrums des diglycosylierten zyklisierten Glycopeptids **14**. Die Aufnahme erfolgte bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 2.5. Die schwarz eingefärbten Signale stammen von Aminosäuren, die roten von Zuckerprotonen.

Des Weiteren sind in der NH-Region des TOCSY-Spektrums fünf NH-Spuren zu finden, die von den Zuckerprotonen stammen. Für die beiden N-glycosidisch direkt ans Peptid gebundenen N-Acetylglucosamine (GlcNAc), welche jeweils zwei amidische NH-Protonen besitzen, sind jeweils zwei ähnliche NH-Spuren zu beobachten. Diese stammen von der N-glycosidischen Bindung am Asparagin-12 bei 8.603 ppm und der N-Acetylgruppe bei

Ergebnisse und Diskussion

8.179 ppm, sowie von der *N*-glycosidischen Bindung am Asparagin-49 bei 8.506 ppm und der *N*-Acetylgruppe bei 8.157 ppm. Die fünfte NH-Spur bei 8.353 ppm gehört zu den beiden zweiten *N*-Acetylglucosaminen der Chitobiose (GlcNAc'), deren NH-Spuren aufgrund der Ähnlichkeit der chemischen Umgebung nicht dispergiert sind (s. Abbildung 43). Neben dem TOCSY-Spektrum diente die Aufnahme eines DQF-COSY-Experimentes zur vollständigen Zuordnung der Zuckerprotonen durch Analyse der skalaren Kopplungen. Die Sequenzierung des Glycopeptids gelang durch Analyse der sequenziellen NOE-Signale benachbarter Aminosäuren in einem NOESY-Spektrum. Die Bestimmung der $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten erfolgte anhand eines DQF-COSY-Spektrums. Die $^1\text{H-NMR}$ -chemischen Verschiebungen und die $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 25 und 26 angegeben (s. 7.3.7).

Für das zyklisierte Glycopeptid **14** konnten 66 NH-NH-NOE-Kontakte der Peptidkette beobachtet werden (s. Tabelle 7). Im Vergleich zum unglycosylierten, zyklisierten Peptid **13** sind im Bereich der Glycosylierungsstellen an Asn12 zusätzlich zwei und an Asn49 zusätzlich fünf $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+1}$ -Kontakte zu erkennen. Zusätzlich findet man in der jeweiligen Spur der *N*-glycosidischen Protonen die Kreuzsignale zu den β/β' -Protonen der zugehörigen Asparagine und NOE-Kontakte der amidischen NH-Protonen der *N*-Acetylglucosamine zu den entsprechenden Acetylprotonen.

Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt	Aminosäure	NOE-Kontakt
Ile5	Asn6	Arg24	Gly23; Ala25	Ala39	His40
Asn6	Ile5; Cys7	Ala25	Arg24; Phe26	His40	Ala39; Cys41
Cys7	Asn6; Thr8	Phe26	Ala25; Tyr27	Cys41	His40; Asn42
Thr8	Cys7	Thr28	Thr29	Asn42	Cys41; Ile43
Asn11	Asn12; Ile36	Thr29	Thr28; Gly30	Ile43	Asn42; Ser44
Asn12	Asn11; Asn13	Gly30	Thr29; Glu31	Ser44	Ile43
Asn13	Asn12; Thr14	Glu31	Gly30; Ile32	Arg45	Ala46
Thr14	Asn13; Arg15	Ile32	Glu31	Ala46	Arg45
Arg15	Thr14	Ile33	Gly34	Lys47	Trp48
Ile18	His19	Gly34	Ile33; Asp35	Trp48	Lys47; Asn49
His19	Ile18; Ile20	Asp35	Gly34; Ile36	Asn49	Trp48; Asp50
Ile20	His19; Gly21	Ile36	Asp35; Arg37	Asp50	Asn49; Thr51
Gly21	Ile20	Arg37	Ile36; Gln38	Thr51	Asp50
Gly23	Arg24	Gln38	Arg37		
Weitere strukturelevante NOE-Kontakte					
GlcNAc-Asn12(NH1)	Asn12 (β/β')	GlcNAc-Asn12(NH2)	GlcNAc-Asn12(OCH ₃)		
GlcNAc'-Asn12(NH2)	GlcNAc'-Asn12(OCH ₃)				
GlcNAc-Asn49(NH1)	Asn49 (β/β'); Ile5 (α)	GlcNAc-Asn49(NH2)	GlcNAc-Asn49(OCH ₃)		
GlcNAc'-Asn49(NH2)	GlcNAc'-Asn49(OCH ₃)				
Cys7 (β')	Cys41 (β')	Cys41 (β)	Cys7 (β); Thr8 (γ)		
Gly23 (α)	Ile36 (NH)				

Tabelle 7: Strukturelevante NH-NH-NOE-Kontakte des diglycosylierten zyklisierten Glycopeptids **14, beobachtet aus der F1-Dimension, sowie andere strukturelevante NOE-Kontakte. Aufgrund einer Signalüberlagerung mit der Diagonalen waren einige NOE's nur auf einer Hälfte des NH-NH-Bereiches des NOESY-Spektrums identifizierbar.**

Ergebnisse und Diskussion

Darüber hinaus trat im Bereich der innerhalb der Loop liegenden Glycosylierungsstelle ein strukturell relevanter *long-range* NOE-Kontakt zwischen Asn11(NH) und Ile36(NH) auf. Für die C-terminale Glycosylierungsstelle an Asn49 war außerdem ein *long-range* Kontakt zwischen GlcNAc(NH1) und Ile5(α) zu beobachten. Die verlängerten Enden der V3 befinden sich offensichtlich aufgrund der Glycosylierung deutlicher in räumlicher Nähe. Aus der höheren Anzahl an NOE-Kontakten und dem Auftreten von *long-range* NOEs ist ersichtlich, dass die Beweglichkeit im Bereich der Glycosylierungsstellen eingeschränkt ist, dort die Struktur, bedingt durch die Glycosylierung, also besser definiert ist. In Übereinstimmung zum zyklisierten Peptid **13** sind auch hier, bedingt durch die Zyklisierung der Loop, *long-range* Kontakte zwischen den β -Protonen der disulfidverbrückten Cysteine zu finden. Darüber hinaus trat allerdings ein zusätzlicher Kontakt zwischen Cys41(β) und Thr8(γ) auf. Gegenüber Peptid **13** konnten für den GPGRAF-Bereich zusätzlich drei NH_i-NH_{i+1} -Kontakte beobachtet werden, außerdem trat dort ein *long-range* NOE zwischen Gly23(α) und Ile36(NH) auf. Dies deutet darauf hin, dass die Struktur der GPGRAF-Domäne in der glycosylierten Form besser definiert ist, als die entsprechende Region in der unglycosylierten Loop. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass sich die glycosylierte, zyklisierte Verbindung **14** in ihrer Konformation deutlich sowohl von der unglycosylierten Loop **13** als auch von der entsprechenden glycosylierten, offenkettigen Form **11** unterscheidet. Darüber hinaus ist zu bemerken, dass aufgrund der Signalvielfalt eine eindeutige Zuweisung weiterer NOE-Kontakte im NOESY-Spektrum schwierig zu bewerkstelligen war.

4.3 NMR-spektroskopischer Vergleich und konformative Untersuchung der synthetisierten V3-Verbindungen

Einen Hinweis in bezug auf vorhandene Unterschiede in der 3D-Struktur der synthetisierten Verbindungen ergibt sich aus der vergleichenden Betrachtung der TOCSY-Spektren. Da die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen abhängig sind von der jeweiligen Sekundärstruktur, liefert ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen einen interessanten Einblick, inwieweit die Glycosylierung, Zyklisierung und der erweiterte N-terminale Bereich der V3-Loop einen Einfluss auf die Flexibilität und die 3D-Struktur hat.

4.3.1 Vergleich des offenkettigen V3-Glycopeptides 11 und des offenkettigen V3-Peptides 10

Ein Vergleich der ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen der Peptidkette des offenkettigen Glycopeptids 11 und des entsprechenden offenkettigen Peptids 10 liefert Hinweise auf glycosylierungsbedingte Unterschiede in der 3D-Struktur. Dazu sind in Abbildung 44 die NH-Bereiche der beiden TOCSY-Spektren zum direkten Vergleich übereinander gelegt (s. auch Tabelle 8).

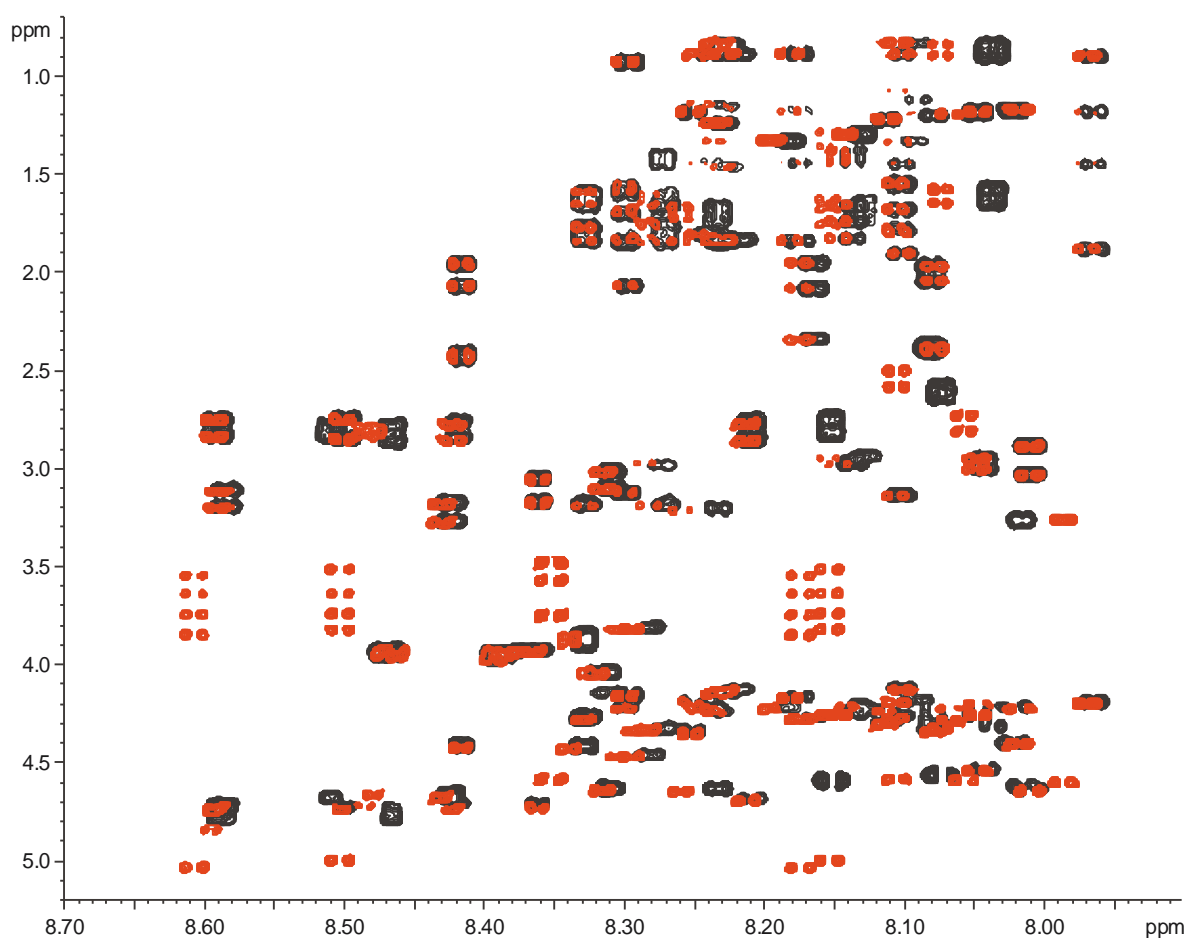


Abbildung 44: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des offenkettigen Glycopeptids 11 (rot) und des offenkettigen Peptids 10 (schwarz). Die Aufnahmen erfolgten jeweils bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3.5.

Ergebnisse und Diskussion

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Ser2	0.010	Lys16	0.014	Gly30	0.000	Ile43	0.005
Val3	0.003	Ser17	0.013	Glu31	-0.002	Ser44	0.010
Glu4	0.000	Ile18	0.014	Ile32	0.009	Arg45	0.001
Ile5	0.006	His19	0.007	Ile33	0.011	Ala46	0.012
Asn6	0.004	Ile20	0.007	Gly34	0.005	Lys47	-0.059
Cys7	0.001	Gly21	0.011	Asp35	0.004	Trp48	-0.028
Thr8	0.002	Gly23	-0.003	Ile36	0.000	Asn49	0.032
Arg9	0.026	Arg24	0.004	Arg37	0.002	Asp50	-0.094
Asn11	-0.029	Ala25	0.007	Gln38	0.012	Thr51	0.001
Asn12	0.068	Phe26	0.005	Ala39	0.014	Leu52	0.036
Asn13	-0.044	Tyr27	0.000	His40	0.007	Lys53	0.011
Thr14	-0.009	Thr28	-0.004	Cys41	0.005		
Arg15	0.012	Thr29	0.000	Asn42	0.004		

Tabelle 8: Unterschiede der ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des offenkettigen Glycopeptids **11** und des entsprechenden offenkettigen Peptids **10**.

Es ist dabei anhand der TOCSY-Spektren zu erkennen, dass erwartungsgemäß die deutlichsten Unterschiede im Bereich der Glycosylierungsstellen an Asn12 und an Asn49 auftreten. Für die innerhalb der V3-Region liegenden Glycosylierungsstelle an Asn12 weist die glycosylierte Aminosäure Asn12 selbst mit 0.068 ppm den stärksten Unterschied in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen auf. Die direkt benachbarten Aminosäuren zeigen dabei zwar weniger ausgeprägte aber dennoch signifikante Änderungen von -0.029 ppm für Asn11 und -0.044 ppm für Asn13. Aber auch für Arg9 konnte mit einem Unterschied von 0.026 ppm noch eine deutliche Abweichung beobachtet werden. Darüber hinaus sind weniger ausgeprägte Unterschiede in der chemischen Verschiebung im C-terminalen Bereich bei Arg15, Lys16, Ser17 und Ile18 mit Beträgen zwischen 0.012 ppm und 0.014 ppm festzustellen, die sich ebenfalls auf die Nähe zur Glycosylierungsstelle zurückführen lassen. Für die zweite C-terminal gelegene Glycosylierungsstelle an Asn49 ($\Delta\delta = 0.032$ ppm) zeigt Asp50, welches sich C-terminal in unmittelbarer Nachbarschaft befindet, einen besonders auffälligen Unterschied von -0.094 ppm und auch das N-terminale Lys47 ($\Delta\delta = -0.059$ ppm) weist eine deutliche Abweichung auf. Ein weniger ausgeprägter Unterschied dort ist mit -0.028 ppm für Trp48 und 0.036 ppm für Leu52 zu beobachten und auch Ala46 zeigt mit 0.012 noch eine Änderung auf. Außerhalb der beiden Glycosylierungsstellen sind darüber hinaus nur noch für Gln38 ($\Delta\delta = 0.012$ ppm) und für Ala39 ($\Delta\delta = -0.014$ ppm) erwähnenswerte Unterschiede zu beobachten. Diese Veränderungen der chemischen Verschiebungen lassen sich allerdings nicht auf die Nähe zu den Glycosylierungen zurückführen. Da jedoch für das offenkettige Glycopeptid **11** im NOESY-Spektrum keinerlei *long-range* NOE-Kontakte gefunden wurden, ist sehr unwahrscheinlich, dass konformativ durch eine *loop*-artige Struktur ein direkter *trans-loop*-Kontakt zwischen einem Chitobiosylrest und den beiden erwähnten Aminosäuren dafür verantwortlich ist. Die übrigen Aminosäuren haben nahezu die gleichen chemischen Verschiebungen und zeigen somit ein von der Glycosylierung unabhängiges Verhalten. Insgesamt deuten die Unterschiede der chemischen

Verschiebung der Protonenresonanzen des Peptidrückgrats auf eine von der unglycosylierten Verbindung abweichende Konformation hin. Es wird angenommen, dass die Glycosylierung eine weitgehende Streckung des Peptidrückgrats im Bereich der Glycosylierungsstellen zur Folge hat, wodurch diese Bereiche besser definierte Strukturen aufweisen. Des Weiteren wird vermutet, dass daher die Glycosylierung einen stabilisierenden Effekt für die 3D-Struktur hat.

4.3.2 Vergleich des zyklisierten V3-Glycopeptides **14** und des zyklisierten V3-Peptides **13**

Wie anhand der TOCSY-Spektren (s. Abbildung 45 und Tabelle 9) zu erkennen ist, sind die Unterschiede in der chemischen Verschiebung zwischen dem zyklischen Glycopeptid **14** und dem entsprechenden zyklischen Peptid **13** deutlich ausgeprägter, als es bei den offenkettigen Verbindungen **11** und **10** zu beobachten war. Allerdings ist der Vergleich zwischen diesen Spektren schwierig, da sie nicht bei identischen pH-Werten vermessen wurden und dieser Einfluss auf die chemischen Verschiebungen hat. Jedoch sind zahlreiche Werte nahezu gleich und die Abweichungen konzentrieren sich in erster Linie auf die Glycosylierungsstellen, weshalb die Unterschiede in der chemischen Verschiebung eine Interpretation zu lassen.

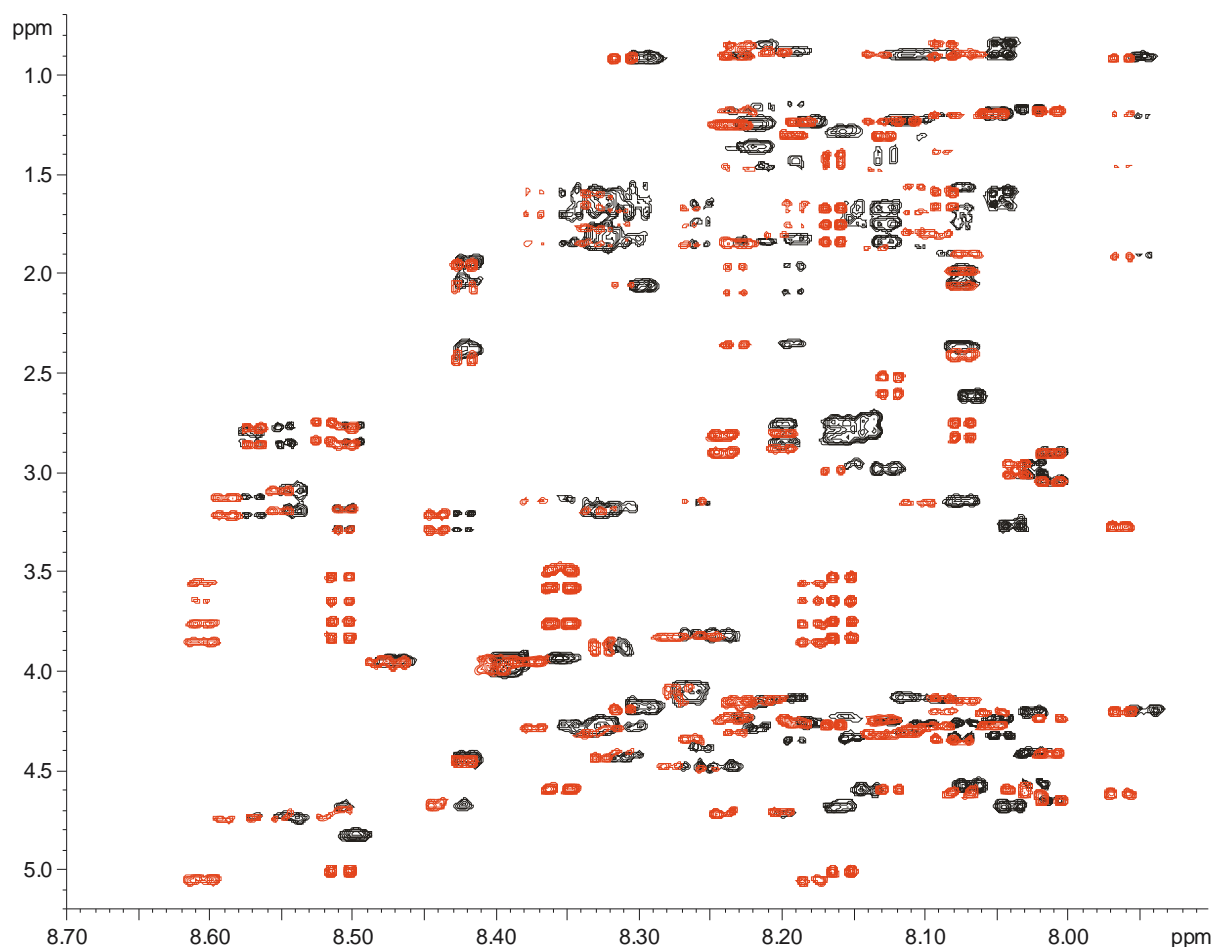


Abbildung 45: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des zyklisierten Glycopeptides **14** (rot) und des zyklisierten Peptids **13** (schwarz). Die Aufnahme des Glycopeptids erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 2.5, die des Peptids bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

Ergebnisse und Diskussion

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Ser2	0.015	Lys16	0.012	Gly30	0.002	Ile43	0.015
Val3	0.013	Ser17	0.007	Glu31	0.000	Ser44	0.011
Glu4	0.001	Ile18	-0.015	Ile32	0.019	Arg45	0.023
Ile5	0.017	His19	0.020	Ile33	0.012	Ala46	-0.030
Asn6	0.024	Ile20	0.002	Gly34	0.023	Lys47	0.038
Cys7	-0.004	Gly21	0.008	Asp35	0.001	Trp48	-0.073
Thr8	0.015	Gly23	0.000	Ile36	-0.015	Asn49	0.054
Arg9	0.011	Arg24	0.035	Arg37	0.004	Asp50	-0.066
Asn11	-0.043	Ala25	0.007	Gln38	0.039	Thr51	0.004
Asn12	0.079	Phe26	0.028	Ala39	-0.025	Leu52	0.040
Asn13	0.081	Tyr27	0.000	His40	0.018	Lys53	0.037
Thr14	-0.015	Thr28	-0.011	Cys41	0.009		
Arg15	0.017	Thr29	-0.001	Asn42	-0.003		

Tabelle 9: Unterschiede der ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des zyklisierten Glycopeptids **14** und des entsprechenden zyklisierten Peptids **13**.

Es ist dabei ersichtlich, dass wiederum im Bereich der Glycosylierungsstellen an Asn12 und an Asn49 die deutlichsten Abweichungen auftreten. Für die innerhalb der V3-Loop liegenden Glycosylierungsstelle an Asn12 weist die glycosylierte Aminosäure Asn12 selbst mit 0.079 ppm neben dem unmittelbar benachbarten Asn13 mit 0.081 ppm den stärksten Unterschied in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen auf. Die N-terminal direkt benachbarte Aminosäure Asn11 zeigt dabei zwar eine weniger ausgeprägte aber dennoch signifikante Änderungen von -0.043 ppm. Darüber hinaus sind weniger ausgeprägte Unterschiede in der chemischen Verschiebung im benachbarten C- und N-terminalen Bereich festzustellen, die sich ebenfalls auf die Nähe zur Glycosylierungsstelle zurückführen lassen. Interessanterweise ist ein deutlicher Unterschied bei Ser2 ($\Delta\delta = 0.015$ ppm), Val3 ($\Delta\delta = 0.013$ ppm), Ile5 ($\Delta\delta = 0.017$ ppm) und Asn6 ($\Delta\delta = 0.024$ ppm) zu beobachten, der sich allerdings nicht auf die räumliche Nähe zu der Glycosylierung an Asn12 zurückführen lässt. Wie aus dem NOESY-Spektrum des zyklisierten Glycopeptids **14** zu erkennen war (s. Tabelle 7), liegt dort ein *long-range* NOE-Kontakt zwischen GlcNAc(NH1)-Asn49 und Ile5(α) vor. Die verlängerten Enden der glycosylierten V3-Loop befinden sich offensichtlich aufgrund der Zyklisierung in deutlicher räumlicher Nähe, weshalb dort ein direkter Kontakt zu Ile5 auftritt. Die C-terminale Glycosylierung an Asn49 bewirkt somit eine Konformationsänderung der N-terminalen Peptidkette, wodurch diese Region eine besser definierte Struktur aufweist. Für diese C-terminal außerhalb der Loop gelegene Glycosylierungsstelle an Asn49 ($\Delta\delta = 0.054$ ppm) zeigen die unmittelbar benachbarten Aminosäuren Asp50 ($\Delta\delta = -0.066$ ppm) und Trp48 ($\Delta\delta = -0.073$ ppm) einen besonders auffälligen Unterschied. Aber auch die weiter benachbarten Aminosäuren Arg45 ($\Delta\delta = 0.023$ ppm), Ala46 ($\Delta\delta = -0.030$ ppm), Lys47 ($\Delta\delta = 0.038$ ppm), sowie Leu52 ($\Delta\delta = 0.040$ ppm) und Lys53 ($\Delta\delta = 0.037$ ppm) weisen eine deutliche Abweichung auf. Außerhalb der beiden Glycosylierungsstellen sind darüber hinaus im GPGRAF-Bereich für Arg24 und Phe26 ($\Delta\delta = 0.035$ ppm und 0.028 ppm) deutliche Unterschiede zu erkennen, die sich allerdings nicht auf die direkte Nähe zu

den Glycosylierungen zurückführen lassen. Allerdings konnte im NOESY-Spektrum des zyklisierten Glycopeptids **14** in dieser Region für die α -Protonen des Gly23 ein *long-range* NOE zu Ile36(NH) festgestellt werden, woraus auch eine Änderung der chemischen Umgebung für Arg24 und Phe26 resultieren kann. Der entsprechende Kontaktbereich in der V3-Loop zeigt auch für die Region um Ile36 ($\Delta\delta = 0.015$ ppm) auffällige Unterschiede in der chemischen Verschiebung für Gln38, Ala39 und His40 ($\Delta\delta = 0.039$ ppm, -0.025 ppm und 0.018 ppm). Abweichungen dort sind auch zu beobachten für die N-terminale Nachbarschaft des Ile36 für Ile32, Ile33 und Gly34 mit Beträgen um 0.020 ppm. Darüber hinaus ist im NOESY-Spektrum für das Ile36(NH) selbst ein *trans-loop*-Kontakt zu Asn11(NH) festgestellt worden. Die übrigen Aminosäuren haben nahezu die gleichen chemischen Verschiebungen. Die Glycosylierung des Peptidrückgrats zeigt somit einen starken Einfluss auf die Konformation der Aminosäuren in diesen Bereichen. Die Ergebnisse deuten in Übereinstimmung zum Vergleich der offenkettigen Verbindungen **11** und **10** (s. 4.3.1) darauf hin, dass die Beweglichkeit im Bereich der Glycosylierungsstellen stark eingeschränkt ist, dort die Struktur, bedingt durch die Glycosylierung, also gestreckter und erheblich besser definiert ist. Allerdings ist für die zyklischen Verbindungen **14** und **13** insgesamt ein viel ausgeprägter Unterschied in den chemischen Verschiebungen zu beobachten. Dies spricht für einen stärkeren konformationellen Einfluss der Glycosylierungen auf die zyklisierten Verbindungen gegenüber den offenkettigen Formen. Durch die Disulfidverbrückung der Loop wird das Peptidrückgrat zwar erheblich in seiner 3D-Struktur festgelegt, jedoch scheint die zweifache Glycosylierung durch den konformationellen Einfluss der Zucker zusätzlich einen starken stabilisierenden Effekt auf die 3D-Struktur auszuüben.

4.3.3 Vergleich des zyklisierten V3-Glycopeptides 14 und des offenkettigen V3-Glycopeptides 11

Die vergleichende Betrachtung der TOCSY-Spektren des zyklisierten Glycopeptids **14** und des entsprechenden offenkettigen Glycopeptids **11** zeigt deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung der amidischen Protonen auf (s. Abbildung 46 und Tabelle 10). Gegenüber den vorherigen Vergleichen zwischen den glycosylierten und nicht glycosylierten Verbindungen (s. 4.3.1 und 4.3.2) wurden hier insgesamt stärkere Abweichungen beobachtet. Allerdings ist auch hier der Vergleich zwischen diesen Spektren schwierig, da sie nicht bei identischen pH-Werten vermessen wurden, was Einfluss auf die chemischen Verschiebungen hat. Jedoch ist kein homogener *Shift* zu beobachten und zahlreiche Werte sind nahezu gleich, weshalb die Unterschiede in der chemischen Verschiebung eine Interpretation zu lassen. Große Unterschiede in der chemischen Verschiebung zeigen dabei erwartungsgemäß die beiden Cysteine ($\Delta\delta = 0.141$ ppm und 0.233 ppm), die ihre Ursache in der Zyklisierung finden. Darüber hinaus weisen Asn12 ($\Delta\delta = -0.247$ ppm) und Asn13 ($\Delta\delta = -0.183$ ppm) im Bereich der innerhalb der V3 liegenden Glycosylierung ausgeprägte Abweichungen auf.

Ergebnisse und Diskussion

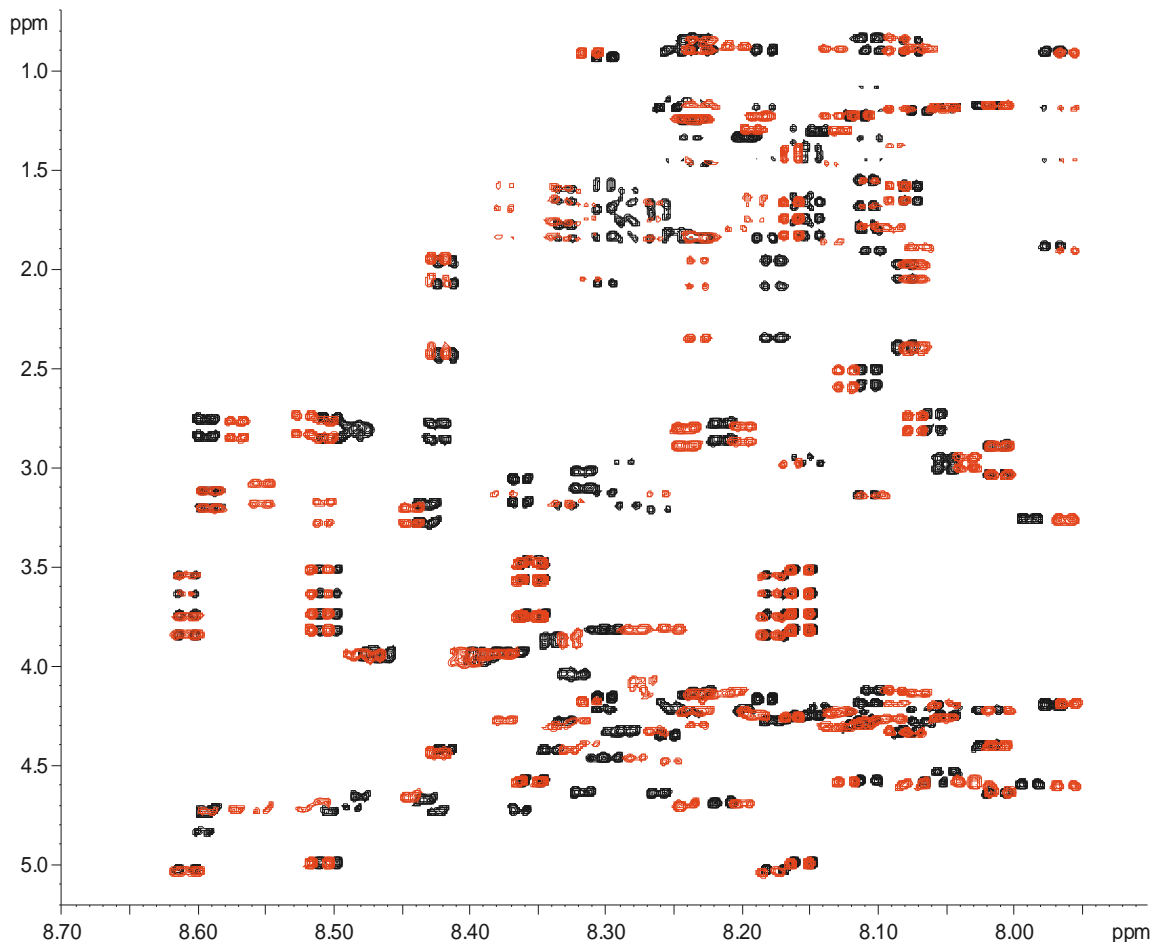


Abbildung 46: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des zyklisierten Glycopeptids **14** (rot) und des offenkettigen Glycopeptids **11** (schwarz). Die Aufnahme des zyklisierten Glycopeptids erfolgte bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 2.5, die des offenkettigen Glycopeptids bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Ser2	-0.030	Lys16	0.021	Gly30	0.009	Ile43	-0.010
Val3	0.010	Ser17	-0.046	Glu31	-0.006	Ser44	-0.015
Glu4	0.003	Ile18	-0.019	Ile32	-0.007	Arg45	0.071
Ile5	-0.049	His19	-0.005	Ile33	-0.026	Ala46	-0.016
Asn6	0.016	Ile20	-0.016	Gly34	0.006	Lys47	0.032
Cys7	0.141	Gly21	-0.054	Asp35	-0.016	Trp48	-0.025
Thr8	-0.019	Gly23	0.003	Ile36	-0.033	Asn49	0.016
Arg9	0.002	Arg24	-0.001	Arg37	0.000	Asp50	0.014
Asn11	0.024	Ala25	-0.049	Gln38	0.055	Thr51	0.005
Asn12	-0.247	Phe26	0.000	Ala39	-0.005	Leu52	0.011
Asn13	-0.183	Tyr27	0.000	His40	0.009	Lys53	0.015
Thr14	0.018	Thr28	-0.006	Cys41	0.233		
Arg15	0.036	Thr29	-0.003	Asn42	-0.027		
GlcNAc-NH		$\Delta\delta$ [ppm]					
GlcNAc-NH1-Asn12		-0.004		GlcNAc-NH2-Asn12		0.003	
GlcNAc'-NH2-Asn12		0.000		GlcNAc-NH2-Asn42		0.002	
GlcNAc-NH1-Asn42		0.003					
GlcNAc'-NH2-Asn42		0.000					

Tabelle 10: Unterschiede der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des zyklisierten Glycopeptids **14** und des offenkettigen Glycopeptids **11**.

Es ist daher anzunehmen, dass die Disulfidverbrückung der Cysteine auch eine stärkere Wechselwirkung des Zuckerrestes an Asn12 und damit verbunden eine Beeinflussung der Konformation in der dortigen Region bewirkt.

Die amidischen Protonen der Zuckerreste selbst zeigen nahezu die gleichen chemischen Verschiebungen, zeigen somit keinen signifikanten konformationellen Einfluss aufgrund der Zyklisierung. Insgesamt sind für die Spektren des zyklischen und offenkettigen Glycopeptids **14** und **11** deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung zu beobachten. Die Disulfidverbrückung des Glycopeptids hat also einen großen Einfluss auf die 3D-Struktur. Allerdings sind die Unterschiede geringer als erwartet. Die in anderen Arbeiten¹⁰⁷ festgestellte Einflussnahme nur einer Glycosylierung, nämlich die innerhalb der V3, auf die Gesamtstruktur des Peptidrückgrats scheint in der Stärke und Ausdehnung dort viel geringer zu sein als die durch eine Zyklisierung der Loop hervorgerufenen Veränderungen. Die Zyklisierung der zweifach glycosylierten Verbindung **14** scheint dabei einen kleineren konformationellen Effekt gegenüber dem entsprechenden linearen Glycopeptid auszuüben. Die zweite C-terminal gelegene Glycosylierung hat somit einen zusätzlichen starken stabilisierenden Effekt, so dass sich die 3D-Strukturen der beiden Verbindungen nicht grundlegend unterscheiden.

4.3.4 Vergleich der verkürzten V3-Peptide **9** und **12** mit den V3-Peptiden **10** und **13**

Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen der V3-Peptide **10** und **13** mit den korrespondierenden verkürzten Peptiden **9** und **12** liefert Hinweise auf einen konformationellen Einfluss des erweiterten N-terminalen Bereiches der V3-Loop.

Die vergleichende Betrachtung der TOCSY-Spektren (s. Abbildung 47) des offenkettigen 53er-Peptids **10** und des N-terminal um sechs Aminosäuren verkürzten offenkettigen Peptids **9** zeigt erwartungsgemäß die größten Unterschiede in den zum N-terminalen Ende benachbarten Aminosäuren (s. Tabelle 11). Dabei wurde für Arg9/3 eine sehr deutliche Abweichung von $\Delta\delta = -0.276$ ppm beobachtet. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die elektronische Umgebung aufgrund der fehlenden Aminosäuren im verkürzten Peptid eine andere ist. Darüber hinaus kann die fehlende N-terminale Flanke auch voneinander abweichende Konformationen der benachbarten Aminosäuren induzieren. Dies führt letztendlich zu Unterschieden in der chemischen Verschiebung. Des Weiteren wurde noch eine erwähnenswerte Abweichung für Asn12/6 von $\Delta\delta = -0.027$ ppm beobachtet.

Darüber hinaus konnten bis auf wenige Abweichungen keine weiteren ausgeprägten Unterschiede in der chemischen Verschiebung festgestellt werden. Dies ist in anbetracht fehlender strukturgebender und somit stabilisierender Faktoren wie einer Glycosylierung oder Zyklisierung nicht überraschend. Es scheinen somit keine großen strukturellen

Ergebnisse und Diskussion

Unterschiede beider Verbindungen vorzuliegen, wobei beide linearen Peptide keine bevorzugte Konformation einzunehmen scheinen.

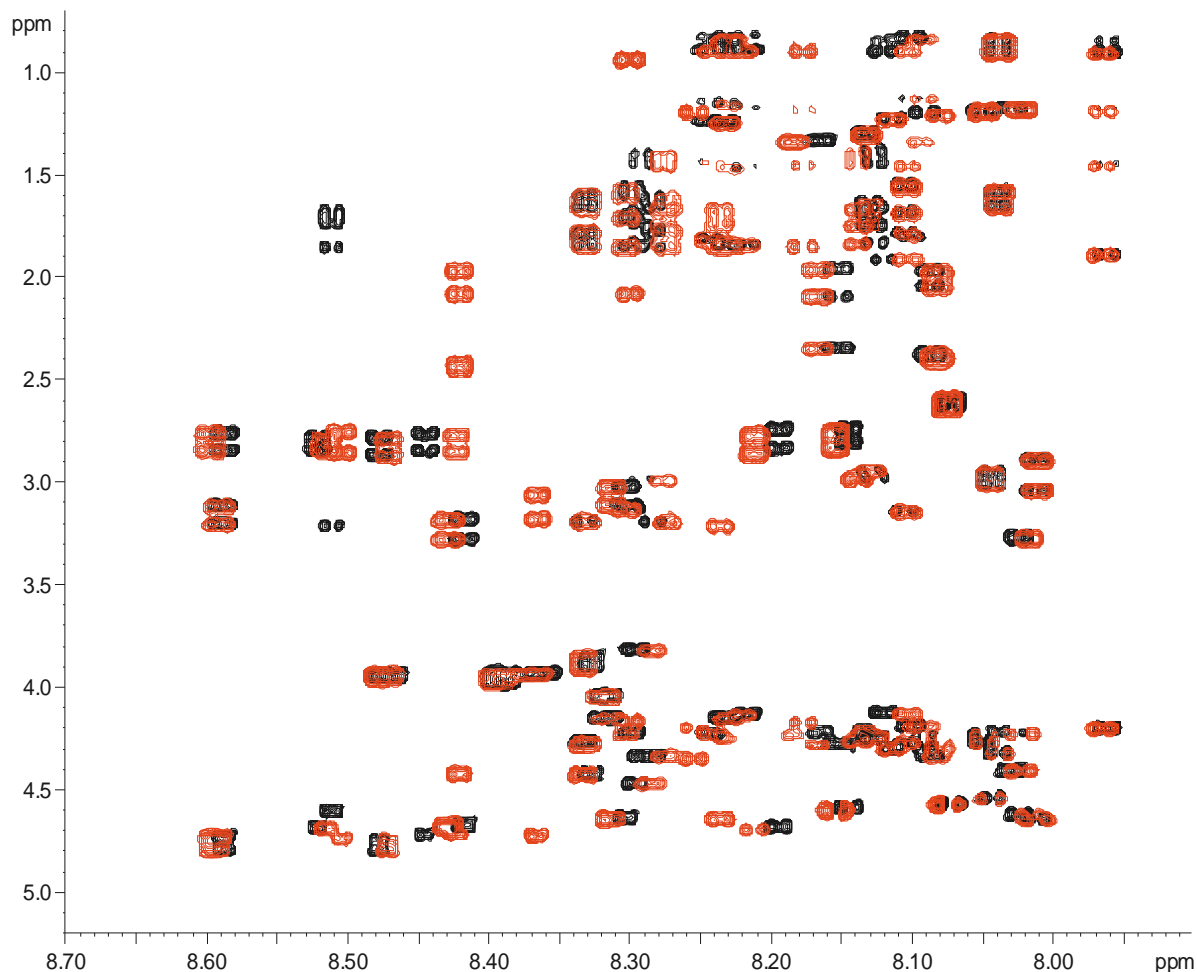


Abbildung 47: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des offenkettigen 53er-Peptids 10 (rot) und des offenkettigen verkürzten 47er-Peptids 9 (schwarz). Die Aufnahmen erfolgten jeweils bei 300 K in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3.5.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Thr8/2	0.006	Ile20/14	-0.001	Ile32/26	-0.004	Ile43/37	0.005
Arg9/3	-0.276	Gly21/15	-0.002	Ile33/27	0.002	Ser44/38	0.003
Asn11/5	-0.010	Gly23/17	0.001	Gly34/28	0.005	Arg45/39	-0.003
Asn12/6	-0.027	Arg24/18	-0.001	Asp35/29	0.017	Ala46/40	0.000
Asn13/7	-0.010	Ala25/19	-0.003	Ile36/30	-0.016	Lys47/41	-0.014
Thr14/8	-0.012	Phe26/20	0.003	Arg37/31	-0.003	Trp48/42	-0.007
Arg15/9	-0.011	Tyr27/21	0.000	Gln38/32	0.014	Asn49/43	0.003
Lys16/10	-0.018	Thr28/22	-0.006	Ala39/33	0.020	Asp50/44	0.009
Ser17/11	-0.012	Thr29/23	0.001	His40/34	0.008	Thr51/45	-0.002
Ile18/12	-0.007	Gly30/24	0.001	Cys41/35	0.009	Leu52/46	0.002
His19/13	-0.002	Glu31/25	-0.005	Asn42/36	0.005	Lys53/47	0.012

Tabelle 11: Unterschiede der ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des offenkettigen 53er-Peptids 10 und des offenkettigen verkürzten 47er-Peptids 9.

Die Betrachtung der TOCSY-Spektren des zyklisierten 53er-Peptids 13 und des N-terminal um sechs Aminosäuren verkürzten zyklischen Peptids 12 zeigt gegenüber dem vorherigen

Ergebnisse und Diskussion

Vergleich der offenkettigen Verbindungen deutlich größere Abweichungen in der chemischen Verschiebung auf (s. Abbildung 48 und Tabelle 12).

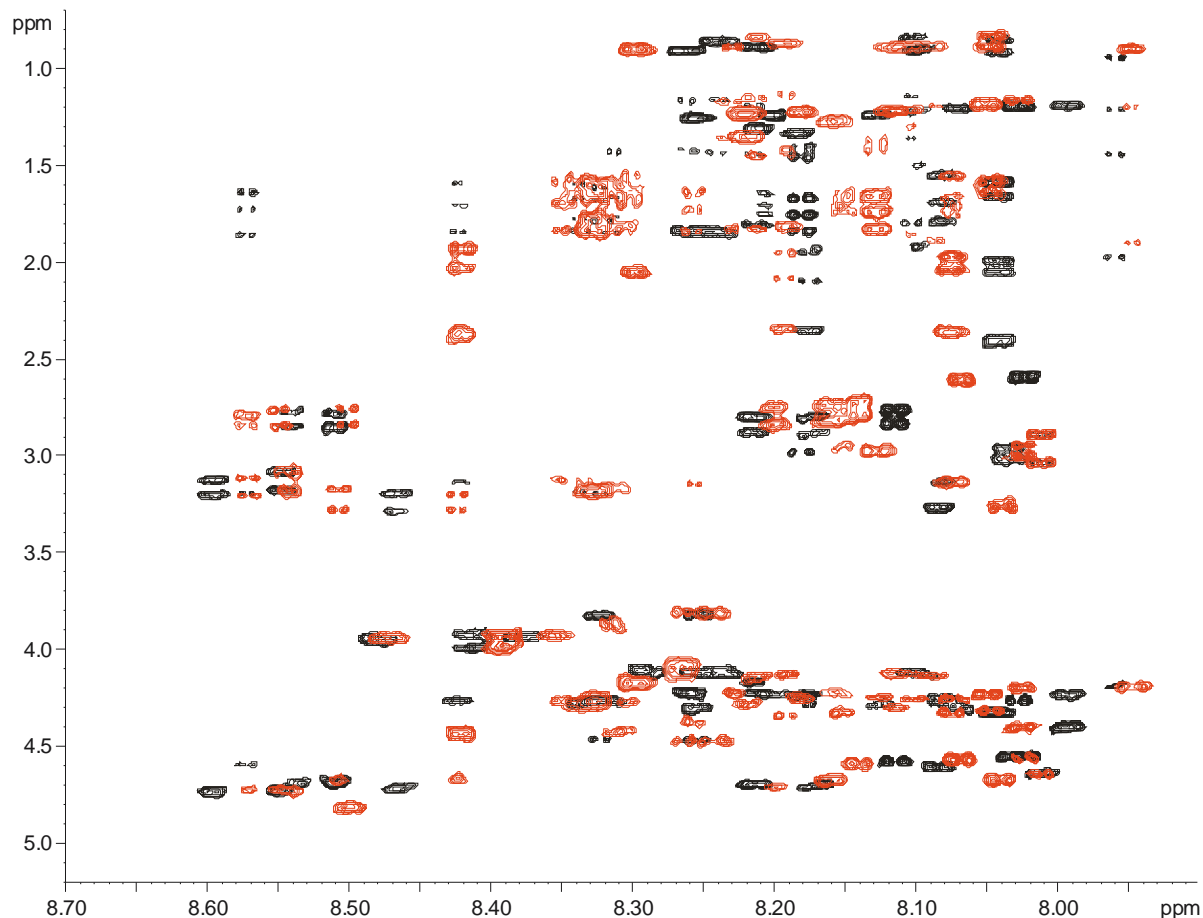


Abbildung 48: Ausschnitte aus den TOCSY-Spektren des zyklisierten 53er-Peptids 13 (rot) und des zyklisierten verkürzten 47er-Peptids 12 (schwarz). Die Aufnahmen erfolgten jeweils bei 300 K in H₂O/D₂O (9:1) bei pH 3.5.

AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]	AS	$\Delta\delta$ [ppm]
Thr8/2	-0.035	Ile20/14	-0.033	Ile32/26	-0.031	Ile43/37	-0.011
Arg9/3	-0.320	Gly21/15	-0.027	Ile33/27	-0.022	Ser44/38	-0.009
Asn11/5	0.037	Gly23/17	-0.008	Gly34/28	-0.021	Arg45/39	-0.075
Asn12/6	-0.017	Arg24/18	-0.011	Asp35/29	-0.016	Ala46/40	-0.025
Asn13/7	-0.009	Ala25/19	-0.019	Ile36/30	-0.012	Lys47/41	-0.058
Thr14/8	0.032	Phe26/20	-0.011	Arg37/31	-0.010	Trp48/42	-0.048
Arg15/9	-0.020	Tyr27/21	0.000	Gln38/32	0.018	Asn49/43	0.046
Lys16/10	-0.018	Thr28/22	0.030	Ala39/33	0.006	Asp50/44	0.024
Ser17/11	-0.011	Thr29/23	-0.014	His40/34	-0.042	Thr51/45	0.021
Ile18/12	0.090	Gly30/24	-0.018	Cys41/35	-0.007	Leu52/46	0.005
His19/13	-0.029	Glu31/25	0.033	Asn42/36	0.029	Lys53/47	-0.054

Tabelle 12: Unterschiede der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der amidischen Protonen des zyklisierten 53er-Peptids 13 und des zyklisierten verkürzten 47er-Peptids 12.

Es sind dabei Unterschiede nahezu aller Amidprotonen festzustellen mit Beträgen von $\Delta\delta = 0.005$ ppm bis 0.320 ppm, wobei mehr als 84 % der Aminosäuren Differenzen von mindestens 0.010 ppm und 57 % der Aminosäuren einen Unterschied von mehr als 0.020

ppm aufweisen. Die größte Abweichung ist dabei wiederum für Arg9/3 ($\Delta\delta = -0.320$ ppm) zu beobachten, welches benachbart zur veränderten N-terminalen Flanke liegt. Außerdem zeigen Thr8/2 ($\Delta\delta = -0.035$ ppm) und Asn11/5 ($\Delta\delta = -0.037$ ppm) deutliche Unterschiede auf, die sich ebenfalls auf die Nachbarschaft zum veränderten N-terminalen Bereich zurückführen lassen. Die Differenz des nicht mehr benachbart liegenden Thr14/8 ($\Delta\delta = 0.032$ ppm) kann ihre Ursache in dem nur für das verkürzte Zyklopeptid **12** beobachteten *long-range* NOE-Kontakt zwischen Ile36/30(NH) und Thr14/8(γ) finden. Darüber hinaus sind signifikante Abweichungen für nahezu sämtliche Aminosäuren der C-terminal außerhalb der zyklisierten Loop liegenden Region zu sehen. Dies spricht dafür, dass durch die Zyklisierung ein deutlicher Kontakt zwischen den beiden verlängerten Enden des Peptids **13** vorhanden ist, woraus eine veränderte chemische Umgebung der Aminosäuren resultiert. Da allerdings innerhalb der zyklisierten V3 zwar insgesamt geringere dennoch große Unterschiede in der chemischen Verschiebung zu finden sind, liegt darüber hinaus wahrscheinlich ein konformationeller Effekt vor. Die zusätzliche N-terminale Flanke der zyklisierten Loop scheint eine strukturgebende und stabilisierende Wirkung auf die Gesamtstruktur zu haben. Es ist somit gut möglich, dass sich die 3D-Strukturen beider Verbindungen unterscheiden.

4.4 SPR-Bindungsstudien

Auf SPR basierende Untersuchungsmethoden ermöglichen die Echtzeit-Verfolgung von Bindungsereignissen zwischen einer auf dem Sensorchip immobilisierten Verbindung und dem im Laufmittel befindlichen Bindungspartner. Als immobilisierte Komponente wurden dabei die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Peptide und Glycopeptide **9**, **10**, **11**, **13** und **14** (s. Abbildung 24), sowie die in der vorausgegangenen Diplomarbeit¹⁸⁶ synthetisierten V3-Verbindungen **15** bis **18** verwendet (s. Abbildung 49). Darüber hinaus wurde der freie Glycosylbaustein **6** vermessen. Durch den Einsatz von Suspensionen CCR5-überexprimierender *Osteosarkoma*-Zellen (*HI5*-Zellen) konnten Bindungsstudien mit nativen, membran-gebundenen Rezeptoren vorgenommen werden. Als Negativkontrolle diente dabei ein Fibrinogenpeptid **19**, welches nachweislich nicht mit den *HI5*-Zellen in Wechselwirkung tritt.¹⁰⁶ Als Positivkontrolle diente gp120 und als weitere Negativkontrolle wurden Parentalzellen verwendet, die nicht über den CCR5-Korezeptor auf ihrer Oberfläche verfügen.

4.4.1 Biacore-Ergebnisse der V3-Verbindungen 15 bis 18

Es wurden nachfolgende SPR-Bindungsstudien durchgeführt, um die Eigenschaften der in Abbildung 49 dargestellten Peptide und Glycopeptide aus der V3-Loop bezüglich ihrer Bindung an den humanen CCR5-Rezeptor zu charakterisieren. Diese Verbindungen wurden bereits vor der Ausführung dieser Arbeit synthetisiert.

Ergebnisse und Diskussion

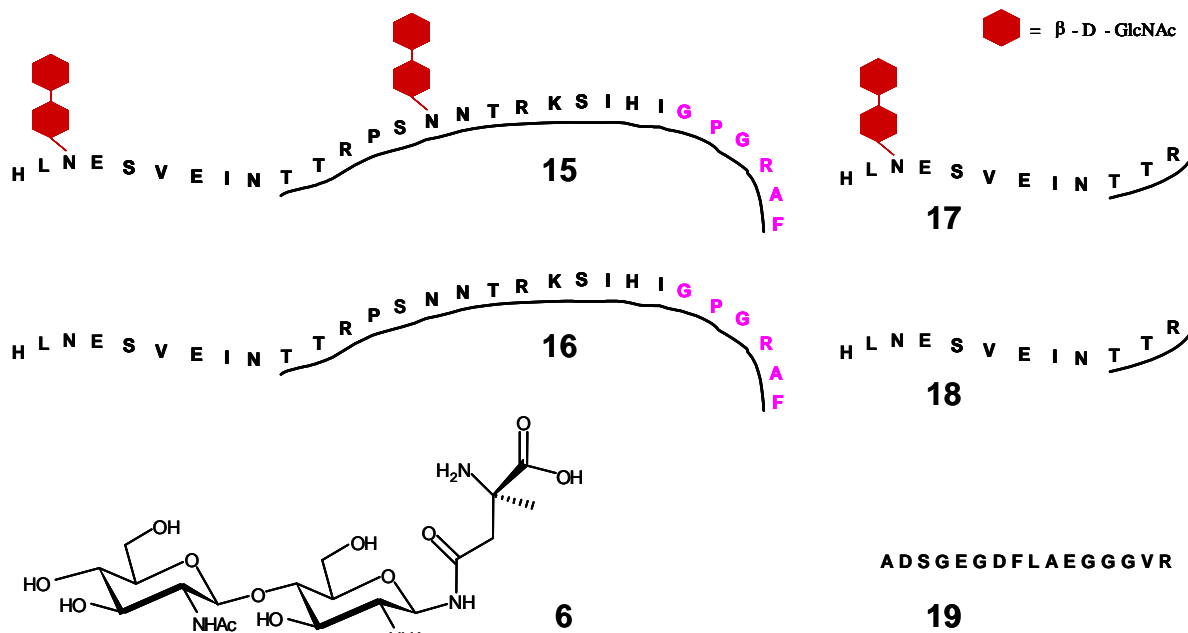


Abbildung 49: Die dargestellten Glycopeptide **15** und **17**, sowie die entsprechenden unglycosylierten Peptide **16** und **18** wurden neben dem freien Glycosylbaustein **6** mittels *Biacore* hinsichtlich ihrer CCR5-Korezeptorspezifität untersucht, wobei das Fibrinogenpeptid **19** als Negativkontrolle für ein nicht bindendes Peptid vermessen wurde. Die Markierung an den Verbindungen zeigt den jeweiligen Sequenzbereich, der innerhalb der V3-Region lokalisiert ist.

Wie anhand der V3-Markierungen (s. Abbildung 49) an den Peptiden und Glycopeptiden zu erkennen ist, beinhalten das 29er-Glycopeptid **15** und das korrespondierende Peptid **16** einen wesentlichen Bereich der V3-Loop. Dagegen liegen das 12er-Glycopeptid **17** und das unglycosylierte Peptid **18** außerhalb des V3-Bereiches.

Für die *Biacore*-Studien wurden die aufgeführten Verbindungen an der Dextranmatrix von F1-Chips bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ immobilisiert (s. Abbildung 50). Dazu erfolgte zunächst Aktivierung der Chipoberfläche mittels EDC/NHS. Für die Kupplung wurden Lösungen der zu vermessenden Verbindungen von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Acetatpuffer bei pH 5.5 verwendet, denn Vorversuche hatten gezeigt, dass unter diesen Bedingungen optimale Kupplungsverhältnisse vorliegen.

Da die N-terminalen Aminofunktionen der V3-Verbindungen in diesem Fall acetyliert vorlagen, erfolgte hier die Kupplung über Lysine bzw. Arginine. Der freie Chitobiosyl-Baustein **6** und das Fibrinogenpeptid **19** wurden über ihre freie Aminofunktion gekuppelt. Die Chipbelegung wurde dabei über die Kupplungszeit bzw. über die Erhöhung der RU-Werte kontrolliert. Verbliebene aktivierte Bindungsstellen in der Dextranmatrix wurden dann mit Ethanolamin *gecappt*. Da das verwendete *Biacore J* nur zwei der vorhandenen vier Flusszellen des Sensorchips nutzen kann, diente Flusszelle 1 als Referenzzelle, die somit nur aktiviert und *gecappt* wurde. Flusszelle 4 wurde dabei als Messzelle verwendet. Die erreichten Belegungsdaten der einzelnen Verbindungen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

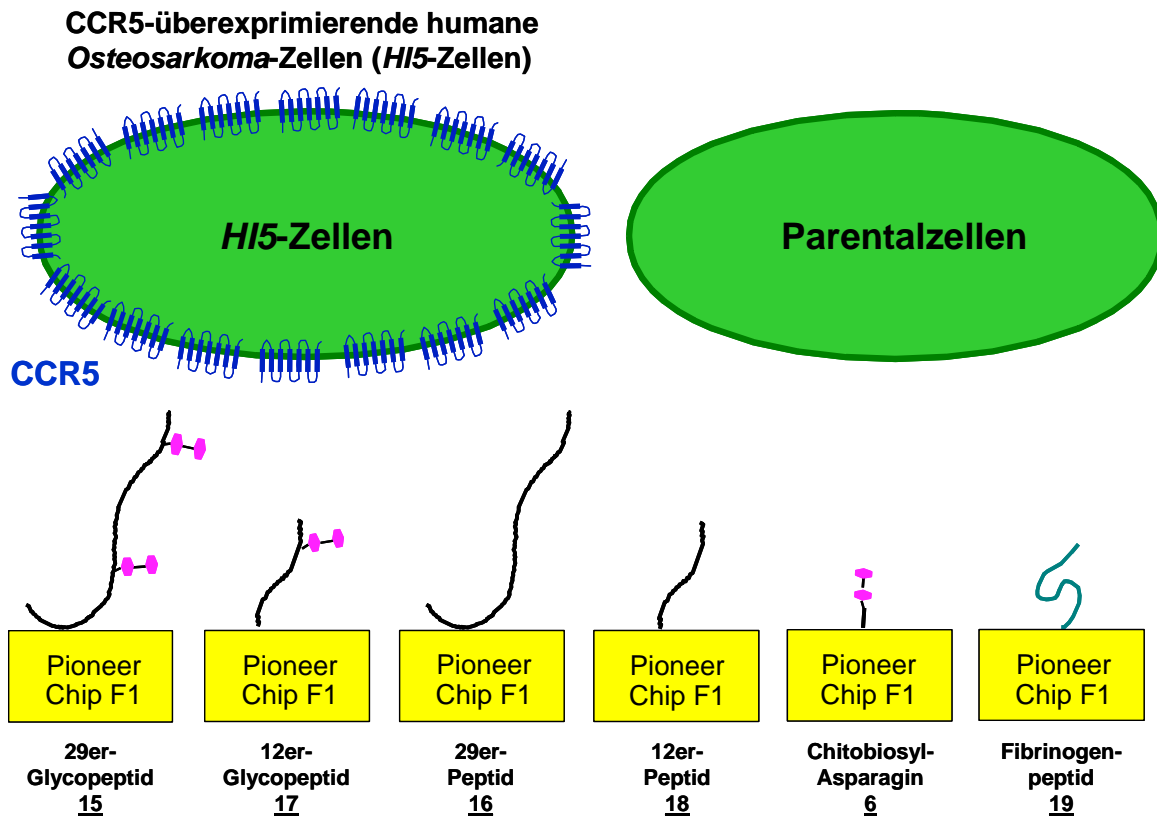


Abbildung 50: Schematische Darstellung der immobilisierten Komponenten auf der Sensorchipoberfläche, sowie die verwendeten CCR5-überexprimierenden *HI5*-Osteosarkoma-Zellen bzw. Parentalzellen ohne den Korezeptor auf ihrer Oberfläche.

Immobilisierte Verbindung	Immobilisierungszeit [min]	Immobilisierte Menge [RU]	Immobilisierte Menge [fmol]
29er-Diglycopeptid <u>15</u>	30	773	188
29er-Peptid <u>16</u>	30	470	143
12er-Monoglycopeptid <u>17</u>	30	335	180
12er-Peptid <u>18</u>	30	218	150
Fibrinogenpeptid <u>19</u>	10	227	147
Freier Glycosylbaustein <u>6</u>	15	228	485

Tabelle 13: Immobilisierungsparameter der Verbindungen 15-19, sowie 6.

Als Sonde für eine spezifische Interaktion wurden ganze Zellen verwendet, die den CCR5-Korezeptor auf ihrer Oberfläche überexprimieren (s. Abbildung 50), die man über die Chipoberfläche strömen lässt. Es wurden dabei *HI5*- und Parentalzellen in Konzentrationen von 36, 360, 1800 und 3600 Zellen pro μL an den immobilisierten Verbindungen bei einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ vermessen. Wie die Bindungsstudien zeigen, sollte man höhere Zellkonzentrationen vermeiden, da die relativ voluminösen Zellen von etwa 17 μm Größe leicht das System verstopfen. Für die Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Biacore J* Gerät verwendet, ein halbautomatisches System, welches über eine relativ große Flusszelle von 100 μm Höhe verfügt, wodurch unter den verwendeten Messbedingungen

weitgehend die Problematik des Verstopfens der Messzellen durch die Zellen umgangen werden konnte. Aus diesem Grund zeigte sich das *Biacore J* für den Umgang mit Zellen als geeigneter als das *Biacore 3000*, dessen Flusszelle lediglich eine Höhe von 20 μm aufweist. Die Anzahl vitaler Zellen der für die Messungen verwendeten Aliquots lag zwischen 90 % und 95 % bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Bestimmung erfolgte durch Anfärben mittels Tryphanblau und anschließendem Auszählen in der *Neubauer* Zählkammer. Für die Reproduzierbarkeit der Messungen ist es wichtig, dass die gleiche Charge von Zellen, also aus der gleichen Zellkultur aliquotiert wurde. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass für eine erfolgreiche Messreihe die genaue Einhaltung identischer Versuchsbedingungen von großer Bedeutung ist.

Es wurde jeweils eine Konzentrationsreihe vermessen beginnend mit der kleinsten Konzentration, wobei die Zellen vor jedem Versuch vorsichtig aufpipettiert werden mussten, da sie sich sehr schnell absetzen. Die *Biacore* Resonanzkurven des diglycosylierten 29er-Glycopeptids **15** (s. Abbildung 51) zeigten bei der Interaktion mit den *HIS*-Zellen eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Bindung. Ausgehend von 36 Zellen/ μL wurde mit steigender vermessener Zellkonzentration eine zunehmende Assoziation der Zellen beobachtet, bis schließlich bei 3600 Zellen/ μL ein maximaler Wert von 62 RU erhalten wurde.

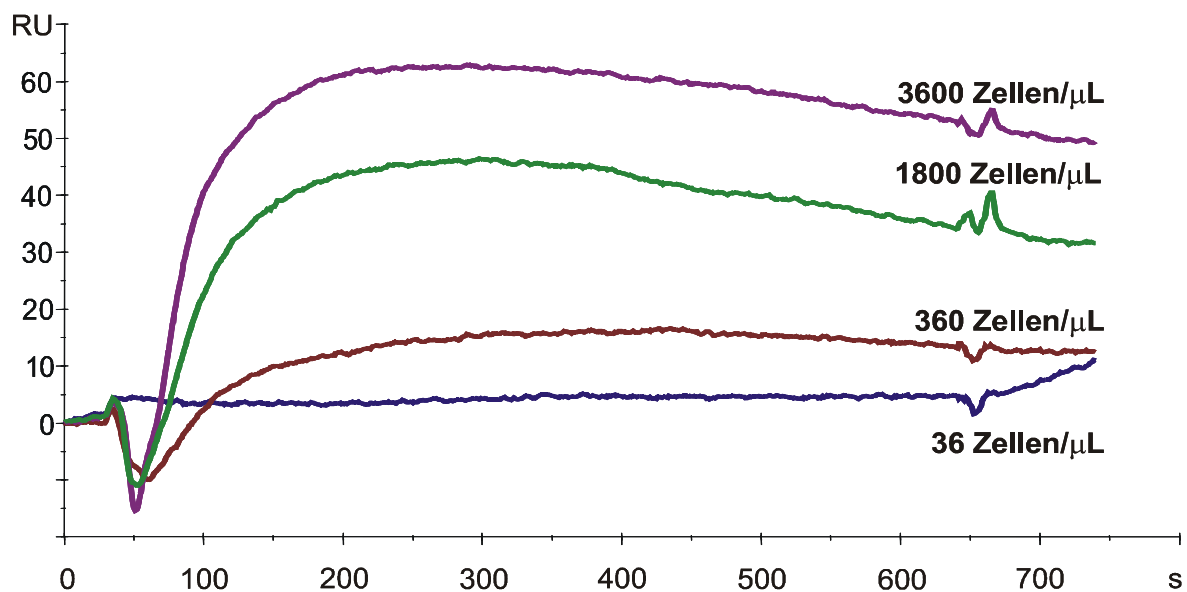


Abbildung 51: Die *Biacore* Resonanzkurven des diglycosylierten 29er-Glycopeptids **15** zeigten bei der Interaktion mit den *HIS*-Zellen unterschiedlicher Zellkonzentration eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Bindung.

Die assoziierten Zellen stehen beim *Biacore J* aufgrund der hohen Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{Minute}$ unter hohem Scherdruck, so dass sie partiell während der Assoziationsphase wieder abgehen bzw. partiell zerstört werden, daher das frühzeitige Abflachen der Kurven nach Erreichen des Sättigungsgleichgewichtes. Nach einer Assoziationsphase von zehn Minuten setzte mit Hilfe von Puffer die Dissoziation hier typischerweise nicht ein, mittels einminütigem SDS-Regenerationspuls kehrte das Resonanzsignal jedoch langsam zur Basis-

linie zurück. Nach mehreren Messungen war es dabei zur Regeneration der Chipoberfläche zum Teil erforderlich mehr als einen SDS-Regenerationspuls vorzunehmen.

Als Negativkontrolle zeigten, wie in Abbildung 52 ersichtlich ist, Parentalzellen, die nicht über CCR5 an ihrer Oberfläche verfügen, in jedem Fall eine negative Antwort und somit keine Bindung an das immobilisierte V3-Glycopeptid **15**. Die deutlich stärkere Wechselwirkung mit den *HIS*-Zellen zeigt, die Antwort in Form von *HIS*-Zellen ist Rezeptorspezifisch.

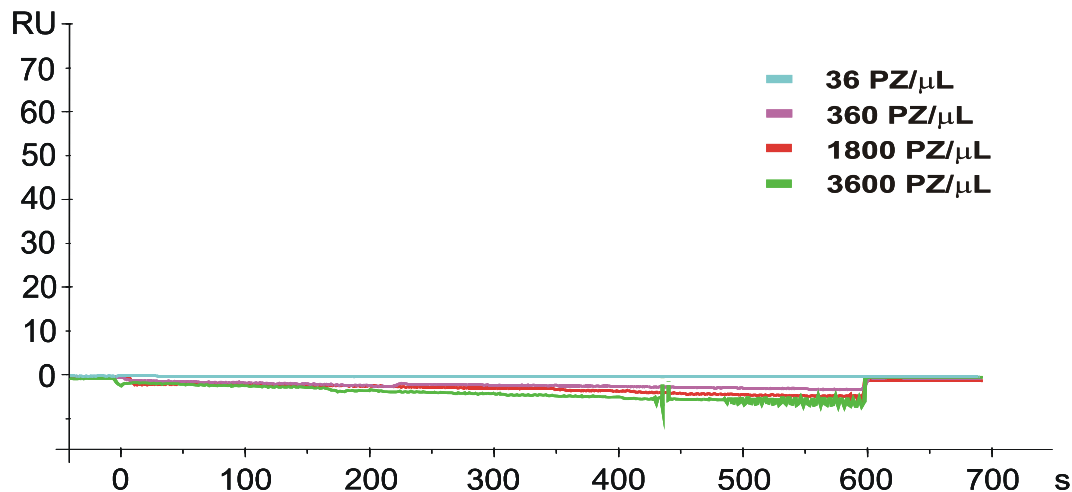


Abbildung 52: Als Negativkontrolle dienten CCR5-negative Parentalzellen (PZ), welche bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen keinerlei Interaktionen mit dem V3-Glycopeptid **15** zeigten.

Werden die maximalen RU-Werte der zuvor exemplarisch für das Glycopeptid **15** gezeigten Interaktion mit den *HIS*-Zellen gegen die Zellkonzentration aufgetragen und *gefittet*, erhält man die in Abbildung 53 dargestellte Konzentrationsabhängigkeit der Bindung. Die Kurven der anderen fünf Verbindungen wurden ganz analog erhalten.

In diesen Experimenten zeigten die CCR5-überexprimierenden *HIS*-Zellen eine eindeutige Bindung an die auf der Chipoberfläche immobilisierten V3-Verbindungen. Die höchsten RU-Werte, die gegen die Zelldichte erreicht wurden, zeigte dabei das diglycosylierte 29er-Glycopeptid **15**, das einen großen Bereich der V3-Region beinhaltet. Da das entsprechende unglycosylierte Peptid **16** und die beiden außerhalb der V3-Loop liegenden Peptide **18** und Glycopeptide **17** wesentlich geringere Assoziation zeigten, dokumentieren diese Ergebnisse, dass die V3-Sequenz in Kombination mit der innerhalb der V3 liegenden Glycosylierungsstelle bedeutsam für die Korezeptorbindung ist. Da jedoch der beobachtete Unterschied zwischen dem Glycopeptid **15** und dem korrespondierenden Peptid **16** derart groß ist, spricht vieles dafür, dass auch der Bereich der N-terminalen Flanke mit der außerhalb der V3-Loop liegenden Glycosylierungsstelle für die Bindung an den Korezeptor benötigt wird. Ein Vergleich der Bindungsaffinitäten des freien Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines **6** mit **17** und **18** zeigt, dass das Monoglycopeptid **17** deutlich besser bindet als der Zucker allein. Die Zuckerstruktur von **6** besitzt im immobilisierten Zustand nahezu keinen *Spacer* von der Dextran-Matrix, trotzdem bindet **6** die *HIS*-Zellen stärker als das unglycosylierte 12er-Peptid **18**. Das

Peptid **18** entspricht in seiner Bindungsstärke etwa dem Fibrinogenpeptid **19**. Diese geringe Bindungsaffinität von **18** gegenüber der deutlich besseren Bindung durch das entsprechende Glycopeptid **17** und dem Zuckerbaustein **6**, deutet daraufhin, dass weniger die peptidische Sequenz von **18** als vielmehr die Zucker selbst an der Bindung beteiligt sind.

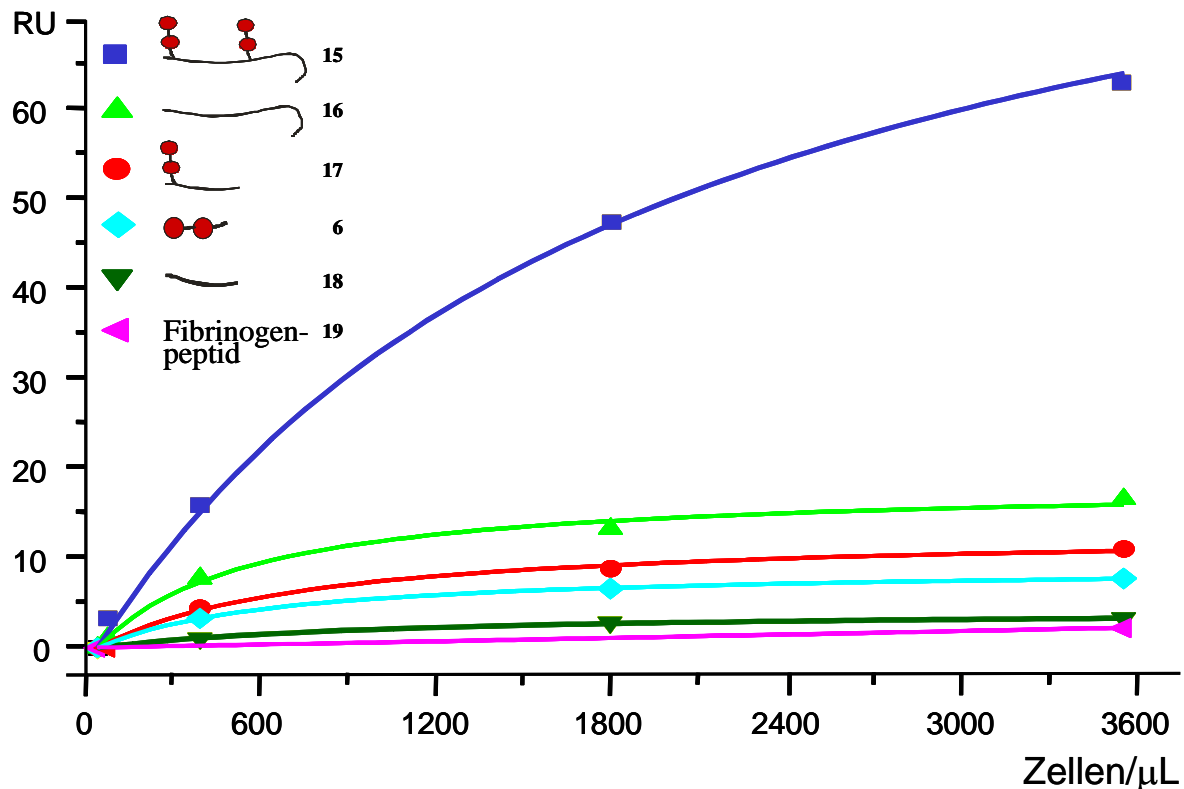


Abbildung 53: Vergleich der Bindungsaffinitäten der Verbindungen **15**, **16**, **17**, **18** und des freien Glycosylbausteines **6**, sowie des Fibrinogenpeptides **19** als Negativkontrolle. Es zeigte sich hier deutlich die Konzentrationsabhängigkeit der Assoziation der *HI5*-Zellen an die auf der Chipoberfläche immobilisierten Verbindungen, wobei das diglycosylierte 29er-Glycopeptid **15** eindeutig die stärkste Bindung verursachte. Die *gefitteten* Kurven sind die angepassten Funktionen $RU = RU_{max} \cdot c_{Zellen} / (K + c_{Zellen})$.

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass ein gemischtes Bindungsepitop zwischen V3-Region und Kohlenhydrat für die Bindung an den CCR5-Korezeptor notwendig ist, da sowohl Peptide, als auch das Kohlenhydrat selbst schwache Interaktionen mit dem Korezeptor eingehen. Keinerlei Bindungsaffinität zu den *HI5*-Zellen wies das Fibrinogenpeptid **19** auf (s. Tabelle 14).

Immobilisierte Verbindung	36 Zellen/μL	360 Zellen/μL	1800 Zellen/μL	3600 Zellen/μL
29er-Diglycopeptid 15	3	16	46	62
29er-Peptid 16	1	7	12	15
12er-Monoglycopeptid 17	-	4	8	10
12er-Peptid 18	-	1	2	3
Fibrinogenpeptid 19	0	-	-	2
Freier Glycosylbaustein 6	-	3	6	7

Tabelle 14: Vergleich der Bindungsaffinitäten in RU der vermessenen Verbindungen bei verschiedenen Zellkonzentrationen.

4.4.2 Biacore-Ergebnisse der V3-Verbindungen 9, 10, 11, 13 und 14

Nachdem positiv validiert werden konnte, dass V3 Peptide und Glycopeptide direkt mit dem CCR5-Korezeptor interagieren, wurden die erweiterten V3-Verbindungen 9, 10, 11, 13 und 14 synthetisiert, um das Bindungsepitop genauer zu charakterisieren. Der Hauptaspekt dabei war die Frage, inwieweit die Zyklisierung der Loop, die Glycosylierungen, sowie der erweiterte V3-Bereich hinsichtlich der Korezeptorspezifität Effekte zeigen. Dabei stand das verkürzte, zyklisierte Peptid 12 leider nicht mehr für die folgenden *Biacore*-Bindungsstudien zur Verfügung. Es wurde entsprechend der zuvor beschriebenen Bedingungen immobilisiert, nur dass diese Verbindungen am N-Terminus nicht acetyliert vorlagen und daher hauptsächlich über ihre freie Aminofunktion gekuppelt wurden. Die Immobilisierungsparameter sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Immobilisierte Verbindung	Immobilisierungszeit [min]	Immobilisierte Menge [RU]	Immobilisierte Menge [fmol]
V3_linear_Peptid_kurz <u>9</u>	25	1753	319
V3_linear_Peptid <u>10</u>	25	1622	263
V3_linear_Glyco <u>11</u>	25	1716	246
V3_cyclo_Peptid <u>13</u>	30	1310	218
V3_cyclo_Glyco <u>14</u>	30	1634	234
Fibrinogenpeptid <u>19</u>	15	442	288
gp120	15	6075	51

Tabelle 15: Immobilisierungsparameter der Verbindungen 9, 10, 11, 13 und 14, sowie 19 und gp120.

Eine höhere Belegung führt bei der eigentlichen Messung nur zur Verrauschung der Signale. Durch die Abplattung der „riesigen“ Zellen binden bei höherer Belegung nicht mehr Zellen, sondern sie werden nur fester gebunden. Wie Versuche zuvor mit einem Standard CM5-Chip gezeigt haben, zeichnen sich die hier verwendeten F1-Sensorchips durch eine verkürzte carboxymethylierte Dextranmatrix aus, die auf günstige Weise die Bindung von großen Molekülen zulassen. Dagegen führte die Verwendung des CM5-Chips aufgrund einer ungünstigeren Immobilisierung zu starker Verrauschung der Mess-Signale.

Es wurden CCR5-überexprimierende *HI5*-Zellen und Parentalzellen in Konzentrationen von 36, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen pro μL an den immobilisierten Verbindungen vermessen. Die *Biacore* Resonanzkurven des zyklisierten Glycopeptids 14 (s. Abbildung 54) zeigten bei der Interaktion mit den *HI5*-Zellen deutlich die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung. Ausgehend von 36 Zellen/ μL wurde mit steigender vermessener Zellkonzentration eine zunehmende Assoziation der Zellen beobachtet, bis schließlich bei 3600 Zellen/ μL ein maximaler Wert von 497 RU erhalten wurde, wobei die Zellkonzentration von 1800 Zellen/ μL bei 486 RU bereits nahezu maximale Sättigung der Bindung erreicht.

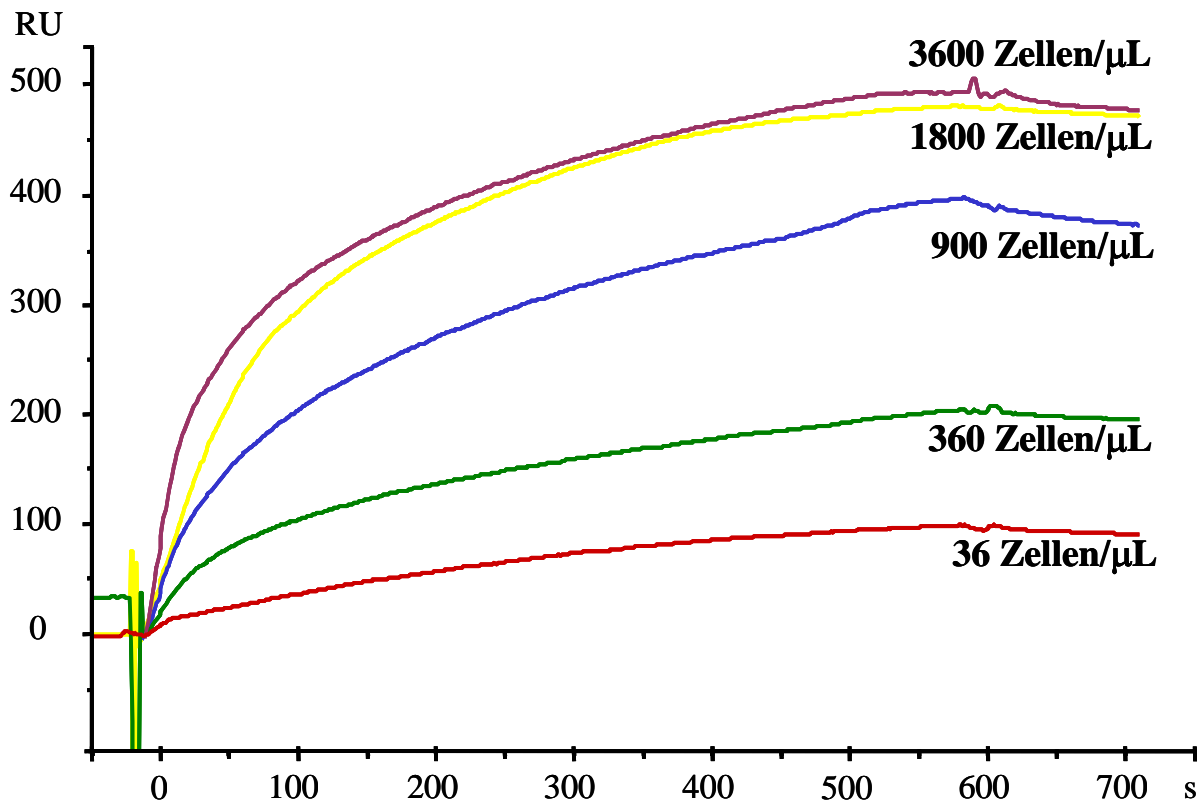


Abbildung 54: Die *Biacore* Resonanzkurven des zyklisierten Glycopeptids **14** zeigten bei der Interaktion mit den *HI5*-Zellen unterschiedlicher Zellkonzentration eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Bindung.

Als Negativkontrolle zeigten wiederum Parentalzellen, die nicht über CCR5 an ihrer Oberfläche verfügen, in jedem Fall eine negative Antwort und somit keine Bindung an das immobilisierte zyklisierte V3-Glycopeptid **14** (s. Abbildung 55). Die deutlich stärkere Wechselwirkung mit den *HI5*-Zellen belegt auch hier, dass die Antwort in Form von *HI5*-Zellen rezeptorspezifisch ist.

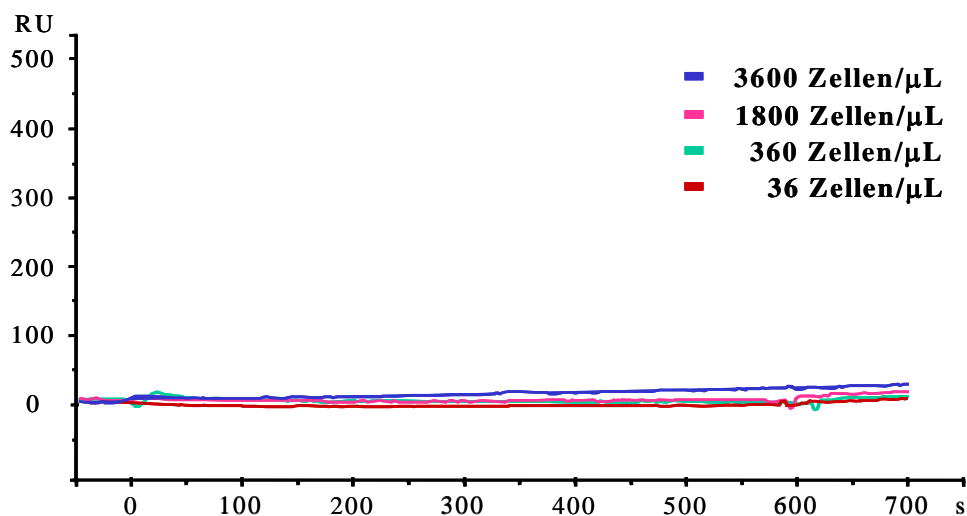


Abbildung 55: Als Negativkontrolle dienten CCR5-negative *Osteosarkoma*-Zellen, welche bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen keinerlei Interaktionen mit dem zyklisierten V3-Glycopeptid **14** zeigten.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 56 und 57 sind die Assoziationskurven des entsprechenden zyklisierten Peptids **13** und von gp120 bei der Interaktion mit den *HI5*-Zellen dargestellt.

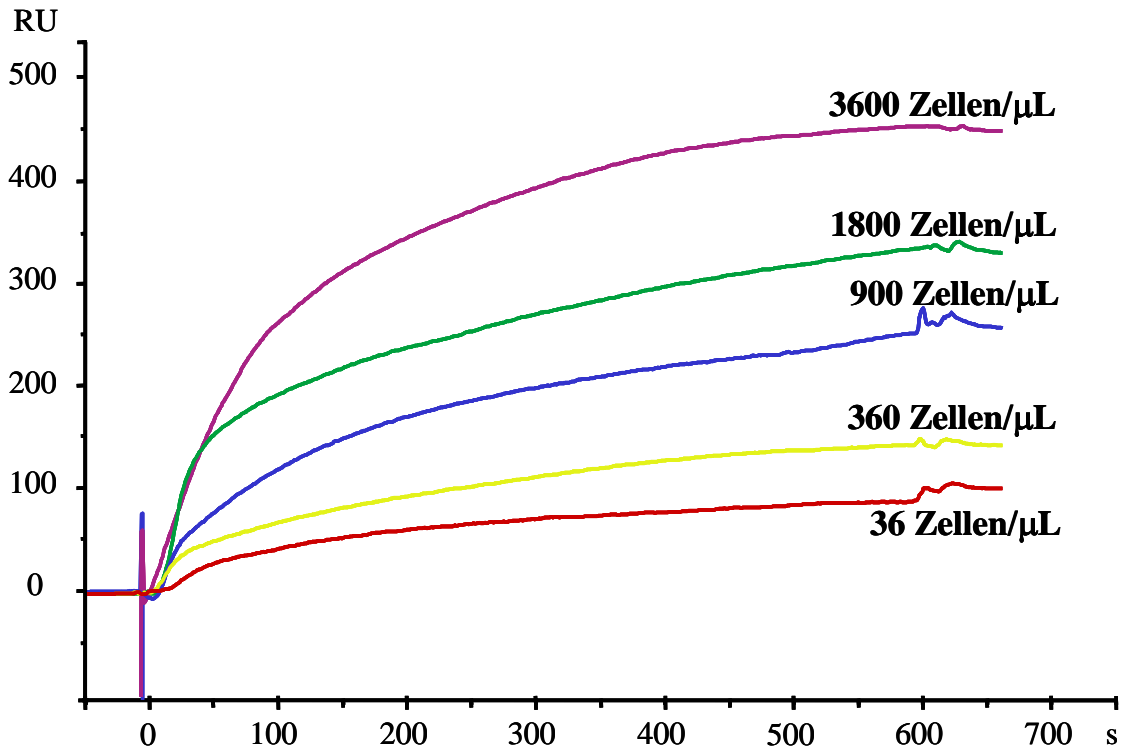


Abbildung 56: *Biacore*-Resonanzkurven des zyklisierten Peptids **13** bei der Interaktion mit *HI5*-Zellen.

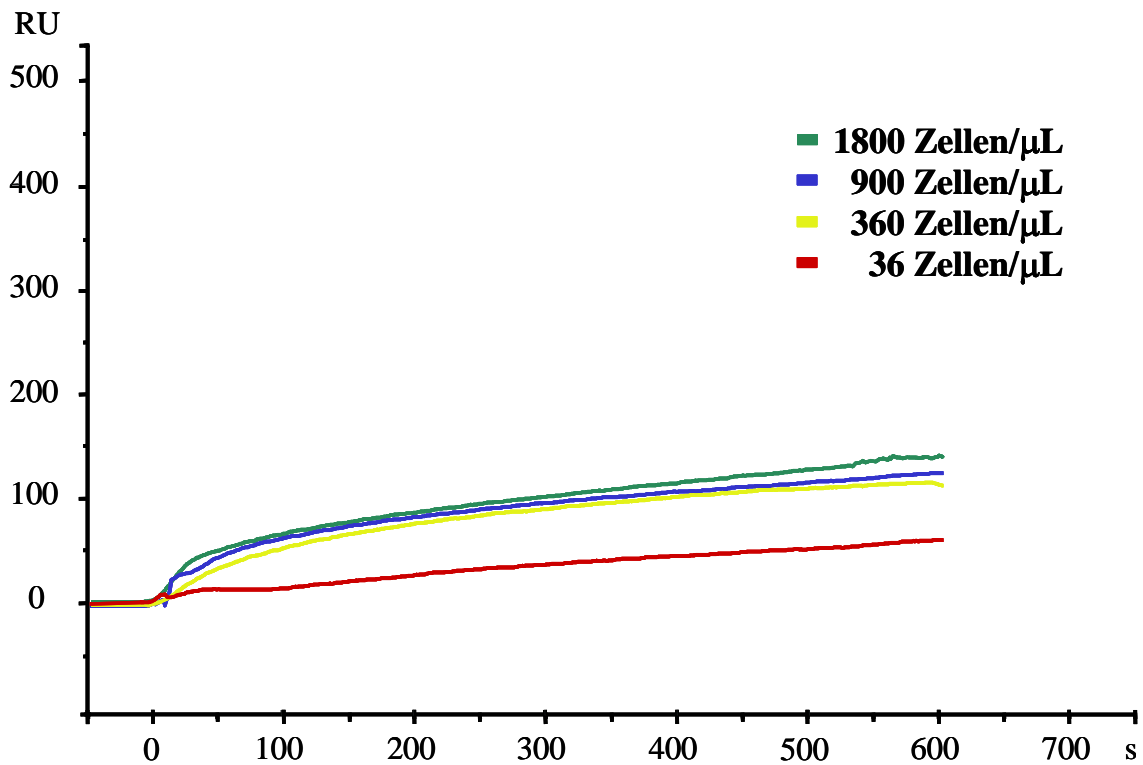


Abbildung 57: *Biacore*-Resonanzkurven von gp120 bei der Interaktion mit *HI5*-Zellen, wobei die Zellkonzentration von 3600 Zellen/ μ L keine vernünftig darstellbaren Assoziationskurven lieferte.

Ergebnisse und Diskussion

Ein Vergleich des Kurvenverlaufes in der Steigung der Assoziation zeigt, dass gegenüber dem zyklisierten Glycopeptid **14** (s. Abbildung 54) die Assoziation des zyklisierten Peptids **13** sowie des gp120 eher nach einer Kinetik mit zwei Zeitkonstanten verläuft. Auch die Assoziation der offenkettigen V3-Verbindungen **9** und **10** scheint vor allem bei geringer Zellkonzentration mit zwei Geschwindigkeitskonstanten zu erfolgen (Kurven nicht gezeigt). Zur Charakterisierung der Assoziation wurden an die Messwerte der Sensorgramme bei den Zellkonzentrationen von 900 Zellen/ μL Funktionsannäherungen nach dem Modell der Langmuirassoziation durchgeführt, die den k_{on} -Wert lieferten (s. Tabelle 16). Dazu wurden identische Bereiche der Steigung der Assoziation *gefittet*, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Der Funktionsannäherung wurde dabei auf der Basis von 10^6 Rezeptoren pro Zelle eine abgeschätzte Konzentration an Rezeptoren von 1.5 nM zu Grunde gelegt. Wie in Tabelle 16 ersichtlich ist, sind die Chi^2 -Werte, welche die Güte des *Fits* angeben, relativ hoch. Allerdings sind laut Literatur *Fits* mit einem Chi^2 -Wert kleiner als 10 als vernünftig anzusehen.¹⁷⁰ Zudem liegen die Werte in gleichem Rahmen.

Immobilisierte Verbindung	k_{on} [$\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$]	Chi^2
V3_linear_Peptid_kurz 9	$1.01 \cdot 10^6$	3.76
V3_linear_Peptid 10	$1.65 \cdot 10^6$	3.90
V3_cyclo_Peptid 13	$3.18 \cdot 10^6$	7.75
gp120	$5.11 \cdot 10^6$	8.50
V3_linear_Glyco 11	$5.79 \cdot 10^6$	3.91
V3_cyclo_Glyco 14	$7.26 \cdot 10^6$	9.09

Tabelle 16: Berechnete k_{on} -Werte nach dem Modell der Langmuirassoziation bei Zellkonzentrationen von 900 Zellen/ μL bei einer abgeschätzten Konzentration an Rezeptoren von 1.5 nM.

Ein Vergleich der k_{on} -Werte zeigt, dass das zyklisierte Glycopeptid **14** (V3_cyclo_Glyco) die höchste Geschwindigkeitskonstante der Assoziation aufweist, gefolgt vom offenkettigen Glycopeptid **11** (V3_linear_Glyco) und gp120. Das zyklische unglycosylierte V3-Peptid **13** (V3_cyclo_Peptid) assoziiert schneller als die beiden offenkettigen Peptide **9** und **10**. Diese Daten belegen, dass Glycopeptide bedingt durch den Zucker eine schnellere Kinetik und somit bessere Assoziation zeigen als die Peptide. Zudem binden zyklische Verbindungen gegenüber den offenkettigen mit schnellerer Kinetik. Allerdings stellen die aufgeführten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation keine wirklichen k_{on} -Werte im klassischen Sinne dar, sondern relative Werte auf der Basis von 10^6 Rezeptoren pro Zelle berechnet. Diese bedingte Aussagekraft hängt vor allem mit der Rezeptordichte zusammen, die von Zelle zu Zelle variiert, weshalb sich die Konzentration an Rezeptoren von 1.5 nM allenfalls abschätzen lässt. Zudem bindet eine Zelle über diverse Rezeptoren an mehrere immobilisierte Moleküle. Ausserdem haben Rezeptoren, die sich auf der von der Chipoberfläche abgewandten Seite der Zelloberfläche befinden, nicht die Möglichkeit mit dem immobilisierten

Bindungspartner in Wechselwirkung zu treten. Auch die Aggregation von Zellen trägt zur Verfälschung bei. Jedoch sind diese Daten durchaus geeignet, die gewonnenen Erkenntnisse der Bindungsfähigkeit der V3-Verbindungen eindrucksvoll zu unterstützen.

Die Auftragung der maximal erreichten RU-Werte gegen die Zellzahl ist in Abbildung 58 dargestellt. Charakteristisch für alle Kurven ist die stark abfallende Steigung bei zunehmender Zellkonzentration, was auf eine Sättigung der Bindung hindeutet. Wie zu erkennen ist, zeigten die CCR5-positiven Zellen eindeutig eine Interaktion mit Peptiden und Glycopeptiden aus der V3-Loop.

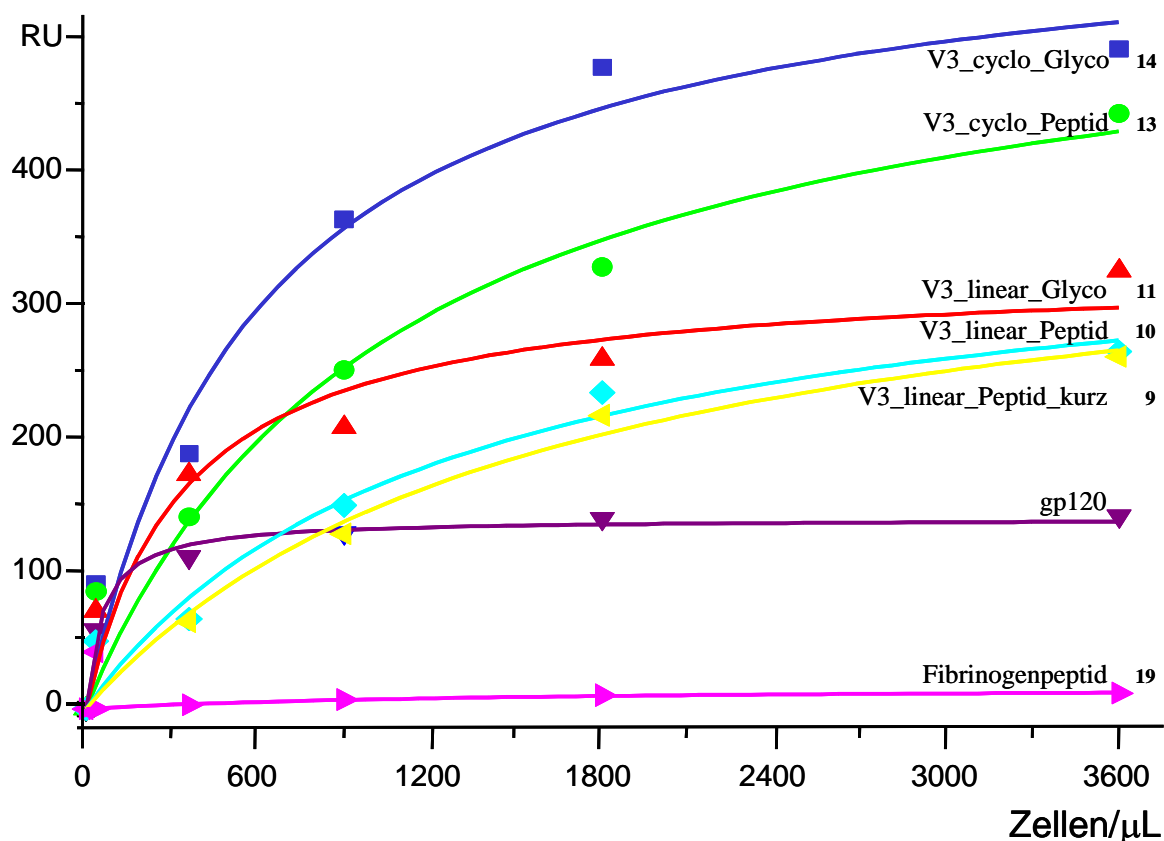


Abbildung 58: Vergleich der Bindungsaffinitäten der Verbindungen 9, 10, 11, 13 und 14, sowie des Fibrinogenpeptides 19 als Negativkontrolle und gp120 als Positivkontrolle. Es zeigte sich hier deutlich die Konzentrationsabhängigkeit der Assoziation der HI5-Zellen an die auf der Chipoberfläche immobilisierten Verbindungen, wobei das zyklisierte Glycopeptid 14 eindeutig die stärkste Bindung verursachte. Die gefüllten Kurven sind die angepassten Funktionen $RU = RU_{max} \cdot c_{Zellen} / (K + c_{Zellen})$.

Ein Vergleich der Bindungsaffinitäten zeigt, dass das zyklisierte Glycopeptid 14 (V3_cyclo_Glyco) die stärkste Interaktion mit den HI5-Zellen aufweist. Es wird hier halbe maximale Sättigung bereits bei einer Konzentration von 500 Zellen/µL erreicht. Dieser sehr steile Anstieg in der Assoziation spricht für eine bessere Kinetik gegenüber den anderen vermessenen Verbindungen. Zudem ist das frühe Erreichen der maximalen Sättigung der Bindung ein Beleg für effektivere Bindung. Das zyklische unglycosylierte V3-Peptid 13 (V3_cyclo_Peptid) zeigte die zweit stärkste Interaktion und das offenkettige Glycopeptid 11

Ergebnisse und Diskussion

(V3_linear_Glyco) die dritt stärkste Wechselwirkung. Die schwächste Bindung zeigte dabei das lineare unglycosylierte Peptid **10** (V3_linear_Peptid), wobei das entsprechende N-terminal um sechs Aminosäuren verkürzte lineare Peptid **9** (V3_linear_Peptid_kurz) geringfügig schwächer bindet (s. auch Tabelle 17).

Als positive Kontrolle hinsichtlich der immobilisierten V3-Verbindungen diente gp120. Die schwächer als erwartete Wechselwirkung des gp120 liegt vermutlich darin begründet, dass zunächst Wechselwirkung mit CD4 erforderlich ist, worauf nach Konformationsänderung und Öffnung des Bindungsepitops von gp120 an den Korezeptor gebunden wird. Außerdem ist das gp120 nicht zu 100 % aktiv und bei der Größe des gp120 kann ungünstige Orientierung auf der Chipoberfläche zum Verlust der Präsentation des Bindungsepitops führen. Darüber hinaus lag das gp120 gegenüber den übrigen Verbindungen mit einer Belegungsrate von nur 51 fmol in sehr geringer immobilisierter Menge vor (s. Tabelle 15). Jedoch zeigte das gp120 eine sehr früh erreichte maximale Sättigung der Bindung, was auf eine sehr effektive Bindung der *HI5*-Zellen hindeutet. Keinerlei Bindungsaffinität zu den CCR5-überexprimierenden Zellen zeigte das Fibrinogenpeptid **19**, welches als Negativkontrolle für ein nicht bindendes Peptid vermessen wurde.

Immobilisierte Verbindung	36 Zellen/ μ L	360 Zellen/ μ L	900 Zellen/ μ L	1800 Zellen/ μ L	3600 Zellen/ μ L
V3_linear_Peptid_kurz 9	43	66	132	222	266
V3_linear_Peptid 10	51	68	154	239	270
V3_linear_Glyco 11	74	177	213	264	331
V3_cyclo_Peptid 13	89	145	256	334	450
V3_cyclo_Glyco 14	94	193	370	486	497
Fibrinogenpeptid 19	0	3	-	10	12
gp120	60	115	127	144	146

Tabelle 17: Vergleich der Bindungsaffinitäten in RU der vermessenen Verbindungen bei verschiedenen Zellkonzentrationen.

Die beobachteten Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen, die zuvor von *S. Meyer*¹⁰⁶ und *J. Dojahn*¹⁰⁷ in SPR-Studien von V3-Peptiden und Glycopeptiden mit *HI5*- und Parentalzellen gemacht wurden. Die dort beobachtete direkte Beteiligung der V3-Loop bei der Interaktion zwischen gp120 und dem Zellrezeptor CCR5 kann auch hier an V3-Verbindungen anderer Sequenz belegt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die *Biacore*-Daten reproduzierbar sind und sich hinsichtlich ihrer Aussage ergänzen. Sie demonstrieren sowohl die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung, als auch die spezifische Korezeptorbindung. Glycopeptide binden besser als die unglycosylierten Peptide, was mit den Strukturdaten korreliert, denn Strukturanalysen¹⁷⁸ zeigen eine konformationell stabilisierende Wirkung durch den Zucker zum Teil durch trans-Loop-Wechselwirkungen aufgrund von *long-range* NOE-Kontakten. Das offenkettige Glycopeptid **11** zeigt dabei gegenüber dem offenkettigen Peptid **10** eine um den Faktor 1.2 stärkere Bindung, während die Affinität zum

CCR5-Korezeptor beim zyklisierten Glycopeptid **14** 1.1 fach höher als beim entsprechenden unglycosylierten zyklischen Peptid **13** ist. Diese Resultate belegen, dass die Glycosylierung für eine Interaktion mit dem Korezeptor von Bedeutung ist. Darüber hinaus gehen die zyklisierten V3-Verbindungen eine stärkere Bindung mit dem Korezeptor ein, als die entsprechenden offenkettigen Formen. Dabei zeigt das zyklische Glycopeptid **14** gegenüber dem linearen Glycopeptid **11** eine um den Faktor 1.5 stärkere Bindung, während bei dem entsprechenden zyklisierten und linearen Peptid **13** und **10** ein Unterschied von dem Faktor 1.6 vorliegt. Die Zyklisierung der Loop spielt eine wesentliche Rolle, da durch die Disulfidverbrückung zwischen den beiden Cysteinen die Struktur bereits richtig gefaltet ist und somit vermutlich eher in der bindungsaktiven Konformation vorliegt. Die stärkste Interaktion weist insgesamt das zyklische Glycopeptid **14** auf, die schwächste dagegen das vergleichbare lineare Peptid **10**. Dafür sind zwei Einflüsse verantwortlich. Die Zyklisierung bei gleichzeitiger Glycosylierung bewirkt somit sogar eine um den Faktor 1.8 höhere Bindungsstärke, wie die Gegenüberstellung der Bindungsaffinitäten des zyklischen Glycopeptids **14** und des linearen Peptids **10** zeigt. Ein Vergleich des offenkettigen Peptids **10** mit dem entsprechenden N-terminal um sechs Aminosäuren verkürzten linearen Peptids **9** zeigt, dass die Verlängerung der Peptidsequenz in Richtung N-Terminus zu einer geringfügigen Verstärkung der Bindung an den CCR5-Korezeptor führt.

Die *Biacore*-Resultate belegen explizit, dass eine direkte Interaktion zwischen V3-Loop und dem CCR5-Korezeptor notwendig ist, um die sekundäre Interaktion zwischen dem HIV GP120 und humaner Zelle herzustellen, wobei insbesondere die Kohlenhydratstruktur eine bedeutsame Rolle spielt. Der Korezeptor erkennt somit die V3-Region. Die Zyklisierung der V3-Loop hat dabei einen größeren Einfluss auf die Bindungsstärke als die Glycosylierung, wobei die Kombination beider Faktoren zu der stärksten Bindung führt. Außerdem spielen dabei vermutlich zusätzliche synergetische Effekte eine Rolle, die beim gleichzeitigen Auftreten von zyklischer Natur der Loop und Glycosylierung zur deutlichen Verstärkung der Bindungsaffinität führen.

Im Vergleich zu bereits im Arbeitskreis durchgeführten SPR-Studien¹⁰⁶ an V3-Peptiden und Glycopeptiden geringfügig anderer Sequenz innerhalb der Loop (Position 5 (S ↔ N) und Position 22 (A ↔ T)), sowie ohne verlängerten N- und C-terminalen Bereich, zeigen die hier untersuchten V3-Verbindungen sehr viel höhere RU-Antworten (etwa fünffach so hoch). Reproduzierbar ist hierbei zwar nicht die Höhe, jedoch die Reihenfolge der Peptide und Glycopeptide nach steigender Bindungsaffinität und bestätigt somit die Tendenz der zuvor beobachteten Untersuchung. Diese Studien zeigten dabei einen noch ausgeprägteren Einfluss der Zyklisierung auf die Bindungsaffinität zu CCR5-überexprimierenden *HIS*-Zellen. Die Bindung des zyklisierten Glycopeptids erwies sich dort etwa 2.8 fach so stark wie die des offenkettigen unglycosylierten Peptids und etwa zweimal so stark wie die des unglycosylierten zyklisierten Peptids. Diese bemerkenswerten Unterschiede in der absoluten

Bindungsaffinität lassen sich zum Teil dadurch erklären, dass die dort vermessenen V3-Verbindungen N-terminal acetyliert vorlagen, was eine veränderte Orientierung auf der Chipoberfläche bewirken kann. Die am N-Terminus acetylierten Peptide und Glycopeptide können nur über entsprechende Seitenkettengruppierungen an die Chipoberfläche gekuppelt werden, was im ungünstigsten Fall zum Verlust der Präsentation des Bindungsepitops führen kann. Zudem können die Unterschiede in den beobachteten Bindungsstärken auch darin begründet liegen, dass sich die Sequenzen innerhalb der V3-Region in zwei Positionen unterscheiden. Diese Permutationen können durchaus einen Einfluss auf die 3D-Struktur des Bindungsepitops und somit auf die Korezeptorspezifität haben. Letztendlich lässt jedoch der bemerkenswerte Unterschied in der Höhe der CCR5-Bindungsaffinitäten vermuten, dass der erweiterte Sequenzbereich der V3, sowie die zusätzliche Glycosylierung außerhalb der Loop einen erheblichen Anteil an der deutlich höheren Bindungsstärke hat.

Darüber hinaus zeigten die hier untersuchten V3-Verbindungen gegenüber weiteren *Biacore*-Studien¹⁰⁷ an V3-Verbindungen mit an zwei Positionen veränderter Sequenz innerhalb der Loop (Position 22 (A ↔ T) und Position 25 (D ↔ E)), sowie ohne erweiterten V3-Bereich, ebenso sehr viel höhere RU-Antworten (bis zu vierfach so hoch). Allerdings waren diese V3-Peptide und Glycopeptide ebenfalls N-terminal nicht acetyliert, weshalb dieser Faktor als Erklärung für die hier beobachteten sehr viel stärkeren Interaktionen mit CCR5-überexprimierenden *HI5*-Zellen ausscheidet. Dort wurde jedoch ebenso eine identische Abstufung der V3-Verbindungen nach steigender Bindungsaffinität beobachtet. Die Bindung des zyklisierten Glycopeptids erwies sich dort etwa 2.1 fach so stark wie die des offenkettigen unglycosylierten Peptids und etwa 1.3 mal so stark wie die des unglycosylierten zyklisierten Peptids, sowie etwa 1.8 fach so stark wie die des linearen Glycopeptids. Da beide zuvor gemachten SPR-Studien erheblich geringere RU-Antworten und einen ausgeprägteren Einfluss der Zyklisierung auf die Bindungsstärke zeigten, wird der hier vorliegende erweiterte Sequenzbereich der V3, sowie die zusätzliche Glycosylierung außerhalb der Loop eine erhebliche Bedeutung für die CCR5-Korezeptorbindung haben. Offensichtlich sind insbesondere Kohlenhydratstrukturen und Aminosäuren sogar über die terminalen Cysteine der V3-Loop hinaus für eine Interaktion mit dem Korezeptor von Bedeutung.

5 Zusammenfassung

Das humane Immundefizienzvirus (HIV-1) bindet über das virale Glycoprotein gp120 an die Membranrezeptoren CD4 und CCR5. Das Ziel dieser Arbeit lag darin, potentielle Liganden aus dem V3-Bereich des gp120 herzustellen und sie auf ihre Bindungseigenschaften mit dem CCR5-Korezeptors hin zu untersuchen. Nachdem vorangegangene Arbeiten^{106,107} zeigten, dass die V3-Region des HIV deutlich mit CCR5 interagiert, war es von Interesse, weitere V3-Verbindungen zu synthetisieren, um das Bindungsepitop genauer zu charakterisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Peptide und *N*-Typ-Glycopeptide aus dem erweiterten V3-Bereich des HIV-1 gp120 synthetisiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Verfahren für die Darstellung des *N*_γ-Chitobiosyl-Asparagin-Bausteines **6** optimiert. Dabei ließ sich im entscheidenden Schritt das freie Glycosylamin **4** unter TBTU Aktivierung selektiv in einer Ausbeute von etwa 80 % an die Seitenkette einer teilweise geschützten Asparaginsäure anknüpfen. Da es dabei zuvor zu ungewollten Nebenreaktionen an den freien Hydroxylgruppen des Zuckers kam, erwies sich die Umsetzung mit nur 0.9 Äquivalenten des Fmoc-Asp-*O*tBu bei tieferen Temperaturen von -15 °C als sehr erfolgreich.

Zur Darstellung der V3-Peptide und Glycopeptide wurden folgende Sequenzen der Nord-amerikanischen Konsensussequenz des gp120 ausgewählt (markierte N = Glycosylierungen):



Zur genaueren Charakterisierung der gp120/CCR5-Interaktion sollte insbesondere der Einfluss der Zyklisierung und Glycosylierung von erweiterten V3-Loops des gp120 auf eine verbesserte Bindungsaffinität zum humanen CCR5-Rezeptor untersucht werden.

Die Darstellung der zyklisierten tetra- respektive triglycosylierten Peptide **7** und **8**, die Glycosylierungen der Asparagine in direkter Nachbarschaft zu den Cysteinen der Disulfidbrücke beinhalten, misslang. Es wird vermutet, dass die benachbarten Zucker unter den Synthesebedingungen die Zyklisierung sterisch blockieren.

Zusammenfassung

Die oben aufgeführten Sequenzen wurden als offenkettiges **10** und zyklisches Peptid **13**, sowie als offenkettiges **11** und zyklisches Glycopeptid **14** mit zweifacher Glycosylierung in einer Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese hergestellt. Zudem wurden die in Richtung N-Terminus um sechs Aminosäuren verkürzten linearen **9** und zyklisierten Peptide **12** synthetisiert. In der Glycopeptidsynthese trat beim Einbau des Glycosylbausteines **6** in die Peptidkette das Problem der Aspartimidbildung auf, was zum Verlust des Zuckerbausteines führt. Durch die Verwendung von TBTU als Aktivator konnte die Kupplungsausbeute auf bis zu 90 % optimiert werden. Die Synthese der offenkettigen Verbindungen wurde unter Verwendung orthogonal *S*tBu-geschützter Cysteine durchgeführt, deren Seitenkettenschutz bei der Abspaltung von der Festphase erhalten blieb. Für die Darstellung der zyklischen Verbindungen gelang zwar die Entschützung der *S*tBu-geschützten Cysteine durch Reduktion mit DTT, jedoch konnte bei der nachfolgenden oxidativen Zyklisierung in stark verdünnter Lösung das gewünschte zyklisierte Peptid nicht erhalten werden. Daher wurden die zyklischen Verbindungen **12**, **13** und **14** unter Einsatz *Trt*-geschützter Cysteine synthetisiert, die nach Abspaltung von der Festphase unter Schutzgasatmosphäre durch Zyklisierung an Luftsauerstoff in hochverdünnter Lösung erhalten wurden. Nach erfolgreicher Aufreinigung mittels RP-HPLC bzw. durch Größenausschlusschromatographie konnten sämtliche Verbindungen durch MALDI-TOF-MS und 1D/2D-NMR-Experimente charakterisiert werden.

Die vergleichende Betrachtung der TOCSY-Spektren der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten V3-Verbindungen zeigte in Abhängigkeit von Glycosylierung und Zyklisierung sowie des N-terminal erweiterten Bereiches eindeutig differierende chemische Verschiebungen der amidischen Protonen des Peptidrückgrats auf. Der Vergleich der Glycopeptide **11** und **14** mit den entsprechenden unglycosylierten Peptiden **10** und **13** zeigte dabei auffällige Unterschiede in der unmittelbaren Nachbarschaft zu den Glycosylierungsstellen. Diese haben eine weitgehende Streckung des Peptidrückgrats im Bereich der Glycosylierungsstellen zur Folge, wodurch diese Bereiche besser definierte Strukturen aufweisen. Allerdings ist für die zyklischen Verbindungen **14** und **13** insgesamt ein viel ausgeprägterer Unterschied in den chemischen Verschiebungen zu beobachten. Dies spricht für einen stärkeren konformationellen Einfluss der Glycosylierungen auf die zyklisierten Verbindungen gegenüber den offenkettigen Formen. Die Disulfidverbrückung der Loop hat einen großen konformationellen Einfluss auf das gesamte Peptidrückgrat und wird dadurch erheblich in seiner 3D-Struktur festgelegt. Die zweifache Glycosylierung scheint durch den konformationellen Einfluss der Zucker zusätzlich einen starken stabilisierenden Effekt auf die 3D-Struktur auszuüben. Der Vergleich des linearen Peptids **10** mit dem entsprechenden N-terminal verkürzten Peptid **9** zeigte, dass bei fehlenden strukturellen Faktoren, wie einer Glycosylierung oder Zyklisierung, keine großen strukturellen Unterschiede bedingt durch den verlängerten N-terminalen Bereich vorliegen. Die bemerkenswerten Unterschiede

Zusammenfassung

zwischen den vergleichbaren zyklischen Verbindungen **13** und **12** deuten allerdings darauf hin, dass die zusätzliche N-terminale Flanke der zyklisierten V3-Loop einen konformativen Effekt ausübt und eine stabilisierende Wirkung auf die Gesamtstruktur zu haben scheint.

Die Analyse der NOESY-Spektren bestätigte den konformativen Einfluss, der vor allem durch die Zyklisierung aber auch durch die Glycosylierungen ausgeübt wird. Dass bei den offenkettigen Verbindungen **9** und **10** bzw. **11** nur sequenzielle NOE-Kontakte auftraten bzw. keine strukturelevanten *long-range* NOE-Kontakte zu beobachten waren, deutet auf eine relativ gestreckte aber weniger definierte Struktur der linearen Verbindungen hin. Dabei zeigten die Randbereiche der offenkettigen Loops eine wesentlich höhere Flexibilität. Zusätzliche sequenzielle NOE-Kontakte im Bereich der Glycosylierungsstellen zeigte die stabilisierende Wirkung der Zucker auf die 3D-Struktur der Glycopeptide **11** und **14**. Bei den zyklischen Verbindungen **12** und **13** bzw. **14** waren neben einer höheren Anzahl an sequenziellen NOE-Kontakten zahlreiche strukturelevante *long-range* NOEs festzustellen. Die Zyklisierung der V3-Loop bewirkt eine deutlich besser definierte Struktur und somit eine stark eingeschränkte Beweglichkeit.

Der Einfluss von Zyklisierung und Glycosylierung der V3-Verbindungen bezüglich ihrer Bindung an den humanen Korezeptor CCR5 wurde mittels *Biacore*-SPR-Studien untersucht. Zur Analyse der spezifischen Interaktion wurden *HI5*-Zellen verwendet, die den CCR5-Korezeptor überexprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die V3-Loop des HIV eindeutig mit dem 7-Helixtransmembrankorezeptor CCR5 interagiert. Die Ergebnisse zeigen sowohl die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung als auch die Korezeptorspezifität. Es konnte anhand der V3-Verbindungen **9**, **10**, **11**, **13** und **14** positiv validiert werden, dass sowohl die Glycosylierung, als auch die Zyklisierung die Bindung an den Korezeptor verstärken. Beide Faktoren spielen eine bedeutsame Rolle, da die 3D-Struktur wesentlich besser definiert ist und die V3-Verbindungen somit auch vermutlich eher in der bindungsaktiven Konformation vorliegen. Das zyklisierte V3-Glycopeptid **14** bindet den CCR5-Korezeptor besser als das unglycosylierte zyklische Peptid **13** und dieses bindet besser als das lineare Glycopeptid **11**. Die schwächste Wechselwirkung zeigte dabei das offenkettige V3-Peptid **10**, wobei das entsprechende N-terminal um sechs Aminosäuren verkürzte Peptid **9** geringfügig schwächer interagiert. Die k_{on} -Werte der Assoziation belegen, dass der Zucker einen wichtigen Aspekt bei der Kinetik der Bindung darstellt, denn die Glycopeptide **11** und **14** zeigten die schnellste Kinetik. Die Bindungsstudien der V3-Verbindungen **15** bis **18** belegen, dass offensichtlich insbesondere Kohlenhydratstrukturen und Aminosäuren bis hin oder sogar über das N-terminale Cystein der V3 hinaus für eine Bindung notwendig sind. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass ein gemischtes Bindungsepitop zwischen V3-Peptidsequenz und Kohlenhydrat für die Bindung an den CCR5-Korezeptor benötigt wird, da sowohl kürzere und lineare Peptide, als auch der Zucker **6** selbst - wenn auch schwächere - Interaktionen mit dem Korezeptor eingehen. Der Korezeptor erkennt somit die glycosylierte V3-Region. Ein detailliertes

Zusammenfassung

Verständnis dieser Wechselwirkung eröffnet die Möglichkeit zur Entwicklung auf der V3-Sequenz basierender HIV-*Entry*-Inhibitoren.

6 Summary

The human immunodeficiency virus (HIV-1) binds to the cellular receptors CD4 and CCR5 by using the viral glycoprotein gp120. The aim within this thesis was to synthesize potential ligands of the gp120 V3-region and examine them for their binding properties towards the CCR5 coreceptor. After previous studies^{106,107} demonstrated that the V3 region of HIV directly interacts with the CCR5 coreceptor, it was of interest to synthesize larger V3 structures to further identify the binding epitope.

In this present study, peptides and *N*-type glycopeptides were synthesized using extended V3 loop sequences of the HIV-1 gp120. For the synthesis of glycopeptides the procedure to efficiently obtain the *N*_γ-chitobiosyl asparagine building block **6** was optimized. In the important step, free glycosylamin **4** was selectively linked under TBTU activation directly to the side chain of a suitably protected aspartate, with a yield of about 80 %. In view of the fact that previous trials led to undesired coupling at the free hydroxyl groups of the sugar, the implementation with only 0.9 equivalents of Fmoc-Asp-*O*tBu at lower temperatures of -15 °C was very successful.

In order to synthesize the V3 peptides and glycopeptides, the following sequences of the North American consensus sequence were selected (marked N = glycosylations):



For more precise characterization of the gp120/CCR5 interaction, it was important to examine the influence of the cyclization and glycosylation of extended V3 loops of gp120 on the binding affinity to the human CCR5 receptor.

The synthesis of the cyclized tetra, respectively, tri glycosylated peptides **7** and **8**, which contain glycosylations of the asparagines in the direct vicinity of the cysteines of the disulfide

Summary

bridge, was not successful. Here it is presumed that under the prevailing synthesis conditions, the adjacent sugars would appear to block cyclization sterically.

The sequences stated above were synthesized as an open chain **10** and cyclic peptide **13**, and as an open chain **11** and cyclic glycopeptide **14** with double glycosylation using a combination of automatic and manual solid phase synthesis. In addition, the linear **9** and cyclic peptide **12** shortened by six amino acids in the N-terminal direction were synthesized. During glycopeptide synthesis, the problem of aspartimid formation occurs on connection of the glycosyl amino acid building block **6** to the growing peptide chain, resulting in the loss of the sugar building block. Use of TBTU as an activator optimized the coupling yield up to 90 %. Formation of the open chain compounds was performed using orthogonally *S*tBu-protected cysteines, whose side chain protection was preserved during deprotection from the solid phase. Although it was possible to deprotect the *S*tBu-protected cysteines by reduction with DTT, during subsequent oxidative cyclization in highly diluted solution it was not possible to obtain the desired cyclized peptide. Therefore the cyclic compounds **12**, **13** and **14** were synthesized using Trt-protected cysteines, which were obtained after deprotection from the solid phase in an inert atmosphere, by cyclization in a highly diluted solution. After successful purification using RP-HPLC or size exclusion chromatography, all synthesized compounds were fully characterized by using MALDI-TOF-MS and 1D/2D-NMR experiments.

A comparative consideration of the TOCSY spectra of the V3 compounds synthesized within this study clearly revealed differing chemical shifts of the amidic protons of the peptide backbone, depending on glycosylation and cyclization together with the N-terminal extended region. In doing so, comparison of the glycopeptides **11** and **14** with the corresponding non glycosylated peptides **10** and **13** showed striking differences in the immediate vicinity of the glycosylation site. These result in an elongation of the peptide backbone in the area of the glycosylation positions so that these regions reveal better defined structures. However, an altogether more significant difference in the chemical shifts can be observed for the cyclic compounds **14** and **13**. This indicates a greater conformational influence of glycosylation on the cyclized compounds compared to the open chain forms. Disulfide bridging of the loop has a great conformational influence on the whole peptide backbone thus considerably established in its 3D structure. The double glycosylation appears to have an additional highly stabilizing effect on the 3D structure through the conformational influence of the sugars. Comparison of the linear peptide **10** with the corresponding N-terminal shortened peptide **9** showed that when structure defining factors are missing, such as glycosylation or cyclization, there are no great structural differences as a result of the extended N-terminal region. Even so, the remarkable differences between the comparable cyclic compounds **13** and **12** indicate that the additional N-terminal flank of the cyclized V3 loop exercises a conformational effect and appears to have a stabilizing effect on the overall structure.

Summary

Analysis of the NOESY spectra confirmed the conformational influence, caused primarily by cyclization but also by glycosylation. The fact that only sequential NOE contacts occurred at the open chain compounds **9**, **10** and **11**, respectively, and no structure relevant *long-range* NOE contacts could be observed, indicates a relatively stretched and less defined structure of the linear compounds. Here the terminal regions of the open chain loops showed far greater flexibility. Additional sequential NOE contacts in the region of glycosylation revealed the stabilizing effect of the sugar residues on the 3D structure of the glycopeptides **11** and **14**. In the cyclic compounds **12**, **13** and **14**, respectively, numerous structure relevant *long-range* NOEs were found together with a large quantity of sequential NOE contacts. Cyclization of the V3 loop results in what is clearly a better defined structure and in a restricted flexibility. The effect of cyclization and glycosylation on the V3 compounds was examined with regard to their ability to bind to the human coreceptor CCR5, by means of *Biacore*-SPR studies. To analyze the specific interaction *HI5* cells overexpressing the CCR5 coreceptor were used. It was demonstrated that the V3 loop of the HIV interacts with the seven helix transmembrane coreceptor CCR5. The results show both the concentration dependency and also the coreceptor specificity. The V3 compounds **9**, **10**, **11**, **13** and **14** proved that both glycosylation and also cyclization enhance the binding to the coreceptor. Both factors play a significant role, because the 3D structure is far better defined and the V3 compounds therefore exist in a conformation more suitable for binding. The cyclized V3 glycopeptide **14** binds the CCR5 coreceptor better than the unglycosylated cyclic peptide **13** which in turn binds better than the linear glycopeptide **11**. The weakest interaction was shown by the open chain V3 peptide **10**, whereby the corresponding peptide **9** with the N-terminal region shortened by six amino acids showed slightly weaker interaction. The k_{on} values of the association prove the important aspect of the sugar moiety in binding kinetics, because the glycopeptides **11** and **14** showed the fastest association. The binding studies of the V3 compounds **15** to **18** showed that in particular carbohydrate structures and amino acids even beyond N-terminal cysteines of the V3 are necessary for a binding. A mixed binding epitope between V3 peptide sequence and carbohydrate is required for binding to the CCR5 coreceptor, because both shorter and linear peptides as well as sugar **6** itself interact with the coreceptor. A more detailed understanding of this interaction offers the possibility to develop potential HIV entry inhibitors based on the V3 sequence.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften und verwendete Materialien für die Peptid- und Glycopeptidsynthese

Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
Acros Organics	Acetonitril (Ultra Gradient HPLC Grade), TIPS (99 %)
Advanced ChemTech	Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH
Applied Biosystems	DIPEA, Piperidin/DMF (1:4), HATU, Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz
BIACORE AB	NHS, EDC, EA, SDS, Na-Acetat-Puffer pH 5.5, F1 Pioneer Chips
Biochrom	FKS
Calbiochem-Novabiochem	Fmoc-L-Cys(SiBu)-OH, TBTU
Deutero	D ₂ O (99.9 %), DMSO-d ₆ (99.8 %), CDCl ₃ (99.8 %)
Fluka/Riedel-de-Haen	abs. DMF, abs. Methanol
Gibco	Zellkulturmedium RPMI 1640, Trypsin
Merck	Acetanhydrid, Aceton, Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, Dichlormethan, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Dinatriumhydrogenphosphat, Dithiothreitol, Hydrazinhydrat, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Methanol, Natrium, Natriumchlorid, Pyridin, Schwefelsäure (96 %), Toluol, TFA
NIH AIDS Research & Reference Reagent Program	GHOST (3) HI5-Zellen, GHOST (3) Parentalzellen
Proligo	DMF
Sigma-Aldrich	Chitin, DMSO, Neomycin, Penicillin, Puromycin, Streptomycin, Tryphanblau

Manuelle Peptidsynthese

Die benötigte Menge Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz wird in einer Glasfritte für 30 Minuten zum Quellen mit DMF bedeckt. Eingeleitet wird der Zyklus der manuellen Festphasensynthese durch die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin/DMF 1:4. Die Kupplung der Fmoc- und Seitenkettengeschützten Aminosäure wird in vierfachem Überschuss in Gegenwart von fünf Äquivalenten des Aktivators HATU bzw. TBTU und fünf Äquivalenten DIPEA durchgeführt. Es werden Dreifachkupplungen ausgeführt mit Reaktionszeiten zwischen drei und 16 Stunden. Nach sorgfältigem Waschen mit DMF wird zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen mit Ac₂O/DMF 1:9 acetyliert. Abschließend wird gründlich mit DMF gewaschen. Dieser Zyklus wird wiederholt, bis die gewünschte Aminosäuresequenz des Peptids vorliegt. Nach beendeter Synthese wird zur Bestimmung der Kupplungsausbeute die terminale Fmoc-Schutzgruppe manuell abgespalten. Das Harz wird daraufhin gründlich mit Isopropanol und Dichlormethan und abschließend nochmals mit Isopropanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierte Peptidsynthese wurde an einem *Pioneer Peptide Synthesis* System der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt.

Es wird eine der Ansatzgröße und Harzbelegung entsprechende Menge Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz in eine Stempelsäule mit Frittenboden eingewogen. Zum Aufquellen des Harzes wird DMF durch die Glassäule gepumpt. Verwendet werden Fmoc-geschützte L-Aminosäuren, deren zusätzliche funktionelle Gruppen an den Seitenketten geschützt sind. Die Aminosäurederivate werden in vierfachem Überschuss eingesetzt und entsprechend der zu synthetisierenden Sequenz mit Hilfe von Dreifachkupplungen an das Harz geknüpft. Als Aktivator dient HATU bzw. TBTU (jeweils 0.5 M in DMF) in Gegenwart der Base DIPEA (1.0 M in DMF) in jeweils fünffachem Überschuss. Nach Spülen mit DMF wird die jeweilige Aminosäure gelöst und zyklisch durch die Reaktionssäule gepumpt. Die Reaktionszeiten betragen je nach Synthese 60, 90 oder 120 Minuten pro Kupplungsschritt. Zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen wird nach jeder Kupplung fünf Minuten mit 10 %iger Lösung von Acetanhydrid in DMF acetyliert. Die Fmoc-Abspaltung erfolgt mit Piperidin in DMF (1:4) innerhalb von 10 Minuten.

Die Peptidsynthese erfolgt dabei vom C- zum N-Terminus, wobei nach Anknüpfung der letzten Aminosäure deren Fmoc-Schutzgruppe zur Bestimmung der Rohausbeute am Peptid belassen wird. Nach vollendeter Synthese wird das Harz in eine Glasfritte der Porengröße P2 überführt, wo zur Bestimmung der Kupplungsausbeute die terminale Fmoc-Schutzgruppe manuell mittels Piperidin/DMF 1:4 abgespalten wird. Das Harz wird daraufhin gründlich mit Isopropanol und Dichlormethan und abschließend nochmals mit Isopropanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Manuelle Kupplung des N_γ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins 6

Das am Harz befindliche, bis vor die Glycosylierungsstelle synthetisierte Peptid wird in einer Glasfritte zum Quellen für 30 Minuten mit DMF bedeckt. Bezogen auf den daraufhin manuell bestimmten Fmoc-Wert werden der N_γ -Chitobiosyl-Asparagin-Baustein **6**, TBTU und DIPEA im Verhältnis 1:1.5:1.5 umgesetzt, wobei je nach Synthesebedingungen 0.8 bis 1.5 Äquivalente des Glycosylbausteins eingesetzt werden. Dazu wird zunächst der Aktivator mit der Base in absolutem DMF gelöst und zum Glycosylbaustein gegeben. Die Lösung wird auf das unter Schutzgas stehende Harz gebracht und für 24 Stunden unter Stickstoffatmosphäre geschüttelt. Es werden Zweifachkupplungen durchgeführt. Nach sorgfältigem Waschen mit DMF wird zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen acetyliert. Abschließend wird gründlich mit DMF gewaschen.

Fmoc-Abspaltung

Die manuelle Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mittels Piperidin/DMF 1:4, indem das Harz zweimal für jeweils 10 Minuten bedeckt und nachfolgend achtmal mit DMF gewaschen wird. Die vereinigten Phasen werden entsprechend verdünnt. Die Menge des in der Abspaltlösung enthaltenen Methylenfluorens lässt sich photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei 301 nm ermitteln und liefert eine gute Abschätzung für die Kupplungsausbeute. Daraufhin wird mit DMF gespült, bis die Waschlösung neutral ist. Diese photometrischen Untersuchungen wurden an einem *UV-160A* – Photometer der Firma *Shimadzu* vorgenommen.

Acetylierung

Zur Blockierung nicht umgesetzter Aminofunktionen nach den Kupplungen wird das am Harz befindliche Peptid acetyliert, indem das Harz mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}$ 1:9 bedeckt und für 30 Minuten geschüttelt wird. Abschließend wird sorgfältig mit DMF gewaschen.

Auf die Acetylierung des freien N-Terminus des fertiggestellten Produktes wird verzichtet.

O-Deacetylierung von Glycopeptiden an der Festphase

Das am Saccharidanteil peracetylierte Glycopeptid wird an der Festphase deacetyliert, indem das im Stickstoffstrom getrocknete Harz zunächst mit absolutem Methanol gewaschen und anschließend mit Hydrazinhydrat in absolutem Methanol 1:5 bedeckt und für sechs Stunden auf dem Schütteltisch belassen wird. Abschließend wird mehrfach mit absolutem Methanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Abspaltung von Peptiden und Glycopeptiden vom Harz

Zur Abspaltung der Peptide bzw. Glycopeptide von der Festphase, sowie zur Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen, wird das mit absolutem Methanol gewaschene und im Stickstoff-

strom getrocknete Harz mit 10 mL Abspaltlösung, bestehend aus TFA/TIPS/H₂O 95:5:2, bedeckt und zunächst 60 und nach neuer Einbringung 90 Minuten geschüttelt. Die Lösung wird im Wasserstrahlvakuum abgesaugt, das Harz wird dann fünfmal mit Abspaltlösung und fünfmal mit TFA gewaschen und die vereinigten Fraktionen werden im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Der erhaltene Rückstand wird in bidestilliertem Wasser aufgenommen, im Ultraschallbad suspendiert und gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird gefriergetrocknet und mittels HPLC aufgereinigt.

Abspaltung von Cys(Trt)-geschützten Peptiden und Glycopeptiden vom Harz und Bildung einer Disulfidbrücke

Die folgenden Arbeiten werden in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Abspaltlösung wird jeweils frisch angesetzt und ebenso wie die TFA fünfmal entgast und mit Stickstoff gespült. Zur Abspaltung der Cys(Trt)-geschützten Peptide bzw. Glycopeptide, sowie zur Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen, wird das mit absolutem Methanol gewaschene und 30 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknete Harz mit 10 mL Abspaltlösung aus TFA/TIPS/H₂O 95:5:2 bedeckt und zunächst 60 und nach erneuter Einbringung 90 Minuten geschüttelt. Die Lösung wird im Ölpumpenvakuum abgesaugt, das Harz wird dann fünfmal mit Abspaltlösung und fünfmal mit TFA gewaschen und die vereinigten Fraktionen werden im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Das vollständig entschützte, zu zyklisierende Rohprodukt wird unter Stickstoff in einer einstündig entgasten 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (1 µmol Peptid/50 mL) unter zu Hilfenahme von Ultraschall gelöst. Anschließend wird zur oxidativen Zyklisierung die Lösung durch starkes Rühren bei offenem Reaktionsgefäß für 72 Stunden mit Luftsauerstoff durchsetzt. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 3000 D) lässt sich die Lösung entsalzen und von kurzen Abbruchpeptiden abtrennen. Die eingengte Lösung wird gefriergetrocknet und das erhaltene Rohprodukt mittels HPLC aufgereinigt.

Ultrafiltration

Die Ultrafiltrationen wurden mittels einer 400 mL Rührzelle (*Amicon Modell 8400*) bzw. 50 mL (*Amicon Modell 8050*) und einer Membran mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 3000 D der Firma *Millipore YM3* unter einem Druck von 5 Bar durchgeführt.

Die Ultrafiltration wird zum einen genutzt, um nichtdisulfidverbrückte Rohprodukte vor der chromatographischen Aufreinigung bereits von kürzeren Abbruchpeptiden zu trennen. Dazu wird das Rohprodukt in bidestilliertem Wasser gelöst und in der Rührzelle eingengt. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt, woraufhin die eingengte Lösung gefriergetrocknet wird. Zum anderen lässt sich mit Hilfe der Ultrafiltration nach der Disulfidverbrückung die produktthaltige Ammoniumhydrogencarbonatlösung zunächst einengen und dann entsalzen,

indem fünfmal mit bidestilliertem Wasser verdünnt und wieder eingengt wird. Die Lösung wird abschließend gefriergetrocknet.

Aufreinigung der Peptide und Glycopeptide mittels RP-HPLC

Die präparative Aufreinigung von Rohproduktgemischen an *RP*-Phasen wurde an einer *Biocad Sprint*-HPLC-Anlage der Firma *Perseptive* durchgeführt. Als Fraktionssammler wurde ein *Gilson FC205 „Fraction Collector“* eingesetzt. Als stationäre Phase wurde eine *VP 250/21 mm NUCLEOSIL 100-7* μm C_{18} -Säule (Flussrate 20 mL/min) der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Als *RP*-analoge Phase diente eine semipräparative *218TP510-C₁₈*-Säule (1.0 x 25 cm, 5 μm) der Firma *Vydac* (Flussrate 5 mL/min). Als Laufmittelsystem wurde Wasser + 5 % Acetonitril + 0.1 % TFA (Eluent A) und Acetonitril + 5 % Wasser + 0.1 % TFA (Eluent B) eingesetzt. Die Laufmittel sind filtriert, im Ultraschallbad entgast und von HPLC *grade*. Das verwendete Wasser wurde über eine *USF Purelab Plus* gereinigt und in reinsten Qualität eingesetzt.

Zur Reinigung des Rohproduktes wird Lyophilisat in dem Eluentengemisch aufgenommen, welches dem Gemisch bei der Injektion entspricht. Für jeden semipräparativen Lauf werden 400 μL bei maximal 5 mg Substanzmenge und für jeden präparativen Lauf 1 mL bei maximal 25 mg Substanzmenge der Lösung eingesetzt. Es wird für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und ungelöste Rückstände werden abzentrifugiert. Die Elution erfolgt bei Raumtemperatur, wobei unterschiedliche Gradienten zwischen 100 % Eluent A und 100 % Eluent B verwendet werden. Der Gradient wird über Säulenvolumina (*CV, column volume*) eingegeben. Die photometrische Detektion erfolgt bei 215 bzw. 280 nm. Das Acetonitril der gesammelten Fraktionen wird zunächst am Rotationsverdampfer abdestilliert und die Proben anschließend gefriergetrocknet und mittels MALDI-TOF bzw. NMR identifiziert.

Aufreinigung der Peptide und Glycopeptide mittels GPC

Die Aufreinigung von Rohprodukten mittels Gelfiltrationschromatographie wurde an einer *BioSys 2000 Series* HPLC-Anlage der Firma *Beckmann* durchgeführt. Die Trennung erfolgte zum einen über eine *Toyopearl HW 50S* Säule (21 cm x 1.6 cm), wobei die *Toyopearlgel*-Packung (Ethylenglycol/Methacrylat-Copolymer) eine Partikelgröße von 30-60 μm und einen Trennbereich von 500 bis 80000 D aufwies, oder eine *Toyopearl HW 40S* Säule (30 cm x 2.0 cm) mit einer Partikelgröße von 20-40 μm und einem Trennbereich von 100 bis 10000 D. Als Eluent wurde jeweils Wasser/Isopropanol 80:20 als 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung eingesetzt. Zum anderen wurde eine *Superdex Peptide HR 10/30* Säule der Firma *Pharmacia Biotech* (1 cm x 30 cm) mit einer Partikelgröße von 13-15 μm und einem Trennbereich von 100 bis 7000 D verwendet. Als Eluent wurde Wasser + 20 % Acetonitril + 0.1 % TFA eingesetzt. Die Laufmittel sind filtriert, im Ultraschallbad entgast

und von HPLC *grade*. Das verwendete Wasser wurde über eine *USF Purelab Plus* gereinigt und in reinster Qualität eingesetzt. Die photometrische Detektion erfolgte bei 215 nm.

Zur Aufreinigung werden 10 mg des Lyophilisates in 400 μL Elutionsmittel aufgenommen und filtriert. Es werden 300 μL Lösung eingespritzt, wobei isokratisch mit einer Flussrate von 0.5 mL/min eluiert wird. Die vereinigten Fraktionen werden zunächst am Rotationsverdampfer getrocknet und dann bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet.

Aufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren

Die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma *Bruker* im *reflector mode*.

Je nach Ionisationsfähigkeit der zu vermessenen Probe und Empfindlichkeit gegenüber einer möglichen Fragmentierung wird die entsprechende Matrix ausgewählt. Für die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren werden Glycopeptide typischerweise in einer 2,5-Dihydroxybenzoesäurematrix (DHB) und Peptide in einer α -Cyano-4-hydroxymethylsäurematrix (CCA) mit einer Konzentration von 10 pmol/ μL vermessen, wobei die zu untersuchende Substanzprobe zusammen mit der entsprechenden organischen Matrix auf einem Probenhalter kristallisiert wird.

Aufnahme von ESI-LC/MS-Spektren

Für die Identifizierung von Proben mittels ESI-LC-MS wurde ein *HP5989B MS Engine* Massenspektrometer mit *HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface* der Firma *Hewlett Packard* verwendet, welches mit einer *Agilent HPLC Series 1100* gekoppelt war. Als stationäre *RP*-Phase wurde eine *CC 250/2 mm NUCLEOSIL 100-5 μm C₁₈*-Säule (Flussrate 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) der Firma *Macherey & Nagel* eingesetzt. Als Laufmittelsystem wurde Wasser + 5 % Acetonitril + 0.1 % TFA (Eluent A) und Acetonitril + 5 % Wasser + 0.1 % TFA (Eluent B) eingesetzt. Die Laufmittel sind filtriert, im Ultraschallbad entgast und von HPLC *grade*. Das verwendete Wasser wurde über eine *USF Purelab Plus* gereinigt und in reinster Qualität eingesetzt.

Zur Trennung und Identifizierung wird 1 mg des Lyophilisates in 1 mL Elutionsmittel aufgenommen und filtriert. Es werden 100 μL Lösung eingespritzt, wobei mit dem entsprechenden Elutionssystem genau jene Gradienten eingestellt werden, welche auch bei der präparativen *RP*-HPLC zum Einsatz kommen. Der Gradient wird über Säulenvolumina (CV, *column volume*) eingegeben. Die photometrische Detektion erfolgt bei 215 nm.

Aufnahme von NMR-Spektren

Zur Durchführung der NMR-Experimente standen zwei Geräte der Firma *Bruker* zur Verfügung. Das *DRX 500* Spektrometer besitzt einen Magneten mit einer magnetischen Induktion von 11.67 Tesla, entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für

Protonen und 125.77 MHz für ^{13}C -Kerne. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet. Das *Avance 700* Spektrometer besitzt einen Magneten mit einer magnetischen Induktion von 16.35 Tesla, entsprechend einer Larmor-Frequenz von 700.13 MHz für Protonen und 175.03 MHz für ^{13}C -Kerne. Das Spektrometer ist mit einem inversen 5 mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen bzw. mit einem TXI-Probenkopf ohne Cryo-Technologie ausgestattet.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei 300 K. Der pH-Wert der Proben wurde mit TFA auf 3.5 eingestellt. Durch eine Vorsättigung (49 dB) des H_2O -Resonanzsignals oder in Form einer *Watergate*-Pulssequenz wurde bei der Spektrenaufnahme eine Wasserunterdrückung erreicht. Die 2D-Experimente wurden phasensensitiv durch TPPI (*Time Proportional Phase Increments*) aufgenommen. Die Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur, Kalibrierung und Auswertung der Spektren erfolgte an einer *Silicon Graphics Workstation (O2, Octane)* unter Zuhilfenahme der Software *XWINNMR 3.1* und *Aurelia 3.0.1* von Bruker. Die Zuordnung der ^1H -Signale erfolgte mit Hilfe von TOCSY-, NOESY- und HSQC-Experimenten, die der ^{13}C -Signale mit dem HSQC- sowie dem HMBC-Experiment. Die Sequenzbestimmung gelang mit Hilfe der NOESY-Experimente. Die Zuordnung der Zuckerprotonen sowie die Bestimmung der NH-H_α Kopplungskonstanten erfolgte in DQF-COSY-Experimenten. Die chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren sind in Einheiten der δ -Skala angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind, wenn nicht anders angegeben ^3J -Kopplungen und in Hertz angegeben. Die Indices kennzeichnen die jeweils miteinander koppelnden Wasserstoffatome. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte auf das jeweilige Lösungsmittelsignal (H_2O : $\delta = 4.75$ ppm; CDCl_3 : $\delta = 7.28$ ppm; DMSO: $\delta = 2.53$ ppm) bzw. auf das NH -Signal von Tyrosin bei 8.012 ppm.

7.2 Darstellung des N_γ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins 6

Verschiedenes

Die im Folgenden verwendeten Lösungsmittel sind - sofern notwendig - vor den Reaktionen nach den üblichen Methoden getrocknet und destilliert worden. Chloroform und Methanol wurden bei Normaldruck destilliert. DMF wurde über Molsieb der Größe 3A verwahrt. Essigsäureanhydrid wurde über wasserfreiem Natriumacetat getrocknet und bei Normaldruck destilliert. Pyridin wurde über Calciumhydrid getrocknet und anschließend bei Normaldruck destilliert.

Die im folgenden Teil beschriebenen Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie (GF₂₅₄, Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte dabei in Abhängigkeit der Reaktionspartner durch UV-Absorption bzw. Eintauchen in eine

ethanolisch/wässrige Lösung von Schwefelsäure (10 %ig) und anschließender Wärmebehandlung mit einem Heißluftfön.

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte in präparativem Maßstab unter erhöhtem Druck (4-10 bar) an Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm, Merck).

Synthese von 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 2

Eine Lösung aus 500 mL Essigsäureanhydrid und 40 mL konz. Schwefelsäure wird auf 54 °C temperiert. Unter starker KPG-Rührung werden 60 g fein gemahlene Chitin **1** (141.8 mmol Dimereinheiten) in kleinen Portionen zugesetzt, wobei sich die anfangs hellgelbe Lösung tiefbraun verfärbt. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden wird das Gemisch auf 34 °C abgekühlt und unter Einwirkung von Ultraschall wird 38 Stunden gespalten. Die erkaltete Lösung wird daraufhin vorsichtig in 800 mL Eiswasser gegeben, mit 300 g Natriumacetat versetzt und für eine Stunde gerührt. Man extrahiert mit Chloroform, neutralisiert mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und wäscht anschließend mehrfach mit Wasser und trocknet die organische Phase über Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird bei maximal 30 °C unter vermindertem Druck entfernt.

Die Auftrennung des Oligomeregemisches erfolgt mittels einer Mitteldruckpumpe über eine Kieselgelsäule (Laufmittel: CHCl₃/MeOH 100:1). Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute:

Die Ausbeute beträgt 4.26 g (6.30 mmol) Chitobioseoctaacetat **2**, entsprechend 4.4 % bezogen auf die eingesetzte Menge Dimer im polymeren Chitin **1**.

Charakterisierung:

C₂₈H₄₀N₂O₁₇ (MW = 676.64 g/mol)

Es handelt sich bei **2** um einen weißen Feststoff. Der R_F-Wert für das Laufmittelsystem CHCl₃/MeOH 9:1 beträgt 0.41. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein [M+Na]⁺-Signal von m/z = 699.4.

Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-4-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose 3

Es werden 1.11 g (1.64 mmol) Chitobioseoctaacetat **2** in 75 mL abs. Methanol gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit frisch hergestellter 1 %iger Natriummethanolatlösung auf einen Wert von 9 eingestellt, und das Gemisch wird bei Raumtemperatur gerührt; gegebenenfalls der pH-Wert der Lösung korrigiert und die Deacetylierung dünnschichtchromatographisch (Laufmittel CHCl₃/MeOH 1:1) überwacht. Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden wird durch Zugabe von Trockeneis neutralisiert und das Reaktionsprodukt zunächst am Rotationsverdampfer und dann an der Ölpumpe bis zur Trockene eingengt.

Ausbeute:

Die Ausbeute beträgt 586.7 mg (1.38 mmol) Di-N-Acetylchitobiose **3**, entsprechend 84 % bezogen auf die eingesetzte Menge Chitobioseoctaacetat **2**.

Charakterisierung:

$C_{16}H_{28}N_2O_{11}$ MW = 424.42 g/mol

Es handelt sich bei **3** um einen weißen Feststoff. Der R_f -Wert für das Laufmittelsystem $CHCl_3/MeOH$ 1:1 beträgt 0.34. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[M+Na]^+$ -Signal von $m/z = 447.2$.

Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-4-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosylamin 4

Es werden 586.7 mg (1.38 mmol) Di-N-Acetylchitobiose **3** in 20 mL gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst und bei 50 °C gerührt (DC-Kontrolle EtOAc/MeOH/H₂O 4:3:2). Nach einer Reaktionszeit von 21 Stunden wird das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingengt, und durch abschließende Gefriertrocknung bis zur Gewichtskonstanz wird das Chitobiosylamin **4** erhalten.

Ausbeute:

Die Ausbeute beträgt 526.8 mg (1.24 mmol) Chitobiosylamin **4**, entsprechend 90 % bezogen auf die eingesetzte Di-N-Acetylchitobiose **3**.

Charakterisierung:

$C_{16}H_{29}N_3O_{10}$ MW = 423.42 g/mol

Es handelt sich bei **4** um einen gelblich-weißen Feststoff. Der R_f -Wert für das Laufmittelsystem EtOAc/MeOH/H₂O 4:3:2 beträgt 0.52. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[M+Na]^+$ -Signal von $m/z = 446.1$.

Synthese von C_α -tert.-butyl- N_α -(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_γ -[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 5

Es werden 0.9 eq 460.7 mg (1.120 mmol) Fmoc-Asp-OtBu, 1.2 eq 479.4 mg (1.493 mmol) TBTU und 1.2 eq 256 μ L (1.493 mmol) DIPEA in 5 mL getrocknetem DMF gelöst und unter Stickstoffatmosphäre für 10 Minuten gerührt. Diese Lösung wird unter Schutzgas langsam bei -15 °C (Eis/Kochsalzbad) zu 526.8 mg (1.244 mmol) Chitobiosylamin **4**, gelöst in 15 mL trockenem DMF, getropft. Die Lösung wird 6 Stunden bei -15 °C gerührt (DC-Kontrolle EtOAc/MeOH/H₂O 4:3:2, $R_f = 0.8$), woraufhin ein Großteil des Lösungsmittels an der Ölpumpe abgezogen wird. Dann wird mit einem Gemisch aus 50 mL abs. Pyridin und 40 mL dest. Ac₂O versetzt (DC-Kontrolle $CHCl_3/MeOH$ 9:1). Nach einer Reaktionszeit von

12 Stunden bei 10 °C wird das Reaktionsprodukt im Vakuum getrocknet und mehrmals mit Toluol codestilliert.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch mit Hilfe einer Mitteldrucksäule (Kieselgel, Laufmittel CHCl₃/MeOH 50:1).

Ausbeute:

Die Ausbeute beträgt 0.910 g (0.894 mmol) Fmoc-Asn(β-D-GlcNAc-(1-4)-β-D-GlcNAc)-OtBu **5**, entsprechend 80 % bezogen auf das im Unterschuss eingesetzte Fmoc-Asp-OtBu.

Charakterisierung:

C₄₉H₆₂N₄O₂₀ MW = 1027.01 g/mol

Es handelt sich bei **5** um einen weißen Feststoff. Der R_f-Wert für das Laufmittelsystem CHCl₃/MeOH 9:1 beträgt 0.55. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein [M+Na]⁺-Signal von m/z = 1050.0.

Synthese von N_α-(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N_γ-[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 **6**

Es werden 0.910 g (0.894 mmol) Fmoc-Asn(β-D-GlcNAc-(1-4)-β-D-GlcNAc)-OtBu **5** in 50 mL TFA/H₂O 19:1 gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute:

Die Ausbeute beträgt 868.0 mg (0.894 mmol) Fmoc-Asn(β-D-GlcNAc-(1-4)-β-D-GlcNAc)-COOH **6**, entsprechend 100 % bezogen auf das eingesetzte Fmoc-Asn(β-D-GlcNAc-(1-4)-β-D-GlcNAc)-OtBu **5**.

Charakterisierung:

C₄₅H₅₄N₄O₂₀ MW = 970.90 g/mol

Es handelt sich bei **6** um einen weißen Feststoff. Der R_f-Wert für das Laufmittelsystem CHCl₃/MeOH 5:1 beträgt 0.60. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein [M+Na]⁺-Signal von m/z = 994.0.

7.3 Synthese der Peptide und Glycopeptide

7.3.1 Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen verkürzten V3-Peptides **9**

C(S_tBu)TRPNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC(S_tBu)NISRAKWN DTLK

Entsprechend einer Ansatzgröße von 100 µmol erfolgte die Kupplung der ersten 26 Aminosäuren mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese. Als Aktivator diente TBTU. Es wurden Dreifachkupplungen von jeweils 120 Minuten durchgeführt. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 89 µmol (89 %).

Mit Hilfe des Peptidsynthesizers wurden dann (entsprechend 89 µmol) die folgenden 21 Aminosäuren unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 120 Minuten angeknüpft. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 65 µmol (73 %).

Etwa die Hälfte des Ansatzes von 65 µmol (32.5 µmol) wurde vom Harz abgespalten und entschützt, im Ölpumpenvakuum eingengt und gefriergetrocknet, wobei der restliche Ansatz von 32.5 µmol wie unter 7.3.2 beschrieben weiterverarbeitet wurde. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 1000 D) wurde die Lösung des offenkettigen Rohproduktes vor der chromatographischen Aufreinigung bereits von kürzeren Abbruchpeptiden getrennt, dann eingengt und daraufhin gefriergetrocknet.

Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels HPLC an einer präparativen *RP-C*₁₈-Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 80/20 → 80/20 (1 CV) → 70/30 (0.25 CV) → 60/40 (5 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 80/20 (1 CV), *R*_t = 16.5 min bei 35.0 % B, Flussrate 20 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das bereits vorgereinigte Produkt durch HPLC an einer semipräparativen *RP-C*₁₈ analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (1 CV) → 61/39 (6 CV) → 0/100 (1 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), *R*_t = 24 min bei 34 % B, Flussrate 5 mL/min).

Ausbeute:

Nach der Aufreinigung wurden 7.8 mg (1.4 µmol) des gewünschten Produktes **9** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 2.8 % bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes.

Charakterisierung:

$C_{236}H_{385}N_{77}O_{67}S_4$ MW = 5497.80 g/mol

Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[M+H]^+$ -Signal des offenkettigen unglycosylierten Peptides **9** von $m/z = 5498.66$. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung s. Tabelle 18.

Experimenteller Teil

AS	MH (Hz)	α	α' / β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Cys1		4.739	3.118	3.199					tBu: 1.308
Thr2	8.246 (8.0)	4.436			1.232				
Arg3	8.510 (7.2)	4.592	1.729	1.844	1.663	1.663	3.201	3.201	ϵ : 7.186; η : 6.642
Pro4		4.437	2.261	2.261	1.900	2.012	3.624	3.817	
Asn5	8.519 (7.7)	4.670	2.770	2.831			6.895	7.584	
Asn6	8.444 (7.9)	4.704	2.756	2.834			6.895	7.584	
Asn7	8.477 (6.9)	4.768	2.775	2.854			6.895	7.584	
Thr8	8.091 (7.3)	4.281			1.190				
Arg9	8.283 (6.8)	4.321	1.764	1.848	1.620	1.620	3.181	3.181	ϵ : 7.152; η : 6.658
Lys10	8.292 (8.0)	4.322	1.736	1.815	1.389	1.438	1.594	1.594	ϵ/ϵ' : 2.970
Ser11	8.295 (6.8)	4.455	3.803	3.803					
Ile12	8.100 (8.1)	4.177	1.794		1.116	1.335	0.827		γ'' : 0.827
His13	8.587 (8.4)	4.724	3.103	3.191			7.234		ϵ : 8.567
Ile14	8.242 (8.3)	4.206	1.801		1.140	1.429	0.817		γ'' : 0.882
Gly15	8.316 (5.0)	4.030	4.134						
Pro16		4.462	2.289	2.289	1.900	2.019	3.645	3.803	
Gly17	8.469 (5.1)	3.933	3.933						
Arg18	8.105 (6.7)	4.262	1.673	1.770	1.546	1.546	3.127	3.127	ϵ : 7.117; η : 6.614
Ala19	8.233 (7.1)	4.135	1.232						
Phe20	8.042 (7.7)	4.524	2.941	2.995			7.117		ϵ : 7.295; ζ : 7.256
Tyr21	8.012 (8.0)	4.631	2.883	3.025			7.066		ϵ : 6.780
Thr22	8.029 (6.8)	4.392	4.207		1.164				
Thr23	8.114 (6.9)	4.285			1.216				
Gly24	8.388 (6.4)	3.918	3.967						
Glu25	8.087 (7.3)	4.319	1.960	2.033	2.365	2.365			
Ile26	8.231 (8.3)	4.134	1.828		1.144	1.452	0.836		γ'' : 0.836
Ile27	8.217 (7.1)	4.118	1.828		1.164	1.447	0.812		γ'' : 0.881
Gly28	8.361 (5.9)	3.918	3.918						
Asp29	8.193 (7.8)	4.670	2.736	2.824					
Ile30	8.120 (7.2)	4.114	1.906			1.437	0.832		γ'' : 0.890
Arg31	8.331 (6.8)	4.250	1.780	1.838	1.594	1.648	3.179	3.179	ϵ : 7.296; η : 6.625
Gln32	8.151 (7.1)	4.260	1.947	2.083	2.337	2.337			ϵ : 6.897; ϵ' : 7.546
Ala33	8.163 (7.9)	4.211	1.325						
His34	8.416 (7.7)	4.661	3.171	3.264			7.263		ϵ : 8.587
Cys35	8.302 (7.6)	4.626	3.015	3.098					tBu: 1.308
Asn36	8.585 (7.5)	4.778	2.751	2.834			6.895	7.584	
Ile37	7.962 (8.1)	4.184	1.877		1.173	1.442	0.836		γ'' : 0.900
Ser38	8.327 (6.9)	4.407	3.850	3.889					
Arg39	8.297 (6.7)	4.211	1.698	1.840	1.574	1.574	3.117	3.117	ϵ : 7.131; η : 6.614
Ala40	8.132		1.291						
Lys41	8.130 (7.9)	4.213	1.682	1.740			1.623	1.623	ϵ/ϵ' : 2.932
Trp42	8.024 (7.7)	4.607	3.259	3.259			7.209		ϵ : 7.468; ζ : 7.131; η : 7.214; ζ' : 7.589
Asn43	8.072 (7.2)	4.553	2.600	2.600			6.895	7.584	
Asp44	8.144 (7.9)	4.573	2.727	2.796					
Thr45	8.050 (6.8)	4.251			1.180				
Leu46	8.038 (7.1)	4.304	1.569	1.643	1.569		0.832	0.890	
Lys47	8.126 (8.2)	4.241	1.738	1.824	1.378	1.433	1.653	1.653	ϵ/ϵ' : 2.966; CONH ₂ : 7.069/7.454

Tabelle 18: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen und ³J_(NH/H α)-Kopplungskonstanten des Peptides **9**.

7.3.2 Synthese des nicht glycosylierten offenkettigen V3-Peptides **10**

ESVEINC(S*t*Bu)TRPNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC(S*t*Bu)NISR AKWNDTLK

Entsprechend einer Ansatzgröße von 100 μmol erfolgte die Kupplung der ersten 47 Aminosäuren mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese, wie es unter 7.3.1 beschrieben ist, woraufhin eine Belegung von 65 μmol (65 %) am Harz vorlagen.

Nachdem etwa die Hälfte des Ansatzes von 65 μmol (32.5 μmol) wie unter 7.3.1 aufgeführt abgenommen und vom Harz abgespalten wurde, wurde der restliche Ansatz von 32.5 μmol um weitere sechs Aminosäuren verlängert. Diese wurden mit Hilfe des Peptidsynthesizers unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 120 Minuten angeknüpft. Die nachfolgende Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 22 μmol (68 %).

Das Peptid wurde vom Harz abgespalten und entschützt, im Ölpumpenvakuum eingeengt und gefriergetrocknet. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 3000 D) wurde die Lösung des offenkettigen Rohproduktes vor der chromatographischen Aufreinigung bereits von kürzeren Abbruchpeptiden getrennt, dann eingeengt und daraufhin gefriergetrocknet.

Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels HPLC an einer präparativen *RP-C*₁₈-Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 60/40 (5 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (2 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), $R_t = 35.5$ min bei 37.4 % B, Flussrate 16 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das bereits vorgereinigte Produkt durch HPLC an einer semipräparativen *RP-C*₁₈ analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 80/20 (1 CV) \rightarrow 63/37 (5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), $R_t = 23.5$ min bei 34.4 % B, Flussrate 5 mL/min).

Ausbeute:

Nach der Aufreinigung wurden 6.6 mg (1.1 μmol) des gewünschten Produktes **10** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 2.1 % bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes.

Charakterisierung:

$\text{C}_{264}\text{H}_{430}\text{N}_{84}\text{O}_{79}\text{S}_4$ MW = 6169.11 g/mol

Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal des offenkettigen unglycosylierten Peptides **10** von $m/z = 6170.49$. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung s. Tabelle 19.

Experimenteller Teil

AS	MH (Hz)	α	α' / β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Glu1		4.263	1.946	2.080	2.336	2.336			
Ser2	8.297 (7.9)	4.452	3.803	3.803					
Val3	8.297 (8.1)	4.146	2.063		0.920	0.920			
Glu4	8.417 (7.3)	4.406	1.953	2.064	2.415	2.415			
Ile5	8.177 (8.0)	4.154	1.833		1.166	1.438	0.823		γ'' : 0.882
Asn6	8.498 (7.9)	4.716	2.739	2.839			6.894	7.572	
Cys7	8.361 (7.4)	4.708	3.046	3.163					tBu: 1.308
Thr8	8.252 (8.2)	4.332	4.179		1.177				
Arg9	8.234 (7.5)	4.625	1.720	1.841	1.668	1.668	3.196	3.196	ϵ : 7.171; η : 6.670
Pro10		4.408	2.282	2.282	1.903	2.015	3.631	3.784	
Asn11	8.509 (7.8)	4.670	2.721	2.828			6.894	7.572	
Asn12	8.417 (7.7)	4.698	2.756	2.834			6.894	7.572	
Asn13	8.467 (7.2)	4.767	2.775	2.851			6.894	7.572	
Thr14	8.079 (7.2)	4.293			1.194				
Arg15	8.272 (7.0)	4.318	1.763	1.847	1.624	1.624	3.179	3.179	ϵ : 7.151; η : 6.600
Lys16	8.274 (7.9)	4.318	1.737	1.821	1.400	1.437	1.600	1.600	ϵ/ϵ' : 2.974
Ser17	8.283 (6.6)	4.452	3.803	3.803					
Ile18	8.093 (8.0)	4.174	1.796		1.115	1.322	0.825		γ'' : 0.888
His19	8.585 (8.4)	4.697	3.102	3.185			7.232		ϵ : 8.564
Ile20	8.241 (8.0)	4.202	1.803		1.180	1.426	0.814		γ'' : 0.882
Gly21	8.314 (5.0)	4.031	4.031						
Pro22		4.428	2.263	2.631	1.903	2.007	3.623	3.790	
Gly23	8.470 (5.0)	3.930	3.930						
Arg24	8.104 (6.4)	4.262	1.675	1.769	1.546	1.546	3.127	3.127	ϵ : 7.115; η : 6.586
Ala25	8.230 (7.0)	4.137	1.233						
Phe26	8.045 (7.9)	4.525	2.948	2.985			7.118		ϵ : 7.291; ζ : 7.255
Tyr27	8.012 (8.4)	4.603	2.883	3.028			7.065		ϵ : 6.778
Thr28	8.023 (6.7)	4.391	4.210		1.167				
Thr29	8.115 (7.3)	4.286			1.216				
Gly30	8.389 (6.3)	3.939	3.939						
Glu31	8.082 (7.0)	4.321	1.963	2.036	2.377	2.377			
Ile32	8.227 (8.2)	4.126	1.830		1.147	1.452	0.837		γ'' : 0.837
Ile33	8.219 (7.0)	4.118	1.830		1.157	1.454	0.812		γ'' : 0.883
Gly34	8.366 (5.7)	3.920	3.920						
Asp35	8.210 (8.1)	4.675	2.756	2.840					
Ile36	8.104 (7.2)	4.111	1.896		1.191	1.439	0.843		γ'' : 0.884
Arg37	8.328 (6.6)	4.258	1.769	1.831	1.591	1.642	3.174	3.174	ϵ : 7.260; η : 6.620
Gln38	8.165 (7.0)	4.262	1.947	2.076	2.337	2.333			ϵ : 6.891; ϵ' : 7.546
Ala39	8.183 (7.7)	4.215	1.325						
His40	8.424 (7.9)	4.629	3.169	3.261			7.263		ϵ : 8.586
Cys41	8.311 (7.5)	4.625	3.007	3.091					tBu: 1.308
Asn42	8.590 (7.8)	4.768	2.745	2.828			6.894	7.572	
Ile43	7.967 (8.2)	4.184	1.874		1.175	1.442	0.837		γ'' : 0.894
Ser44	8.330 (6.7)	4.407	3.841	3.890					
Arg45	8.300 (6.6)	4.212	1.696	1.841	1.577	1.577	3.114	3.114	ϵ : 7.127; η : 6.592
Ala46	8.132		1.289						
Lys47	8.116 (8.2)	4.223	1.692	1.733	1.287	1.344	1.618	1.618	ϵ/ϵ' : 2.929
Trp48	8.017 (7.7)	4.625	3.258	3.258			7.208		ϵ : 7.467; ζ : 7.132; η : 7.213; ζ' : 7.589
Asn49	8.075 (7.0)	4.555	2.575	2.631			6.894	7.572	
Asp50	8.153 (8.1)	4.583	2.744	2.812					
Thr51	8.048 (7.0)	4.249			1.180				
Leu52	8.040 (7.0)	4.307	1.573	1.640	1.573		0.836	0.889	
Lys53	8.138 (8.0)	4.245	1.735	1.822	1.392	1.424	1.652	1.652	ϵ/ϵ' : 2.968; CONH ₂ : 7.067/7.454

Tabelle 19: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen und ³J_(NH/H α)-Kopplungskonstanten des Peptides 10.

7.3.3 Versuche zur Zyklisierung des Cys(S*t*Bu)-geschützten verkürzten V3-Peptides 9

Es wurden 2.0 mg (0.36 μmol) des Cys(S*t*Bu)-geschützten Peptides **9** in 8 mL 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, zur Reduktion mit Dithiothreitol im Überschuss versetzt und unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entschützung der Cysteine (Reaktionsverfolgung mittels MALDI-TOF) wurde mit 150 mL 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung verdünnt, sowie ein Volumenprozent DMSO zugegeben. Anschließend wurde zur oxidativen Zyklisierung die Lösung durch starkes Rühren und unter Verwendung einer Gasfritte mit Luftsauerstoff durchsetzt. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 1000 D) wurde die Lösung entsalzt und eingengt und daraufhin gefriergetrocknet.

	1.Versuch	2.Versuch	3.Versuch
Überschuss an DTT [Eq]	15 (0.6 mg)	10 (0.4 mg)	5 (0.2 mg)
Reduktionszeit [h]	6	8	48
Oxidationszeit [Tage]	1	5	7

Tabelle 20: Verwendete Überschüsse an DTT und Reaktionszeiten.

Ausbeute:

Das gewünschte Produkt ist nicht entstanden.

Charakterisierung:

$\text{C}_{228}\text{H}_{367}\text{N}_{77}\text{O}_{67}\text{S}_2$ MW = 5319.71 g/mol

Es wurde ein unlösliches Polymerisat erhalten. Mittels MALDI-TOF konnte in einer Schichtpräparation der Suspension kein Produkt der entsprechenden Masse identifiziert werden, allerdings lieferte die Reaktionsverfolgung mittels MALDI-TOF ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal des offenkettigen entschützten Peptides von $m/z = 5322.94$.

7.3.4 Synthese des diglycosylierten offenkettigen V3-Peptides 11

**ESVEINC(S*t*Bu)TRPNN(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAF
YTTGEIIGDIRQAHC(S*t*Bu)NISRAKWN(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)
DTLK**

Entsprechend einer Ansatzgröße von 87 μmol erfolgte die Kupplung der ersten vier Aminosäuren mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese. Als Aktivator diente TBTU. Es wurden Dreifachkupplungen von jeweils 120 Minuten durchgeführt. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 87 μmol (100 %).

Für den Einbau des Glycosylbausteins **6** in die Peptidkette wurden in manuell durchgeführten Zweifachkupplungen mit einer Kupplungszeit von jeweils 24 Stunden je 1.0 eq (84.5 mg;

Experimenteller Teil

87 μmol) von **6**, 1.5 eq (42.1 mg; 131 μmol) TBTU und 1.5 eq (22 μL ; 131 μmol) DIPEA eingesetzt. Die anschließende Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab mit 72 μmol eine Glycosylierungsausbeute von 83 %.

Mit Hilfe des Peptidsynthesizers wurden dann (entsprechend 72 μmol) die folgenden sieben Aminosäuren unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 120 Minuten angeknüpft. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 72 μmol (100 %).

Wiederum mittels Peptidsynthesizer wurden daraufhin (entsprechend 72 μmol) weitere 29 Aminosäuren unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 90 Minuten angeknüpft. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 32 μmol (44 %).

Für den Einbau des zweiten Glycosylbausteins in die Peptidkette wurden in manuell durchgeführten Dreifachkupplungen mit einer Kupplungszeit von jeweils 24 Stunden je 1.5 eq (46.6 mg; 48 μmol) von **6**, 2.2 eq (22.5 mg; 70 μmol) TBTU und 2.2 eq (12 μL ; 70 μmol) DIPEA eingesetzt. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab mit 28 μmol eine Glycosylierungsausbeute von 88 %.

Die Anknüpfung der restlichen 11 Aminosäuren erfolgte (entsprechend 28 μmol) manuell jeweils mittels Dreifachkupplung zu je drei Stunden. Es wurden dabei 4.0 eq (112 μmol) der entsprechenden Aminosäure, 5.0 eq (140 μmol) TBTU und 5.0 eq (140 μmol) DIPEA eingesetzt. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 28 μmol (100 %).

Das an der Festphase befindliche Glycopeptid wurde mit Hydrazinhydrat/abs. Methanol 1:5 deacetyliert, vom Harz abgespalten und entschützt, im Ölpumpenvakuum eingeengt und gefriergetrocknet. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 3000 D) wurde die Lösung des offenkettigen Rohproduktes vor der chromatographischen Aufreinigung bereits von kürzeren Abbruchpeptiden getrennt, dann eingeengt und daraufhin gefriergetrocknet.

Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels HPLC an einer präparativen *RP-C₁₈*-Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 60/40 (5 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (2 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), R_t = 35.5 min bei 37.4 % B, Flussrate 16 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das bereits vorgereinigte Produkt über eine in Reihe geschaltete *Toyopearl* HW 50S Säule und eine *Toyopearl* HW 40S Säule (jeweils Ethylenglycol/Methacrylat-Copolymer) isokratisch mittels Wasser/Isopropanol 80:20 als 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung eluiert (Flussrate 0.5 mL/min, R_t = 190 min). Abschließend wurde durch HPLC an einer semipräparativen *RP-C₁₈* analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 81/19 (0.2 CV) \rightarrow 67/33 (6 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), R_t = 27 min bei 32.5 % B, Flussrate 5 mL/min).

Experimenteller Teil

Ausbeute:

Nach der Aufreinigung wurden 5.4 mg (0.8 μmol) des gewünschten Produktes **11** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 0.9 % bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes.

Charakterisierung:

$\text{C}_{296}\text{H}_{482}\text{N}_{88}\text{O}_{99}\text{S}_4$ MW = 6981.43 g/mol

Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal des offenkettigen Glycopeptids **11** von $m/z = 6982.59$. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung s. Tabelle 21 und 22.

an Asn12	MH1 (Hz)	MH2 (Hz)	1	2	3	4	5	6a/6b	Ac
GlcNAc	8.607 (9.0)	8.176 (9.3)	5.017	3.839	3.734	3.629	3.536	3.789/ 3.569	2.008
GlcNAc'		8.353 (9.5)	4.569	3.740	3.559	3.472	3.489	3.879/ 3.705	2.060

an Asn49	MH1 (Hz)	MH2 (Hz)	1	2	3	4	5	6a/6b	Ac
GlcNAc	8.503 (8.9)	8.155 (9.2)	4.980	3.810	3.729	3.626	3.506	3.801/ 3.581	1.997
GlcNAc'		8.353 (9.5)	4.569	3.740	3.559	3.472	3.489	3.879/ 3.705	2.060

Tabelle 21: ^1H -NMR-chemische Verschiebungen und $^3J_{(\text{NH}/\text{H}\alpha)}$ -Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen des Glycopeptids **11**.

Experimenteller Teil

AS	MH (Hz)	α	α' / β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Glu1		4.268	1.936	2.068	2.324	2.324			
Ser2	8.307 (7.8)	4.456	3.811	3.811					
Val3	8.300 (7.1)	4.148	2.065		0.929	0.929			
Glu4	8.417 (7.6)	4.410	1.958	2.068	2.424	2.424			
Ile5	8.183 (8.1)	4.158	1.838		1.181	1.441	0.893		γ'' : 0.893
Asn6	8.502 (7.5)	4.724	2.745	2.844			6.909	7.573	
Cys7	8.362 (7.4)	4.715	3.052	3.167					tBu: 1.290
Thr8	8.254 (8.2)	4.339	4.175		1.180				
Arg9	8.260 (7.8)	4.633	1.722	1.841	1.671	1.671	3.205	3.205	ϵ : 7.168
Pro10		4.407	2.284	2.284	1.900	2.010	3.628	3.773	
Asn11	8.480 (7.5)	4.649	2.801	2.801			6.909	7.573	
Asn12	8.485 (7.2)	4.706	2.780	2.820			8.607		
Asn13	8.423 (7.6)	4.723	2.773	2.851			6.909	7.573	
Thr14	8.070 (7.0)	4.272	4.210		1.195				
Arg15	8.284 (7.3)	4.317	1.762	1.850	1.605	1.638	3.183	3.183	ϵ : 7.139
Lys16	8.288 (8.0)	4.321	1.737	1.814	1.384	1.450	1.661	1.661	ϵ/ϵ' : 2.978
Ser17	8.296 (6.7)	4.453	3.807	3.807					
Ile18	8.107 (8.0)	4.180	1.796		1.126	1.339	0.834		γ'' : 0.834
His19	8.592 (8.1)	4.730	3.111	3.194			7.215		ϵ : 8.570
Ile20	8.248 (7.3)	4.208	1.807		1.144	1.432	0.894		γ'' : 0.894
Gly21	8.325 (5.5)	4.033	4.033						
Pro22		4.437	2.252	2.252	1.897	2.008	3.610	3.789	
Gly23	8.467 (5.1)	3.935	3.935						
Arg24	8.108 (6.8)	4.260	1.677	1.769	1.546	1.546	3.131	3.131	ϵ : 7.101
Ala25	8.237 (6.0)	4.224	1.240						
Phe26	8.050 (7.7)	4.525	2.946	2.999			7.097		ϵ : 7.272; ζ : 7.236
Tyr27	8.012 (8.1)	4.631	2.883	3.027			7.047		ϵ : 6.785
Thr28	8.019 (6.2)	4.390	4.214		1.171				
Thr29	8.115 (7.2)	4.290	4.224		1.220				
Gly30	8.389 (6.0)	3.941	3.941						
Glu31	8.080 (7.3)	4.319	1.969	2.041	2.387	2.387			
Ile32	8.236 (7.0)	4.138	1.827		1.159	1.340	0.845		γ'' : 0.845
Ile33	8.230 (7.0)	4.122	1.836		1.166	1.459	0.819		γ'' : 0.893
Gly34	8.371 (5.9)	3.926	3.926						
Asp35	8.214 (7.4)	4.679	2.769	2.852					
Ile36	8.104 (7.0)	4.116	1.904		1.192	1.450	0.894		γ'' : 0.894
Arg37	8.330 (6.7)	4.267	1.773	1.841	1.592	1.653	3.184	3.184	ϵ : 7.245
Gln38	8.177 (7.0)	4.265	1.953	2.081	2.342	2.342			ϵ : 6.913; ϵ' : 7.552
Ala39	8.197 (7.0)	4.214	1.330						
His40	8.431 (7.6)	4.666	3.177	3.267			7.246		ϵ : 8.595
Cys41	8.316 (7.6)	4.629	3.014	3.096					tBu: 1.290
Asn42	8.594 (7.8)	4.830	2.749	2.832			6.909	7.573	
Ile43	7.972 (7.4)	4.185	1.879		1.178	1.445	0.837		γ'' : 0.900
Ser44	8.340 (6.8)	4.416	3.848	3.884					
Arg45	8.301 (6.6)	4.212	1.693	1.837	1.554	1.587	3.118	3.118	ϵ : 7.112
Ala46	8.144 (7.0)	4.200	1.298						
Lys47	8.157 (7.6)	4.243	1.677	1.753	1.287	1.360	1.626	1.626	ϵ/ϵ' : 2.945
Trp48	7.989 (7.1)	4.587	3.252	3.252			7.215		ϵ : 7.474; ζ : 7.129; η : 7.222; ζ' : 7.564
Asn49	8.107 (7.8)	4.570	2.500	2.578			8.503		
Asp50	8.059 (8.0)	4.579	2.727	2.803					
Thr51	8.049 (7.7)	4.245	4.187		1.181				
Leu52	8.076 (7.4)	4.311	1.576	1.646	1.576		0.842	0.899	
Lys53	8.149 (8.3)	4.245	1.739	1.824	1.389	1.437	1.655	1.655	ϵ/ϵ' : 2.970; CONH ₂ : 7.068/7.458

Tabelle 22: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen und ³J_(NH/H α)-Kopplungskonstanten des Glycopeptids **11**.

7.3.5 Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten verkürzten V3-Peptids 12

CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHCNISRAKWNDTLK

Entsprechend einer Ansatzgröße von 100 μmol erfolgte die Kupplung der ersten 26 Aminosäuren mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese. Als Aktivator diente TBTU. Es wurden Dreifachkupplungen von jeweils 120 Minuten durchgeführt. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 76 μmol (76 %).

Mit Hilfe des Peptidsynthesizers wurden dann (entsprechend 76 μmol) die folgenden 21 Aminosäuren unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 120 Minuten angeknüpft. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 51 μmol (67 %).

Etwa 1/3 des Ansatzes von 51 μmol (17 μmol) wurde unter Ausschluss von Sauerstoff vom Harz abgespalten, wobei der restliche Ansatz von 34 μmol wie unter 7.3.6 beschrieben weiterverarbeitet wurde. Entsprechend der allgemeinen Zyklisierungsvorschrift wurde das vollständig entschützte, zu zyklisierende Rohprodukt unter Stickstoff in 1.5 L 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (1 μmol Peptid pro 50 mL Lösung bzgl. etwa 30 μmol reaktiver Cysteinseitenketten) unter Zuhilfenahme von Ultraschall zwei Stunden gelöst. Anschließend wurde zur oxidativen Zyklisierung die Lösung durch starkes Rühren und unter Verwendung einer Gasfritte für 48 Stunden mit Luftsauerstoff durchsetzt. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 1000 D) wurde die Lösung entsalzt und eingeeengt und daraufhin gefriergetrocknet.

Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels HPLC an einer präparativen *RP-C₁₈*-Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 60/40 (6 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), $R_t = 33.5$ min bei 38.6 % B, Flussrate 17 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das bereits vorgereinigte Produkt durch HPLC an einer semipräparativen *RP-C₁₈* analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 60/40 (6 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), $R_t = 19.5$ min bei 33.6 % B, Flussrate 5 mL/min).

Ausbeute:

Nach der Aufreinigung wurden 6.0 mg (1.1 μmol) des gewünschten Produktes **12** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 3.4 % bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes.

Charakterisierung:

$\text{C}_{228}\text{H}_{367}\text{N}_{77}\text{O}_{67}\text{S}_2$ MW = 5319.71 g/mol

Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal von $m/z = 5320.90$. ESI-LC-MS lieferte ein Signal des fünffach geladenen unglycosylierten Cyclopeptides **12** bei $m/z = 1065.8$. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung s. Tabelle 23.

Experimenteller Teil

AS	MH (Hz)	α	α' / β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Cys1		4.742	3.099	3.179					
Thr2	8.255 (7.4)	4.295	4.108		1.247				
Arg3	8.571 (7.3)	4.589	1.726	1.853	1.647	1.647	3.185	3.185	ϵ : 7.230
Pro4		4.459	2.254	2.254	2.010	2.010	3.642	3.824	
Asn5	8.510 (8.1)	4.683	2.771	2.840			6.873	7.575	
Asn6	8.176 (7.4)	4.686	2.786	2.869			6.873	7.575	
Asn7	8.168 (8.0)	4.701	2.810	2.889			6.873	7.575	
Thr8	8.071 (7.5)	4.295			1.198				
Arg9	8.323 (6.9)	4.255	1.784	1.839	1.592	1.664	3.182	3.182	ϵ : 7.216
Lys10	8.315 (7.2)	4.266	1.765	1.837	1.383	1.383	1.655	1.655	
Ser11	8.254 (7.3)	4.463	3.808	3.808					
Ile12	8.013 (7.8)	4.107	1.798		1.113	1.318	0.832		γ'' : 0.832
His13	8.596 (7.4)	4.724	3.117	3.191			7.104		ϵ : 8.555
Ile14	8.263 (7.8)	4.218	1.832		1.148	1.382	0.904		γ'' : 0.904
Gly15	8.290 (6.9)	4.099	4.099						
Pro16		4.459	2.254	2.254	2.010	2.010	3.642	3.824	
Gly17	8.478 (5.8)	3.938	3.938						
Arg18	8.083 (6.9)	4.248	1.682	1.781	1.544	1.544	3.124	3.124	ϵ : 7.182
Ala19	8.200 (7.3)	4.227	1.232						
Phe20	8.033 (7.4)	4.550	2.957	3.004			7.103		ϵ : 7.293; ζ : 7.238
Tyr21	8.012 (8.0)	4.630	2.883	3.027			7.069		ϵ : 6.771
Thr22	7.994 (6.9)	4.393	4.227		1.184				
Thr23	8.127 (7.3)	4.281			1.233				
Gly24	8.414 (6.6)	3.914	3.983						
Glu25	8.041 (7.2)	4.320	1.985	2.044	2.396	2.396			
Ile26	8.241 (7.7)	4.126	1.841		1.157	1.476	0.846		γ'' : 0.846
Ile27	8.214 (7.0)	4.218	1.799		1.182	1.472	0.881		γ'' : 0.881
Gly28	8.375 (6.0)	3.925	3.925						
Asp29	8.213 (7.5)	4.686	2.790	2.869					
Ile30	8.098 (6.9)	4.119	1.914		1.215	1.465	0.900		γ'' : 0.900
Arg31	8.336 (6.8)	4.265	1.764	1.825	1.588	1.658	3.177	3.177	ϵ : 7.321
Gln32	8.175 (7.1)	4.237	1.940	2.091	2.347	2.347			ϵ : 6.903; ϵ' : 7.581
Ala33	8.211 (7.5)	4.217	1.299						
His34	8.464 (7.8)	4.705	3.186	3.279			7.158		ϵ : 8.612
Cys35	8.547 (7.1)	4.724	3.074	3.171					
Asn36	8.541 (7.3)	4.683	2.761	2.842			6.873	7.575	
Ile37	7.958 (8.0)	4.178	1.915		1.199	1.463	0.912		γ'' : 0.912
Ser38	8.323 (6.9)	4.454	3.817	3.817					
Arg39	8.424 (6.0)	4.256	1.698	1.845	1.588	1.588	3.123	3.123	ϵ : 7.173
Ala40	8.183		1.327						
Lys41	8.209 (7.7)	4.217	1.698	1.747			1.632	1.632	ϵ/ϵ' : 2.947
Trp42	8.085 (7.9)	4.599	3.259	3.259			7.180		ϵ : 7.469; ζ : 7.134; η : 7.210; ζ' : 7.596
Asn43	8.023 (7.6)	4.545	2.580	2.580			6.873	7.575	
Asp44	8.115 (7.5)	4.570	2.756	2.825					
Thr45	8.029 (6.9)	4.258			1.184				
Leu46	8.042 (7.4)	4.315	1.579	1.652	1.579		0.847	0.911	
Lys47	8.181 (8.4)	4.236	1.749	1.830	1.396	1.452	1.663	1.663	ϵ/ϵ' : 2.973; CONH ₂ : 7.062/7.454

Tabelle 23: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen und ³J_(NH/H α)-Kopplungskonstanten des Peptides 12.

7.3.6 Synthese des nicht glycosylierten zyklisierten V3-Peptides **13**

ESVEINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHCNISRAKWNDTLK

Entsprechend einer Ansatzgröße von 100 μmol erfolgte die Kupplung der ersten 47 Aminosäuren mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese, wie es unter 7.3.5 beschrieben ist, woraufhin eine Belegung von 51 μmol (51 %) am Harz vorlagen.

Nachdem etwa 1/3 des Ansatzes von 51 μmol (17 μmol) wie unter 7.3.5 aufgeführt abgenommen und vom Harz abgespalten wurde, wurde der restliche Ansatz von 34 μmol um weitere sechs Aminosäuren verlängert. Diese wurden mit Hilfe des Peptidsynthesizers unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 120 Minuten angeknüpft. Die nachfolgende Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 23 μmol (68 %).

Das Peptid wurde unter Ausschluss von Sauerstoff vom Harz abgespalten. Entsprechend der allgemeinen Zyklisierungsvorschrift wurde das vollständig geschützte, zu zyklisierende Rohprodukt unter Stickstoff in 3.0 L 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (1 μmol Peptid pro 50 mL Lösung bzgl. etwa 60 μmol reaktiver Cysteinseitenketten) mittels Ultraschall eine Stunde gelöst. Anschließend wurde zur oxidativen Zyklisierung die Lösung durch starkes Rühren und unter Verwendung einer Gasfritte für 48 Stunden mit Luftsauerstoff durchsetzt. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 3000 D) wurde die Lösung entsalzt und eingeengt und daraufhin gefriergetrocknet.

Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels HPLC an einer präparativen *RP-C₁₈*-Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 57/43 (6 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (2 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), $R_t = 30.4$ min bei 34.6 % B, Flussrate 16 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das bereits vorgereinigte Produkt durch HPLC an einer semipräparativen *RP-C₁₈* analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (1 CV) \rightarrow 65/35 (6 CV) \rightarrow 0/100 (0.5 CV) \rightarrow 0/100 (1 CV) \rightarrow 90/10 (1 CV), $R_t = 24.5$ min bei 34.4 % B, Flussrate 5 mL/min).

Ausbeute:

Nach der Aufreinigung wurden 8.4 mg (1.4 μmol) des gewünschten Produktes **13** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 2.1 % bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes.

Charakterisierung:

$\text{C}_{256}\text{H}_{412}\text{N}_{84}\text{O}_{79}\text{S}_2$ MW = 5991.02 g/mol

Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal von $m/z = 5992.31$. ESI-LC-MS lieferte ein Signal des fünffach geladenen unglycosylierten Cyclopeptides **13** bei $m/z = 1200.0$. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung s. Tabelle 24.

Experimenteller Teil

AS	MH (Hz)	α	α' / β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Glu1		4.278	1.940	2.080	2.330	2.330			
Ser2	8.262 (8.1)	4.461	3.806	3.806					
Val3	8.297 (8.5)	4.166	2.046		0.902	0.902			
Glu4	8.419 (6.9)	4.423	1.931	2.029	2.371	2.371			
Ile5	8.117 (8.6)	4.111	1.846		1.218		0.890		γ'' : 0.890
Asn6	8.494 (7.6)	4.798	2.743	2.835			6.906	7.576	
Cys7	8.507 (8.3)	4.678	3.166	3.268					
Thr8	8.220 (8.0)	4.218	4.218		1.236				
Arg9	8.251 (7.1)	4.320	1.730	1.841	1.653	1.653	3.135	3.135	ϵ : 7.151
Pro10		4.417	2.251	2.251	1.920	1.982	3.608	3.802	
Asn11	8.547 (7.9)	4.710	2.757	2.840			6.906	7.576	
Asn12	8.159 (7.0)	4.668	2.738	2.815			6.906	7.576	
Asn13	8.159 (7.9)	4.668	2.738	2.815			6.906	7.576	
Thr14	8.103 (7.7)	4.268	4.268		1.213				
Arg15	8.303 (6.6)	4.266	1.709	1.829	1.606	1.606	3.163	3.163	ϵ : 7.187
Lys16	8.297 (7.2)	4.390	1.679	1.796			1.547	1.547	
Ser17	8.243 (7.2)	4.464	3.800	3.800					
Ile18	8.103 (7.0)	4.118	1.844			1.326	0.886		γ'' : 0.886
His19	8.567 (8.0)	4.730	3.107	3.201			7.227		ϵ : 8.555
Ile20	8.230 (8.3)	4.216	1.834		1.176	1.359	0.883		γ'' : 0.883
Gly21	8.263 (6.0)	4.087	4.087						
Pro22		4.434	2.233	2.233	1.945	2.003	3.608	3.802	
Gly23	8.470 (5.6)	3.935	3.935						
Arg24	8.072 (7.2)	4.249	1.679	1.779	1.545	1.545	3.128	3.128	ϵ : 7.105
Ala25	8.181 (7.9)	4.237	1.225						
Phe26	8.022 (7.5)	4.558	2.940	3.004			7.102		ϵ : 7.270; ζ : 7.241
Tyr27	8.012 (8.4)	4.627	2.883	3.031			7.045		ϵ : 6.773
Thr28	8.024 (7.0)	4.395	4.197		1.171				
Thr29	8.113 (7.9)	4.289	4.289		1.220				
Gly30	8.396 (6.7)	3.923	3.995						
Glu31	8.074 (7.0)	4.322	1.969	2.041	2.371	2.371			
Ile32	8.210 (7.7)	4.133	1.833		1.155	1.457	0.843		γ'' : 0.843
Ile33	8.192 (6.4)	4.116	1.811		1.144	1.425	0.876		γ'' : 0.876
Gly34	8.354 (6.0)	3.935	3.935						
Asp35	8.197 (8.0)	4.673	2.749	2.837					
Ile36	8.086 (7.0)	4.129	1.881		1.199		0.883		γ'' : 0.883
Arg37	8.326 (6.5)	4.256	1.772	1.835	1.597	1.640	3.177	3.177	ϵ : 7.265
Gln38	8.193 (7.1)	4.302	1.930	2.092	2.332	2.332			ϵ : 6.899; ϵ' : 7.539
Ala39	8.217 (7.4)	4.220	1.353						
His40	8.422 (7.6)	4.656	3.191	3.275			7.201		ϵ : 8.568
Cys41	8.540 (7.6)	4.713	3.073	3.173					
Asn42	8.570 (7.0)	4.728	2.757	2.832			6.906	7.576	
Ile43	7.947 (8.5)	4.183	1.899		1.201		0.903		γ'' : 0.903
Ser44	8.314 (6.6)	4.415	3.864	3.864					
Arg45	8.349 (6.9)	4.255	1.696	1.835	1.584	1.584	3.118	3.118	ϵ : 7.119
Ala46	8.158 (8.6)	4.215	1.276						
Lys47	8.151 (8.0)	4.315	1.676	1.738			1.633	1.633	ϵ/ϵ' : 2.946
Trp48	8.037 (8.3)	4.668	3.256	3.260			7.202		ϵ : 7.467; ζ : 7.124; η : 7.207; ζ' : 7.591
Asn49	8.069 (8.5)	4.560	2.606	2.606			6.906	7.576	
Asp50	8.139 (8.4)	4.579	2.721	2.783					
Thr51	8.050 (6.9)	4.246			1.184				
Leu52	8.047 (7.1)	4.312	1.579	1.648	1.579		0.833	0.898	
Lys53	8.127 (7.0)	4.245	1.740	1.829	1.389	1.434	1.657	1.657	ϵ/ϵ' : 2.969; CONH ₂ : 7.066/7.454

Tabelle 24: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen und ³J_(NH/H α)-Kopplungskonstanten des Peptides **13**.

7.3.7 Synthese des diglycosylierten zyklisierten V3-Peptides 14

ESVEINCTRPNN(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)NTRKSIHIGPGRAF YTTGEIIGDIRQAHCNISRAKWN(β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc)DTLK

Entsprechend einer Ansatzgröße von 87 μ mol erfolgte die Kupplung der ersten vier Aminosäuren mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese. Als Aktivator diente TBTU. Es wurden Dreifachkupplungen von jeweils 120 Minuten durchgeführt. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 87 μ mol (100 %).

Für den Einbau des Glycosylbausteins **6** in die Peptidkette wurden in manuell durchgeführten Zweifachkupplungen mit einer Kupplungszeit von jeweils 24 Stunden je 1.0 eq (84.5 mg; 87 μ mol) von **6**, 1.5 eq (42.1 mg; 131 μ mol) TBTU und 1.5 eq (22 μ L; 131 μ mol) DIPEA eingesetzt. Die anschließende Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab mit 72 μ mol eine Glycosylierungsausbeute von 83 %.

Mit Hilfe des Peptidsynthesizers wurden dann (entsprechend 72 μ mol) die folgenden sieben Aminosäuren unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 120 Minuten angeknüpft. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 72 μ mol (100 %).

Wiederum mittels Peptidsynthesizer wurden daraufhin (entsprechend 72 μ mol) weitere 29 Aminosäuren unter TBTU Aktivierung mittels Dreifachkupplung zu jeweils 90 Minuten angeknüpft. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 33 μ mol (46 %).

Für den Einbau des zweiten Glycosylbausteins in die Peptidkette wurden in manuell durchgeführten Dreifachkupplungen mit einer Kupplungszeit von jeweils 24 Stunden je 1.5 eq (48.5 mg; 50 μ mol) von **6**, 2.2 eq (23.2 mg; 73 μ mol) TBTU und 2.2 eq (13 μ L; 73 μ mol) DIPEA eingesetzt. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe ergab mit 28 μ mol eine Glycosylierungsausbeute von 85 %.

Die Anknüpfung der restlichen 11 Aminosäuren erfolgte (entsprechend 28 μ mol) manuell jeweils mittels Dreifachkupplung zu je drei Stunden. Es wurden dabei 4.0 eq (112 μ mol) der entsprechenden Aminosäure, 5.0 eq (140 μ mol) TBTU und 5.0 eq (140 μ mol) DIPEA eingesetzt. Die Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe ergab eine Kupplungsausbeute von 28 μ mol (100 %).

Das an der Festphase befindliche Glycopeptid wurde mit Hydrazinhydrat/abs. Methanol 1:5 deacetyliert und unter Ausschluss von Sauerstoff vom Harz abgespalten. Entsprechend der allgemeinen Zyklisierungsvorschrift wurde das vollständig entschützte, zu zyklisierende Rohprodukt unter Stickstoff in 3.6 L 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (1 μ mol Peptid pro 50 mL Lösung bzgl. etwa 72 μ mol reaktiver Cysteinseitenketten) mittels Ultraschall eine Stunde gelöst. Anschließend wurde zur oxidativen Zyklisierung die Lösung durch starkes Rühren und unter Verwendung einer Glasfritte für 67 Stunden mit

Experimenteller Teil

Luftsauerstoff durchsetzt. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 3000 D) wurde die Lösung entsalzt und eingengt und daraufhin gefriergetrocknet.

Das Rohprodukt wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt mittels HPLC an einer präparativen *RP-C₁₈*-Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (1 CV) → 60/40 (5 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), $R_t = 23.5$ min bei 36.8 % B, Flussrate 20 mL/min). In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das bereits vorgereinigte Produkt über eine *Superdex Peptide HR 10/30* Säule isokratisch mittels Wasser + 20 % Acetonitril + 0.1 % TFA eluiert (Flussrate 0.5 mL/min, $R_t = 25$ min). Abschließend wurde durch HPLC an einer semipräparativen *RP-C₁₈* analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (1 CV) → 82.5/17.5 (0.2 CV) → 70/30 (6 CV) → 0/100 (0.5 CV) → 0/100 (1 CV) → 90/10 (1 CV), $R_t = 25.5$ min bei 28.6 % B, Flussrate 5 mL/min).

Ausbeute:

Nach der Aufreinigung wurden 4.6 mg (0.7 μ mol) des gewünschten Produktes **14** erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 0.8 % bezogen auf die Belegung des eingesetzten Harzes.

Charakterisierung:

$C_{288}H_{464}N_{88}O_{99}S_2$ MW = 6803.34 g/mol

Die Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS lieferte ein $[M+H]^+$ -Signal des zyklisierten Glycopeptides **14** von $m/z = 6804.51$. Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung s. Tabelle 25 und Tabelle 26.

an Asn12	NH1 (Hz)	NH2 (Hz)	1	2	3	4	5	6a/6b	Ac
GlcNAc	8.603 (8.9)	8.179 (9.1)	5.021	3.832	3.740	3.624	3.538	3.786/ 3.567	2.009
GlcNAc'		8.353 (9.6)	4.566	3.739	3.559	3.470	3.486	3.878/ 3.706	2.063

an Asn49	NH1 (Hz)	NH2 (Hz)	1	2	3	4	5	6a/6b	Ac
GlcNAc	8.506 (9.0)	8.157 (9.0)	4.979	3.809	3.729	3.625	3.505	3.802/ 3.580	1.996
GlcNAc'		8.353 (9.6)	4.566	3.739	3.559	3.470	3.486	3.878/ 3.706	2.063

Tabelle 25: 1H -NMR-chemische Verschiebungen und $^3J_{(NH/H\alpha)}$ -Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen des Glycopeptids **14**.

Experimenteller Teil

AS	MH (Hz)	α	α' / β	β'	γ	γ'	δ	δ'	andere Protonen
Glu1		4.279	1.927	2.061	2.323	2.323			
Ser2	8.277 (7.6)	4.455	3.809	3.809					
Val3	8.310 (7.6)	4.166	2.041		0.905	0.905			
Glu4	8.420 (7.2)	4.428	1.942	2.051	2.419	2.419			
Ile5	8.134 (7.9)	4.294	1.856		1.221	1.462	0.886		γ'' : 0.886
Asn6	8.518 (7.0)	4.713	2.728	2.822			6.903	7.581	
Cys7	8.503 (7.8)	4.673	3.164	3.270					
Thr8	8.235 (8.4)	4.211	4.211		1.239				
Arg9	8.262 (7.4)	4.319	1.729	1.838	1.658	1.658	3.123	3.123	ϵ : 7.150
Pro10		4.421	2.252	2.252	1.934	1.995	3.609	3.790	
Asn11	8.504 (8.4)	4.669	2.756	2.842			6.903	7.581	
Asn12	8.238 (7.9)	4.665	2.793	2.876			8.603		
Asn13	8.240 (8.2)	4.695	2.796	2.879			6.903	7.581	
Thr14	8.088 (7.4)	4.256	4.182		1.187				
Arg15	8.320 (6.5)	4.266	1.780	1.842	1.598	1.659	3.169	3.169	ϵ : 7.183
Lys16	8.309 (7.0)	4.382	1.745	1.827	1.383	1.383	1.658	1.658	
Ser17	8.250 (7.6)	4.468	3.804	3.804					
Ile18	8.088 (7.8)	4.112	1.798			1.336	0.832		γ'' : 0.832
His19	8.587 (8.4)	4.723	3.109	3.195			7.222		ϵ : 8.557
Ile20	8.232 (7.9)	4.210	1.812		1.157	1.429	0.891		γ'' : 0.891
Gly21	8.271 (6.9)	4.083	4.083						
Pro22		4.438	2.234	2.234	1.934	1.995	3.609	3.790	
Gly23	8.470 (6.1)	3.935	3.935						
Arg24	8.107 (7.9)	4.259	1.680	1.778	1.549	1.549	3.130	3.130	ϵ : 7.106
Ala25	8.188 (6.7)	4.239	1.225						
Phe26	8.050 (7.5)	4.523	2.945	3.002			7.095		ϵ : 7.277; ζ : 7.241
Tyr27	8.012 (8.9)	4.627	2.883	3.028			7.044		ϵ : 6.780
Thr28	8.013 (7.7)	4.391	4.214		1.170				
Thr29	8.112 (8.8)	4.283	4.283		1.221				
Gly30	8.398 (6.7)	3.919	3.968						
Glu31	8.074 (6.1)	4.324	1.974	2.043	2.391	2.391			
Ile32	8.229 (7.9)	4.130	1.837		1.170	1.459	0.843		γ'' : 0.843
Ile33	8.204 (7.2)	4.119	1.796		1.162	1.461	0.875		γ'' : 0.875
Gly34	8.377 (6.2)	3.929	3.929						
Asp35	8.198 (7.0)	4.683	2.784	2.861					
Ile36	8.071 (7.9)	4.126	1.887		1.204	1.450	0.887		γ'' : 0.887
Arg37	8.330 (6.9)	4.292	1.759	1.832	1.587	1.642	3.176	3.176	ϵ : 7.263
Gln38	8.232 (7.6)	4.284	1.949	2.078	2.342	2.342			ϵ : 6.868; ϵ' : 7.579
Ala39	8.192 (7.8)	4.225	1.289						
His40	8.440 (7.9)	4.647	3.194	3.269			7.205		ϵ : 8.571
Cys41	8.549 (8.4)	4.718	3.072	3.175					
Asn42	8.567 (7.0)	4.718	2.759	2.840			6.903	7.581	
Ile43	7.962 (8.2)	4.178	1.899		1.189	1.453	0.905		γ'' : 0.905
Ser44	8.325 (7.3)	4.413	3.845	3.881					
Arg45	8.372 (6.9)	4.262	1.691	1.832	1.578	1.578	3.120	3.120	ϵ : 7.123
Ala46	8.128 (7.7)	4.219	1.294						
Lys47	8.189 (8.4)	4.236	1.671	1.750	1.373	1.373	1.628	1.628	ϵ/ϵ' : 2.945
Trp48	7.964 (7.2)	4.592	3.252	3.252			7.165		ϵ : 7.450; ζ : 7.120; η : 7.193; ζ' : 7.570
Asn49	8.123 (7.0)	4.571	2.501	2.586			8.506		
Asp50	8.073 (8.0)	4.583	2.724	2.806					
Thr51	8.054 (7.3)	4.250	4.186		1.181				
Leu52	8.087 (7.4)	4.317	1.577	1.645	1.577		0.838	0.896	
Lys53	8.164 (7.2)	4.246	1.738	1.824	1.392	1.438	1.656	1.656	ϵ/ϵ' : 2.970; CONH ₂ : 7.072/7.491

Tabelle 26: ¹H-NMR-chemische Verschiebungen und ³J_(NH/H α)-Kopplungskonstanten des Glycopeptids 14.

7.4 SPR-Experimente

7.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zu SPR-Messungen

Die SPR-Bindungsstudien wurden an einem *Biacore J* Gerät der Firma *BIACORE AB* durchgeführt. Es wurden *Pioneer F1*-Sensorchips mit carboxymethylierter Dextran-Matrix der Firma *BIACORE AB* eingesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit den Programmen *BIAevaluation* (Version 3.0.2) und *BIACORE Control* Software (Version 3.0).

Anzucht von Zellen

Die Zellkultur aus *Osteosarkoma HI5*- bzw. Parentalzellen wird zweimal pro Woche abgeerntet, da in dieser Zeit das Kulturmedium verbraucht wird. Ein Teil dieser Zellen wird dazu verwendet eine frische Zellkultur anzusetzen, der restliche Teil verbleibt zum Einfrieren von Aliquots.

Dazu wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen des Puffers werden die adhärent wachsenden Zellen durch Inkubation für fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank mit 4 mL Trypsinlösung von der Oberfläche der Kulturgefäße abgelöst. Es wird mit 8 mL Kulturmedium (94 % *RPMI 1640*, 5 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) verdünnt und für fünf Minuten zentrifugiert (1000 rpm). Der Überstand wird abpipettiert und das *Pellet* wird in 10 mL frischem Kulturmedium resuspendiert. Davon werden 2 mL Zellsuspension entnommen, in einer neuen Kulturschale mit 15 mL Kulturmedium ausgesät und bis zur nächsten Ernte bei 37 °C kultiviert. Von der restlichen Zellsuspension wird durch Auszählen in der *Neubauer* Zählkammer unter dem Mikroskop die Zellzahl bestimmt, woraufhin die Zellsuspension zentrifugiert (5 min/1000 rpm) und der Überstand abpipettiert wird. Das *Pellet* wird dann in einer entsprechenden Menge Einfriermedium (70 % *RPMI 1640*, 10 % DMSO, 20 % FKS) resuspendiert, so dass eine Konzentration von $6 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter erreicht wird. Es werden aus der Zellsuspension Aliquots von je 1 mL erstellt und diese bei -80 °C eingefroren.

Aufgrund von Resistenzfaktoren gegen die verwendeten Antibiotika werden alle vier Wochen die *HI5*-Zellen mit Puromycin und die Parentalzellen mit Neomycin selektiert. Dazu wird das Antibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 1 µg/mL Kulturmedium zu einer gerade gesplitteten *HI5*-Zellkultur gegeben, bzw. 50 µg/mL Neomycin zu einer Kultur von Parentalzellen.

Präparation der Zellen für *Biacore*-Messungen

Die aufgetauten Zellen eines Aliquots werden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3 min/1000 rpm), der Überstand abpipettiert und zur Regeneration für fünf Minuten mit 1 mL Kulturmedium bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird bei 10 °C abzentrifugiert, dreimal mit 1 mL PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4) gewaschen und in 1 mL entgastem PBS-

Puffer aufgenommen. Die Anzahl vitaler Zellen wird an einer 10 μL Probe durch Zugabe von 10 μL Tryphanblau in einer *Neubauer* Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Um sinnvolle Ergebnisse zu erhalten, sollte die Anzahl vitaler Zellen mindestens 90 % der Gesamtzellzahl betragen. Anschließend wird durch Verdünnung mit entgastem PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4) eine Konzentrationsreihe von 36, 360, 900, 1800 und 3600 Zellen pro μL erstellt.

Immobilisierung der *F1*-Sensorchips

Die Immobilisierung erfolgt bei 25 °C. Als Laufpuffer dient steril filtrierter und entgaster PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4).

Es werden Stammlösungen der zu immobilisierenden Verbindungen in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Acetatpuffer (10 mM, pH 5.5) hergestellt. Da das *Biacore J* nur zwei der vorhandenen vier Flusszellen des Sensorchips nutzen kann, dient Flusszelle 1 als Referenzzelle, die somit nur aktiviert und *gecappt* wird und Flusszelle 4 wird als Messzelle verwendet. Die Aktivierung der Chipoberfläche erfolgt mittels einer frisch hergestellten Lösung aus 0.05 M NHS und 0.2 M EDC 1:1 für 10 Minuten bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Im Anschluss daran wird die zu vermessene V3-Verbindung an die aktivierte Dextran-Matrix der Messzelle 4 gekuppelt, indem bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ über einen Zeitraum von 10 bis 30 Minuten mittels oben erwähnter Stammlösungen immobilisiert wird. Die Chipbelegung wird dabei über die Kupplungszeit bzw. über die Erhöhung der RU-Werte kontrolliert. Verbliebene aktivierte Carboxymethylgruppen der Chipoberfläche werden dann bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ für 10 Minuten mit 1 M Ethanolaminlösung (pH 8.5) *gecappt*.

Durchführung der SPR-Messungen

Die SPR-Messungen erfolgen bei 25 °C. Als Laufpuffer dient steril filtrierter und entgaster PBS-Puffer (150 mM, pH 7.4).

Es wird jeweils eine Konzentrationsreihe von 36, 360, 900, 1800 und 3600 *H15-Osteosarkomazellen* bzw. für die Negativkontrolle entsprechend Parentalzellen pro μL in PBS-Puffer vermessen. Die Messungen werden mit den niedrigsten Konzentrationen begonnen, um die Fehler der Konzentrationsunterschiede zwischen dem reinen Puffer und dem Analytenpuffer zu minimieren, um auf diese Weise die Bulkeffekte gering zu halten. Die frisch suspendierten Zelllösungen werden bei einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ über zehn Minuten injiziert. Nach der Assoziationsphase folgt eine Dissoziationszeit von zwei Minuten bei 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgt bei einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ mittels einminütigem Regenerationspulses mit 1.70 mM SDS-Lösung in PBS-Puffer.

7.4.2 SPR-Bindungsstudien

Für die Untersuchung der spezifischen Interaktion zwischen V3-Verbindungen und dem HIV CCR5-Korezeptor wurden *HI5-Osteosarkomazellen* verwendet, die an ihrer Oberfläche CCR5 überexprimieren, wobei die Rezeptordichte pro Zelle bei 10^4 - 10^6 liegt.¹⁷⁷ Die V3-Verbindungen wurden auf der Chipoberfläche immobilisiert und als vorüber fließender Bindungspartner wurden im Laufmittel suspendierte *HI5-Zellen* verwendet, bzw. für die Negativkontrolle Parentalzellen ohne den Rezeptor auf der Oberfläche. Die Präparation der Zellen, Immobilisierung der F1-Sensorchips mit den zu untersuchenden V3-Verbindungen und die Durchführung der SPR-Messungen anhand von Konzentrationsreihen erfolgte gemäß den unter 7.4.1 beschriebenen allgemeinen Arbeitsvorschriften. Die Anzahl vitaler Zellen der verwendeten Aliquots lag zwischen 90 % und 95 % bezogen auf die Gesamtzellzahl.

8 Sicherheitshinweise

Substanzname	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
α -Cyano-4-hydroxizimtsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	
CDCl ₃	Xn	20/22-38-40-48	36/37
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
2,5-Dihydroxybenzoesäure			24/25
Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Ethanol	F	11	7-16
Ethanolamin	Xn	20-36/37/38	
HATU	Xi	36/37/38	26-36
Hydrazin	T, N	45-E23/24/25-34-43-50/53	53-26-36/37/39-45-60-61
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Natrium	F, C	14/15-34	5.3-8-43.7-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriummethanolat	C, F	11-14-34-36/37/38	26-36
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Schwefelsäure	C	35	26-30-45
TBTU	Xi	36/37/38	26-36
Toluol	Xn	11-20-47	16-25-29-33
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

Tabelle 27: Sicherheitshinweise.

9 Literatur

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, 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**; 220:868-71.
2. Nowak MA, McMichael AJ. Die Zerstörung des Immunsystems durch HIV. *Spektrum d. Wiss.* **1995**;2:52-64.
3. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **1996**;381:661-6.
4. UNAIDS. AIDS Epidemic Update. **2003**.
5. UNAIDS. Report on the global HIV/AIDS epidemic. **2003**.
6. Blair WS, Lin PF, Meanwell NA, Wallace OB. HIV-1 entry - an expanding portal for drug discovery. *Drug Discov Today* **2000**; 5:183-194.
7. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **1984**;224:500-3.
8. Kulpa D, Topping R, Telesnitsky A. Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *EMBO J* **1997**;16:856-65.
9. Johnson WE, Desrosiers RC. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* **2002**;53:499-518.
10. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **2000**;288:1789-96.
11. Masciotra S, Yang C, Pieniazek D, Thomas C, Owen SM, McClure HM, Lal RB. Detection of simian immunodeficiency virus in diverse species and of human immunodeficiency virus Type 2 by using consensus primers within the pol region. *J Clin Microbiol* **2002**;40:3167-71.
12. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**;100:6588-92.
13. Casseb J, Katzenstein D, Winters M, Brigido LF, Duarte AJ, Hendry RM. Serotyping HIV-1 with V3 peptides: detection of high avidity antibodies presenting clade-specific reactivity. *Braz J Med Biol Res* **2002**;35:369-75.
14. Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, 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**;4:1032-7.
15. Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, Vanderborght B, van der Groen G, van Heuverswijn H, Saman E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* **1994**;68:1586-96.
16. Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1994**;10:561-7.

17. Moore JP, Parren PW, Burton DR. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol* **2001**;75:5721-9.
18. Nkengasong JN, Kalou M, Maurice C, Bile C, Borget MY, Koblavi S, Boateng E, Sassan-Morokro M, Anatole-Ehounou E, Ghys P, Greenberg AE, Wiktor SZ. Comparison of NucliSens and Amplicor monitor assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in plasma of persons with HIV-1 subtype A infection in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Clin Microbiol* **1998**;36:2495-8.
19. Zwart G, Wolfs TF, Bookelman R, Hartman S, Bakker M, Boucher CA, Kuiken C, Goudsmit J. Greater diversity of the HIV-1 V3 neutralization domain in Tanzania compared with The Netherlands: serological and genetic analysis. *AIDS* **1993**;7:467-74.
20. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **1999**;285:1-32.
21. Franzusoff A, Volpe AM, Josse D, Pichuantes S, Wolf JR. Biochemical and genetic definition of the cellular protease required for HIV-1 gp160 processing. *J Biol Chem* **1995**;270:3154-9.
22. Dewhurst S, Whetter L. Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci* **1997**;2:147-59.
23. Cohen J. AIDS vaccine shows promise after years of frustration. *Science* **2001**; 291:1686-8.
24. Letvin NL. Progress in the development of an HIV-1 vaccine. *Science* **1998**; 280:1875-80.
25. Henderson LE, Arthur LO. Defeating AIDS: What will it take? *Sci. Am.* **1998**;279:61.
26. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**;53:55-67.
27. 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**;65:2119-23.
28. Perrin C, Fenouillet E, Jones IM. Role of gp41 glycosylation sites in the biological activity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Virology* **1998**;242:338-45.
29. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **1998**;393:648-59.
30. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science* **1998**;280:1884-8.
31. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. A new classification for HIV-1. *Nature* **1998**;391:240.
32. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **1984**;312:763-7.
33. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **1984**;312:767-8.
34. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **1986**;47:333-48.
35. Brady RL, Barclay AN. The structure of CD4. *Curr Top Microbiol Immunol* **1996**;205:1-18.
36. Robey E, Axel R. CD4: collaborator in immune recognition and HIV infection. *Cell* **1990**;60:697-700.

37. Sattentau QJ, Clapham PR, Weiss RA, Beverley PC, Montagnier L, Alhalabi MF, Gluckmann JC, Klatzmann D. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS* **1988**;2:101-5.
38. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **1996**;272:872-7.
39. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2002**;42:469-99.
40. Nara PL, Garrity RR, Goudsmit J. Neutralization of HIV-1: a paradox of humoral proportions. *FASEB J* **1991**;5:2437-55.
41. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **1998**;393:705-11.
42. Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* **2000**;74:1961-72.
43. Wülfken J. Entwicklung CD4 bindender Peptide als Inhibitoren der HIV-Infektion. Dissertation. Universität Hamburg. **2001**.
44. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **1996**;384:184-7.
45. Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE Jr, Peden K, Kabat D. CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **1997**;71:873-82.
46. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **1996**;85:1135-48.
47. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **1998**;280:1949-53.
48. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **1996**;384:179-83.
49. Sattentau QJ, Moore JP, 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**;67:7383-93.
50. Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **1990**;250:1139-42.
51. Hart TK, Kirsh R, Ellens H, Sweet RW, Lambert DM, Petteway SR Jr, Leary J, Bugelski PJ. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88:2189-93.
52. Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* **1997**;235:179-90.
53. Bartlett JG, Moore RD. Improving HIV therapy. *Sci Am* **1998**;279:84-7, 89.

54. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **1995**;373:117-22.
55. Janeway CA, Travers P. Immunologie. 2. Aufl. Spektrum Akad. Verlag. Heidelberg. Berlin. Oxford. **1997**.
56. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **1999**;17:657-700.
57. Horuk R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today* **1999**;20:89-94.
58. McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* **1997**;3:261-71.
59. Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* **1996**;70:6288-95.
60. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **1996**;272:1955-8.
61. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol* **1997**;9:551-62.
62. Dimitrov DS, Xiao X, Chabot DJ, Broder CC. HIV coreceptors. *J Membr Biol* **1998**;166:75-90.
63. Rucker J, Edinger AL, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson JF, Yi Y, Margulies B, Collman RG, Doranz BJ, Parmentier M, Doms RW. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **1997**;71:8999-9007.
64. Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, Cayabyab M, Berman M, Dorf ME, 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**;72:6113-8.
65. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* **1988**;240:80-2.
66. Connor RI, Ho DD. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* **1994**;68:4400-8.
67. Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyo EM, Lusso P. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* **1997**;3:1259-65.
68. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* **1989**;63:2118-25.
69. Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyo EM. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **1997**;71:7478-87.
70. Polzer S, Dittmar MT, 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**;304:70-80.

71. Bieniasz PD, Cullen BR. Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection. *Front Biosci* **1998**;3:44-58.
72. Littman DR. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* **1998**;93:677-80.
73. Paterlini MG. Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity. *Biophys J* **2002**;83:3012-31.
74. Cormier EG, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* **2002**;76:8953-7.
75. Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* **1999**;96:667-76.
76. Lasky LA, Groopman JE, Fennie CW, Benz PM, Capon DJ, Dowbenko DJ, Nakamura GR, Nunes WM, Renz ME, Berman PW. Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* **1986**; 233:209-12.
77. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 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**;265:10373-82.
78. Moore JP, Sattentau QJ, Wyatt R, Sodroski J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* **1994**;68:469-84.
79. Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, 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**;61:570-8.
80. Moore JP, Sodroski J. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol* **1996**;70:1863-72.
81. Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **1993**;218:1-27.
82. Voet D, Voet JG. Biochemie. VCH Weinheim. **1992**.
83. Gottschalk A. Glycoproteins. Vol. 1 & 2. Elsevier Amsterdam. **1972**.
84. Sharon N, Lis H. *Spektrum d. Wiss.* **1993**;3:66-74.
85. Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* **1992**;61:307-30.
86. Fenouillet E, Gluckman JC, Jones IM. Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem Sci* **1994**;19:65-70.
87. Gruters RA, Neefjes JJ, Tersmette M, de Goede RE, Tulp A, Huisman HG, Miedema F, Ploegh HL. Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. *Nature* **1987**;330:74-7.
88. Dirckx L, Lindemann D, Ette R, Manzoni C, Moritz D, Mous J. Mutation of conserved N-glycosylation sites around the CD4-binding site of human immunodeficiency virus type 1 GP120 affects viral infectivity. *Virus Res* **1990**;18:9-20.
89. Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* **1993**;67:584-8.

90. Papandreou MJ, Fenouillet E. Effect of changes in the glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope on the immunoreactivity and sensitivity to thrombin of its third variable domain. *Virology* **1998**;241:163-7.
91. Ezekowitz RA, Kuhlman M, Groopman JE, Byrn RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* **1989**;169:185-96.
92. Fenouillet E, Clerget-Raslain B, Gluckman JC, Guetard D, Montagnier L, Bahraoui E. Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis. *J Exp Med* **1989**;169:807-22.
93. Lee WR, Syu WJ, Du B, Matsuda M, Tan S, Wolf A, Essex M, Lee TH. Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**;89:2213-7.
94. Hemming A, Gram GJ, Bolmstedt A, Losman B, Hansen JE, Ricksten A, Olofsson S. Conserved N-linked oligosaccharides of the C-terminal portion of human immunodeficiency virus type 1 gp120 and viral susceptibility to neutralizing antibodies. *Arch Virol* **1996**;141:2139-51.
95. Schönning K, Jansson S, Olofson S, Stig Hansen JE. *Virology* **1996**;218:134-140.
96. Reitter JN, Desrosiers RC. Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein. *J Virol* **1998**;72:5399-407.
97. Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Muller H, Krausslich HG, 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**;11:11-9.
98. Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. 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**;276:13433-41.
99. Ogert RA, Lee MK, Ross W, Buckler-White A, Martin MA, Cho MW. 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**;75:5998-6006.
100. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **2003**;422:307-12.
101. Moore JP, Nara PL. The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *AIDS* **1991**;5 Suppl 2:21-33.
102. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res* **2003**;31:23-7.
103. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Pavlakis GN. a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. *Human Retroviruses and AIDS* **1992**;Los Alamos National Laboratory. Los Alamos. N.Mex.
104. Javaherian K, Langlois AJ, LaRosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, Herlihy WC, Putney SD, Matthews TJ. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* **1990**;250:1590-3.
105. Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Hayek Y, Matsushita S, Anglister J. NMR structure of an anti-gp120 antibody complex with a V3 peptide reveals a surface important for co-receptor binding. *Structure Fold Des* **2000**;8:385-95.
106. Meyer S. persönliche Mitteilung. Universität Hamburg . **2002**.

107. Dojahn J. Kombinatorische Synthese und Untersuchung von V3-Peptid- und Glycopeptidbibliotheken als potentielle HIV Impfstoffe. **2002**;Dissertation. Universität Hamburg.
108. Moulard M, Lortat-Jacob H, Mondor I, Roca G, Wyatt R, Sodroski J, Zhao L, Olson W, Kwong PD, Sattentau QJ. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **2000**;74:1948-60.
109. Chiou SH, Freed EO, Panganiban AT, Kenealy WR. Studies on the role of the V3 loop in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1992**; 8:1611-8.
110. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* **1996**; 2:1244-7.
111. Cheng-Mayer C, Quiroga M, Tung JW, Dina D, Levy JA. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol* **1990**;64:4390-8.
112. Yonezawa A, Hori T, Takaori-Kondo A, Morita R, Uchiyama T. Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **2001**;75:4258-67.
113. Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, Chesebro B, Goldsmith MA. 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**;71:7136-9.
114. Wang WK, Dudek T, Zhao YJ, Brumblay HG, Essex M, Lee TH. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**;95:5740-5.
115. Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T. T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* **1998**;72:9763-70.
116. Farber JM, Berger EA. HIV's response to a CCR5 inhibitor: I'd rather tighten than switch! *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**;99:1749-51.
117. Mitsuyasu R. Immune therapy: non-highly active antiretroviral therapy management of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* **2002**;185 Suppl 2:115-22.
118. Condra JH, Miller MD, Hazuda DJ, Emini EA. Potential new therapies for the treatment of HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **2002**;53:541-55.
119. Deutsche AIDS-Hilfe e.V. FaxReport zu HIV und AIDS. **2000**.
120. Albrecht MA, Wilkin TJ, Coakley EP, Hammer SM. Advances in antiretroviral therapy. *Top HIV Med* **2003**;11:97-127.
121. Trimeris Inc. Information on *Fuzeon*. <http://www.trimeris.com/pipeline/t-20.html>. **2002**.
122. Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**;91:9770-4.
123. Root MJ, Kay MS, Kim PS. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science* **2001**;291:884-8.
124. Daar ES, Li XL, Moudgil T, Ho DD. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**; 87:6574-8.

125. Gauduin MC, Allaway GP, Olson WC, Weir R, Maddon PJ, Koup RA. CD4-immunoglobulin G2 protects Hu-PBL-SCID mice against challenge by primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **1998**;72:3475-8.
126. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, 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**;270:1811-5.
127. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **1998**;393:595-9.
128. Murakami T, Zhang TY, Koyanagi Y, Tanaka Y, Kim J, Suzuki Y, Minoguchi S, Tamamura H, Waki M, Matsumoto A, Fujii N, Shida H, Hoxie JA, Peiper SC, Yamamoto N. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **1999**;73:7489-96.
129. Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G, De Clercq E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* **1997**;186:1383-8.
130. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* **1998**;4:72-7.
131. Whatmore AM, Cook N, Hall GA, Sharpe S, Rud EW, Cranage MP. Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J Virol* **1995**;69:5117-23.
132. Letvin NL, Barouch DH, Montefiori DC. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* **2002**;20:73-99.
133. Ferrari G, Humphrey W, McElrath MJ, Excler JL, Duliege AM, Clements ML, Corey LC, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**;94:1396-401.
134. Merrifield RB. Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* **1962**;21:412.
135. Carpino LA, Han GY. The 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group. *J Org Chem* **1972**;37:3404-3409.
136. Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc* **1993**;115:4397-4398.
137. Reid GE, Simpson RJ. 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**;200:301-9.
138. Pearson DA, Blanchette M, Baker ML, Guindon CA. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* **1989**;30:2739-2742.
139. Dwek RA. Glycobiology: "towards understanding the function of sugars". *Biochem Soc Trans* **1995**;23:1-25.
140. Vetter D, Tumeltyl D, Singh SK, Gallop MA. *Angew Chem* **1995**;107:94-97.
141. Guo ZW, 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**;5:1917-24.
142. Ende F. Untersuchung zur konvergenten Synthese von festphasengebundenen N-Typ Glycopeptiden durch Seitenkettenglycosylierung. **2001**. Dissertation. Universität Hamburg.

143. Claasen B. Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus dem TSE verursachenden Prion Protein. **2001**. Diplomarbeit. Universität Hamburg.
144. Bodanszky M, Kwei JZ. 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**;12:69-74.
145. Annis I, Hargittai B, Barany G. Disulfide bond formation in peptides. *Methods Enzymol* **1997**;289:198-221.
146. Kiso Y, Fujiwara Y, Kimura T, Nishitani A, Akaji K. Efficient solid phase peptide synthesis. Use of methanesulfonic acid alpha-amino deprotecting procedure and new coupling reagent, 2-(benzotriazol-1-yl)oxy-1,3-dimethylimidazolidinium hexafluorophosphate (BOI). *Int J Pept Protein Res* **1992**;40:308-14.
147. Akaji K, Fujino K, Tatsumi T, Kiso Y. *Tetrahedron Lett* **1992**;33:1073-1076.
148. Kellenberger C, Hietter H, Luu B. Regioselective formation of the three disulfide bonds of a 35-residue insect peptide. *Pept Res* **1995**;8:321-7.
149. Cleland WW. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **1964**;35:480-2.
150. Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P. Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* **1994**;23:249-61.
151. Knochenmuss R, Zenobi R. MALDI ionization: the role of in-plume processes. *Chem Rev* **2003**;103:441-52.
152. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* **2003**;2:140-50.
153. Dubois F, Knochenmuss R, Zenobi R. Optimization of an ion-to-photon detector for large molecules in mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**;13:1958-1967.
154. Wüthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York. John Wiley & Sons. **1986**.
155. Fesik SW. NMR studies of molecular complexes as a tool in drug design. *J Med Chem* **1991**;34:2937-45.
156. Karplus M. Molecular dynamics of biological macromolecules: a brief history and perspective. *Biopolymers* **2003**;68:350-8.
157. Braunschweiler L, Ernst RR. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J Magn Reson* **1983**;53:521-528.
158. Rance M, Sorensen OW, Bodenhausen G, Wagner G, Ernst RR, Wüthrich K. Improved spectral resolution in cosy 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem Biophys Res Commun* **1983**;117:479-85.
159. Jeener J, Meier BH, Bachmann P, Ernst RR. Investigation of exchange process by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys* **1979**;71:4546-4553.
160. Kessler H, Gehrke M, Griesinger C. Two-dimensional NMR spectroscopy. background and overview of the experiments. *Angew Chem* **1988**;27:490-536.
161. Jonsson U, Fagerstam L, Ivarsson B, Johnsson B, Karlsson R, Lundh K, Lofas S, Persson B, Roos H, Ronnberg I, et al. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **1991**;11:620-7.
162. Turbadar T. Complete absorption of light by thin metal films. *Proc Phys Soc* **1959**;73:40-44.

163. Otto A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys* **1968**;216:398-410.
164. Kretschmann E, Rather H. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturf* **1968**;230:2135-2136.
165. Xing L, Tjarnlund K, Lindqvist B, Kaplan GG, Feigelstock D, Cheng RH, Casasnovas JM. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J* **2000**;19:1207-16.
166. Holmes SD, May K, Johansson V, Markey F, Critchley IA. Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermis with fibronectin using surface plasmon resonance. *J Micro Methods* **1997**;28:77-84.
167. Quinn JG, O'Neill S, Doyle A, McAtamney C, Diamond D, MacCraith BD, O'Kennedy R. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem* **2000**;281:135-43.
168. Cooper MA, Hansson A, Lofas S, Williams DH. A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal Biochem* **2000**;277:196-205.
169. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C. *Colloid and Interface Science* **1991**;143:513-526.
170. Informationen der Firma Biacore. <http://www.biacore.com>.
171. Myszka DG, Rich RL. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *PSTT* **2000**;3:310-317.
172. Weimar T. Recent Trends in the Application of Evanescent Wave Biosensors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**;39:1219-1221.
173. Erb EM, Chen X, Allen S, Roberts CJ, Tendler SJ, Davies MC, Forsen S. Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Anal Biochem* **2000**;280:29-35.
174. 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**;228:274-80.
175. Nagata K, Handa H. Real-time analysis of biomolecular interactions: Applications of Biacore. Springer Verlag. Berlin. **2000**.
176. Rich RL, Myszka DG. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* **2000**;11:54-61.
177. NIH AIDS Research & Reference Program. Data sheet GHOST Cell Transfectants. <http://www.aidsreagent.org>. **2003**.
178. Meyer S. Synthese und Konformationsanalyse von V3-Glycopeptiden des GP120 aus dem HIV. Dissertation. Universität Hamburg. **1999**.
179. Barker SA, Foster AB, Siddiqui IR, Stacey M. Structure of an acidic polysaccharide elaborated by *Aerobacter aerogenes*. *Nature* **1958**;181:999.
180. Likhoshesterov LM, Novikova OS, Derevitskaya VA, Kochetkov NK. A selective method for sequential splitting of O- and N-linked glycans from N,O-glycoproteins. *Carbohydr Res* **1990**;199:67-76.
181. Eichler J, Bienert M, Stierandova A, Lebl M. Evaluation of cotton as a carrier for solid-phase peptide synthesis. *Pept Res* **1991**;4:296-307.

182. Unverzagt C, Kunz H. Synthesis of glycopeptides and neoglycoproteins containing the fucosylated linkage region of N-glycoproteins. *Bioorg Med Chem* **1994**;2:1189-201.
183. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **1959**;82:70-7.
184. Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* **1958**;74:443-50.
185. Koide T, Otaka A, Fujii N. Investigation of the dimethylsulfoxide-trifluoroacetic acid oxidation system for the synthesis of cystine-containing peptides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1993**;41:1030-4.
186. Tost J. Synthese und Untersuchung von N-Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV-Glycoproteins gp120. Diplomarbeit. Universität Hamburg. **1999**.

Lebenslauf

geboren am 12. Mai 1968 in Hamburg, verheiratet.

Schulbildung:

1974 – 1978 Grundschule Braamkamp (Hamburg)
1978 – 1980 Orientierungsstufe Heinrich-Hertz (Hamburg)
1980 – 1987 Gymnasium Heinrich-Hertz (Hamburg), Abitur

Beruflicher Werdegang:

1987 – 1990 Berufsausbildung zur Chemielaborantin
bei der Firma Schill&Seilacher in Hamburg
1990 – 1991 Berufstätigkeit als Chemielaborantin
bei der Firma Schill&Seilacher in Hamburg
in der instrumentellen Analytik
1991 – 1998 In den vorlesungsfreien Zeiten Tätigkeit als Chemielaborantin
bei der Firma Schill&Seilacher in Hamburg

Studium/Promotion:

1991 – 1994 Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg
Diplomvorprüfung (Note „sehr gut“)
1994 – 1998 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg
Diplomhauptprüfung (Note „sehr gut“)
01. – 03.1995 Erasmusaustausch an die Universität von Bangor (Wales)
04.1998 – 01.1999 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer
am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg
Titel: *Synthese und Untersuchung von N-Typ-Glycopeptiden
aus dem V3-Bereich des HIV Glycoproteins GP120*
(Gesamtnote „sehr gut“)
Seit 04.1999 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Meyer
am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg
Titel: *Synthese von N-Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich
des HIV-1 Glycoproteins GP120 und Untersuchung ihrer CCR5
Korezeptorspezifität*

Stipendium:

04. – 09.1999 und Vollmitglied des Graduiertenkollegs 464 „Glykokonjugate:
10.2001 – 03.2004 *Darstellung, Analyse, Struktur und Funktion*“,
daneben assoziiertes Mitglied

Anstellungsverhältnisse:

10.1999 – 09.2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg,
Lehrtätigkeit im Rahmen des organisch-chemischen Grundpraktikums für Biochemiestudenten

Veröffentlichungen:

- Publikation S. Meyer, S. Polzer, J. Tost, M. Schreiber und B. Meyer, *HIV utilizes glycosylated V3 Loop for CCR5 coreceptor Interaction and infection*, in preparation.
- Posterpräsentationen S. Meyer, A. Neffe, J. Tost, H. Müller, M. Schreiber und B. Meyer, *Synthesis and Structural Charakterization of N-Type Glycopeptides Related to the V3 Loop of HIV GP120*, Glycostructures in Biological Systems, Symposium, Hamburg 1998.
- S. Meyer, J. Tost, J. Dojahn, H. Möller, O. Schuster, M. Mayer und B. Meyer, *Synthese von GP120 Glycopeptiden und Bestimmung ihrer Bindungsepitope an CD4 sowie Co-Rezeptoren*, Evaluierung des SFB 470, Hamburg 1999.
- S. Meyer, A. Neffe, J. Tost, H. Müller, M. Schreiber und B. Meyer, *Synthesis and Structural Charakterization of N-Type Glycopeptides Related to the V3 Loop of HIV GP120*, 20th International Carbohydrate Symposium ICS 2000, Hamburg 2000.
- J. Tost und B. Meyer, *Synthese und Untersuchung von N-Typ-Glycopeptiden aus dem V3-Bereich des HIV GP120*, Evaluierung des Graduiertenkollegs 464, Hamburg 2001.
- J. Tost, S. Meyer, S. Polzer, M. Schreiber und B. Meyer, *Synthesis of Glycosylated V3 Loop Peptides of the Glycoprotein GP120 of HIV and their Specific Binding to the Human Receptor CCR5*, 2nd International Symposium on Conformational Control of Biomolecular Function, VW Foundation, Lübeck 2001.
- Arbeitsgruppe B. Meyer, *Synthese und Bindungseigenschaften komplexer Glycopeptide des HIV GP120*, Evaluierung des SFB 470, Hamburg 2003.

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